

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO DE NUEVA METODOLOGÍA ANALÍTICA
PARA LA DETERMINACION DE QUINOLONAS
EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

TESIS DOCTORAL

**MOHAMMED KARIM HASSOUAN
GRANADA, 2006**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mohammed Karim Hassouan
D.L.: Gr. 2309 - 2006
ISBN: 84-338-4165-3

**DESARROLLO DE NUEVA METODOLOGÍA ANALÍTICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN
ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

por

MOHAMMED KARIM HASSOUAN

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**VISADA en Granada a 30 de Octubre
de 2006.**

**MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Ciencias,
Sección Químicas.**

**Fdo.- Mohammed Karim Hassouan
Licenciado en Ingeniería Química**

**Fdo. Prof. Dr. José Luís Vílchez Quero
Catedrático del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada**

**Fdo. Prof. Dr. Alberto Navalón Montón
Profesor Titular del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada**

**Fdo. Dr. Oscar Ballesteros García
Investigador “Juan de la Cierva” del
Departamento de Química Analítica
de la Universidad de Granada**

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mis Directores: el Dr. D. José Luis Vélchez Quero, el Dr. D. Alberto Navalón Montón y el Dr. D. Oscar Ballesteros García, ya que ellos fueron los que me propusieron el tema de esta Memoria y me iniciaron en la investigación, así como, por su orientación, interés y valiosos consejos que han permitido la conclusión de la misma.

A Oscar, por su amistad, y por la ayuda y apoyo que me ha ofrecido en todos estos años dedicados a la investigación.

A Alberto, por su apoyo, paciencia y ayuda.

A mis compañeros de fatiga del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada: Jalila, Inmaculada, Carolina, Ana, Marcio, Abdel Kader, Younes, Alejandro, Javier, Francisco, Samuel y Joaquín.

A Sandra del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona por haberme ayudado en parte de esta Memoria.

A mis amigos: Nageb, Rachid, Hicham, Nadia, Manuel, Javier, Simohammed, Hasan, entre otros. Y a todos los que me han ayudado en algún momento de mi vida, aunque no los haya mencionado.

A mis padres y mis hermanos Sanae, Adil y Zouhair, sin cuyo apoyo y cariño nunca hubiera podido llegar a presentar esta Memoria.

Por último a Sanaa quien ha estado siempre a mi lado, en los buenos y en los malos momentos, para infundirme ilusión por mi trabajo, y fortaleza, tan importante en los momentos de desánimo.

A mis padres,

A Sanaa,

ÍNDICE

OBJETIVOS DE LA TESIS	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
I.1.- AGENTES ANTIBACTERIANOS	7
I.1.1.- Uso de antibióticos en medicina veterinaria	7
I.1.2.- Quinolonas.....	10
I.1.2.1.- Estructura y clasificación	11
I.1.2.2.- Relación estructura-actividad	15
I.1.2.3.- Comportamiento ácido-base.....	18
I.1.2.4.- Modo de acción	19
I.1.2.5.- Farmacocinética.....	21
I.1.2.6.- Desarrollo de resistencia	24
I.1.2.7.- Interacción con otras sustancias	25
I.1.2.8.- Efectos adversos. Toxicidad	26
I.1.2.9.- Uso veterinario de las quinolonas	28
I.1.2.10.- Efecto del consumo abusivo de las quinolonas. Resistencia antimicrobiana	36
I.2.- ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS	38
I.2.1.- Generalidades.....	38
I.2.2.- Análisis de quinolonas	39
I.2.2.1.- Etapa de extracción.....	40
I.2.2.2.- Métodos de limpieza. (“clean-up”)	41
I.2.2.3.- Técnicas de determinación	42
A) Métodos espectrofotométricos.....	43
B) Métodos espectrofluométricos	45
C) Métodos mediante cromatografía de gases	47
D) Métodos electroanalíticos	47
E) Métodos electroforéticos	47
F) Métodos mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	51

CAPÍTULO II. REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA	57
II.1.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES	59
II.1.1.- Disoluciones	59
II.1.2.- Gases empelados	62
II.1.3.- Reactivos y disolventes	62
II.2.- MATERIALES DE LABORATORIO, INSTRUMENTACIÓN Y PROGRAMAS	63
II.2.1.- Material del laboratorio	63
II.2.2.- Instrumentación.....	64
II.2.3.- Software	66
II.3.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS	67
II.3.1.- Calibración.....	67
II.3.1.1.- <i>Recta de calibrado</i>	69
II.3.2.- Validación de un método analítico.....	71
II.3.2.1.- <i>Parámetros de calidad de un método analítico</i>	71
II.3.2.2.- <i>Evaluación de la veracidad</i>	75
II.3.2.3.- <i>Empleo de materiales de referencia</i>	78
II.3.2.4.- <i>Materiales sintéticos</i>	80
II.3.2.5.- <i>Empleo de método de referencia</i>	81
CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN TEJIDO DE POLLO	83
III.1.- INTRODUCCIÓN.....	85
III.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE UNA MEZCLA DE QUINOLONAS	88
III.2.1.- Fundamentos de la técnica.....	88
III.2.2.- Optimización de la fase móvil.....	88
III.2.2.1.- <i>Introducción</i>	88
III.2.2.2.- <i>Procedimiento Experimental</i>	99
A) <i>Introducción</i>	99

B) Análisis cromatográfico	103
III.2.3.- Parámetros analíticos del método	109
III.2.3.1.- Establecimiento y verificación del método	109
III.2.3.2.- Parámetros del método analítico	112
III.3.- DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN TEJIDO DE POLLO	114
III.3.1.- Tratamiento de la muestra	114
a. Extracción de la carne	115
b. Extracción en fase sólida	117
III.3.2.- Parámetros analíticos	122
III.3.2.1.- Establecimiento y verificación del método	122
III.3.2.2.- Parámetros de calidad del método analítico	123
III.3.2.3.- Estudio de recuperación	124
CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN LECHE Y HUEVO	127
IV.1.- INTRODUCCIÓN	129
IV.2.- DETERMINACIÓN DE FLOUROQUINOLONAS EN LECHE	131
IV.2.1.- Condiciones cromatográficas	131
IV.2.2.- Tratamiento de la muestra	132
IV.2.3.- Parámetros analíticos	138
IV.2.3.1.- Establecimiento y verificación del método	138
IV.2.3.2.- Parámetros de calidad del método analítico	139
IV.2.3.3.- Estudio de recuperación	140
IV.3.- DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN HUEVO	143
IV.3.1.- Condiciones cromatográficas	143
IV.3.2.- Tratamiento de la muestra	144
IV.3.3.- Parámetros analíticos	150
IV.3.3.1.- Establecimiento y verificación del método	150
IV.3.3.2.- Parámetros de calidad del método analítico	151
IV.3.3.3.- Estudio de recuperación	151

CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN MUESTRAS DE CERDO Y TERNERA	157
V.1.- INTRODUCCIÓN.....	159
V.2.- DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN MUESTRAS DE CERDO Y TERNERA	162
V.2.1.- Condiciones cromatográficas.....	162
V.2.2.- Tratamiento de la muestra	163
a. Extracción de la carne	163
b. Extracción en fase sólida.....	165
V.2.3.- Parámetros analíticos	169
V.2.3.1.- <i>Establecimiento y verificación del método</i>	169
V.2.3.2.- <i>Parámetros del método analítico</i>	173
V.2.3.3.- <i>Estudio de recuperación</i>	177
CONCLUSIONES	181

OBJETO DE LA TESIS

Objeto de la Tesis

Las quinolonas son antimicrobianos sintéticos ampliamente utilizados en medicina humana y en veterinaria. Estos compuestos poseen unas características estructurales que hacen que la resistencia de las bacterias a las mismas sea reducido, sin embargo, el amplio uso que de ellos se realiza en veterinaria puede propiciar que los residuos de los mismos se incorporen a la cadena alimentaria, y por tanto, facilitar los fenómenos de resistencia bacteriana. Por estas razones, el uso de la mayoría de estos compuestos está regulado por diferentes organismos tanto nacionales como

internacionales, y la necesidad de su control se ha convertido en una prioridad para la salud humana.

El objetivo de esta Memoria es el desarrollo de metodología analítica de buenas características (sensibilidad y selectividad) para la identificación y determinación de las quinolonas reguladas por la Unión Europea en diferentes alimentos de origen animal.

Para ello, atendiendo a las propiedades analíticas de estos compuestos se ha seleccionado la cromatografía líquida con detección fluorimétrica como técnica analítica para la identificación y determinación de estas quinolonas, previo tratamiento de la muestra, en músculo de pollo, cerdo y ternera, en leche de vaca, en huevo y en riñón de cerdo.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I.1.- AGENTES ANTIBACTERIANOS.

Los agentes antibacterianos son sustancias químicas de bajo peso molecular, sintéticas o producidas por microorganismos, que tienen la capacidad, en pequeñas concentraciones, de inhibir el crecimiento e incluso de destruir a ciertos microorganismos. En la actualidad se conocen más de 5000 antibióticos teniendo a nuestra disposición una gran variedad de ellos no sólo de origen natural, sino también semisintéticos y sintéticos.

I.1.1.- Uso de los antibióticos en medicina veterinaria

La cría intensiva de animales para la producción de alimentos, ha dado lugar a un gran incremento del uso de medicamentos veterinarios durante las últimas décadas, destacando, en especial, la administración de antibióticos. Los antibióticos se empezaron a utilizar en medicina veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana y hoy en día la gran variedad de antibióticos existente permite el tratamiento de las enfermedades infecciosas, que afectan tanto a los animales de compañía como a los destinados al consumo humano.

El uso de los antibióticos en veterinaria para el tratamiento de enfermedades en el ganado destinado al consumo humano, así como su utilización como aditivos en granjas industriales, han dado como resultado que deba considerarse su presencia potencial en

alimentos de origen animal. Ya en la década de los 80 se estimó que al menos el 60% de los animales, destinados a la alimentación humana, eran tratados con antibióticos en alguna etapa de su vida. Hay que tener en cuenta que si los tiempos de eliminación de los antibióticos no se respetan, existe un riesgo significativo de encontrar residuos de los mismos en los alimentos. Además, algunos antibióticos se añaden directamente, por ejemplo, a la leche para mantenerla fresca.

La forma de administración de los antibióticos de uso veterinario varía en función de la especie animal que se trate. Así, a los animales de gran tamaño, el medicamento se le puede administrar como píldoras o en forma de disolución inyectable. Sin embargo, en el caso de animales como las aves de corral o los conejos, estas vías son poco apropiadas a causa de la gran cantidad de animales que hay en las granjas y se suele administrar el fármaco disuelto en el agua o como piensos medicamentosos.

La importancia del uso de este tipo de fármacos en el sector veterinario es elevada. En la *Figura I.1* se muestra una estimación del consumo y la distribución del uso de antibióticos correspondientes a la Unión Europea y a Suiza en el año 2001, según datos publicados por FEDESA (Federación Europea de Salud Animal).

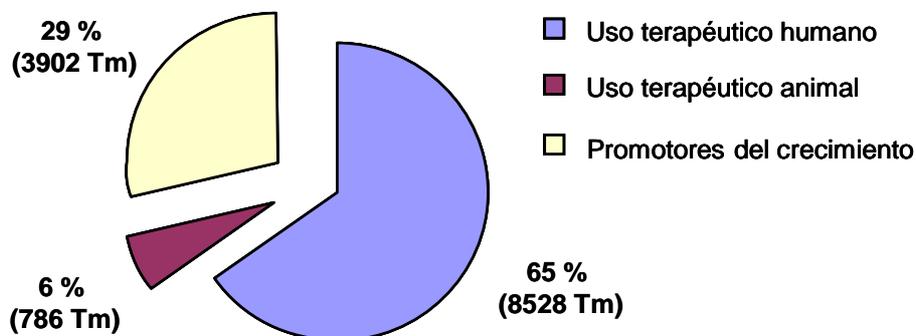


Figura I.1. Uso de antibióticos en seres humanos y animales en EU y en Suiza (2001).

En referencia al consumo veterinario de antibióticos en España, en la *Tabla I.1* se muestra el volumen de ventas en España de los grupos de antimicrobianos más importantes, según datos de *Veterindustria* (la asociación que reúne a la industria farmacéutica dedicada a la sanidad animal), de 1996¹.

¹ Díez P., Calderón V., *Rev. Esp. Quimioter.*, 10 (1997) 275.

Tabla I.1. Grupos de agentes antiinfecciosos más importantes en función del volumen de ventas (millones de euros).

	1994	1995	1996
Antibióticos inyectables aislados			
Penicilinas	1.80	2.72	3.56
Macrólidos	1.05	1.04	1.08
Tetraciclinas	2.28	2.55	2.90
Quinolonas	3.89	5.31	5.69
Otros	2.93	3.04	3.34
Antibióticos inyectables combinados			
Penicilina-estreptomicina y sus asociaciones	9.98	9.38	9.98
Otras asociaciones	9.98	9.56	9.32
Antibióticos orales aislados			
Macrólidos	1.64	1.95	2.12
Tetraciclinas	3.03	5.46	7.10
Quinolonas	5.78	4.86	5.39
Otros	1.37	2.52	2.90
Antibióticos orales combinados			
Macrólidos	4.69	5.27	5.16
Otras asociaciones	3.42	4.10	3.70

El uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano con fines terapéuticos proporciona innegables ventajas, sin embargo, cuando se utilizan de forma fraudulenta, indiscriminada y abusiva, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos persistan en el alimento y pasen a la cadena de alimentación humana.

Los residuos de antibióticos en alimentos de origen animal pueden provocar reacciones alérgicas en individuos hipersensibles, pero sobretodo, la administración de bajos niveles de antibióticos puede dar lugar a bacterias resistentes, que pueden llegar al ser humano a través de dichos alimentos. Además de estos efectos adversos inmediatos, existen también efectos a largo plazo que aún no se conocen. Por todas estas razones los organismos encargados de la vigilancia de la salud pública, en muchos países, han desarrollado normativas de control de los *Límites Máximos de Residuos* (LMR) en tejidos animales destinados al consumo humano. Entre estas normativas cabe destacar las de la *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) de la Unión Europea (UE) y las de la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos (USA). El LMR representa aquella concentración permitida de un principio activo en alimentos de origen animal (músculo, hígado, riñón, grasa, leche, huevo, etc.) que al ser ingerida por el ser humano no constituye ningún riesgo para su salud².

I.1.2.- Quinolonas

Los agentes antibacterianos del grupo de las quinolonas, ampliamente utilizados en medicina humana, pertenecen a una de las clases más importantes de antibióticos sintéticos y de mayor uso en veterinaria a nivel mundial³.

Inicialmente su uso estaba restringido al tratamiento de infecciones urinarias producidas por bacterias gram-negativas. Posteriormente, y a raíz de modificaciones estructurales llevadas a cabo en la molécula base (principalmente basadas en la presencia de uno o varios átomos de flúor, dando lugar a las fluoroquinolonas) se aumentó su espectro de actividad haciéndolas útiles para el tratamiento de infecciones respiratorias y otras de tipo sistémico, mejorándose ampliamente los aspectos farmacocinéticos asociados como son: absorción oral, penetración intracelular y metabolización.

En 1960 *Leshner* puso a la disposición de la comunidad médica la primera quinolona antibacteriana, el ácido nalidíxico, medicamento que pronto encontró un lugar en la terapéutica de las infecciones de vías urinarias. Con el tiempo, se encontró que generaba rápidamente resistencias bacterianas, lo que limitó su uso. Es muy probable, sin embargo, que dicho efecto fuese confundido con el paradójico comportamiento que

² Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.

³ Segev S., Rubinstein E, Ed. Springer-Verlag, Berlín, 1998.

muestra este antibacteriano, el cual a dosis terapéuticas tiene un efecto bactericida, mientras que a dosis mayores pierde casi toda acción antibacteriana. Esto se ha explicado en función de que el ácido nalidíxico induce la producción de proteínas tóxicas por la misma bacteria que la hacen autodestruirse. Al incrementarse la dosis, se inhibe además del ácido desoxirribonucleico, el ácido ribonucleico por lo que se bloquea la síntesis proteínica y con ella el efecto autotóxico referido. Es posible que, en mayor o menor grado, otras quinolonas de primera generación tenga este comportamiento.

De cualquier manera. El ácido nalidíxico ha sido de gran valor para la quimioterapia de las enfermedades bacterianas en virtud de haber contribuido con el núcleo básico de los compuestos de mayor efecto en las últimas décadas, las fluoroquinolonas⁴.

1.1.2.1.- Estructura y clasificación

Las quinolonas representan una clase de antibióticos homogénea desde el punto de vista químico. Aunque no tienen una estructura química básica idéntica, sí comparten un esqueleto tipo que es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinolona. Las diferencias estructurales entre las distintas quinolonas radican tanto en el número y posición de los átomos de nitrógeno como en las cadenas laterales y la presencia de átomos de flúor en su molécula. Todas ellas derivan de ácidos carboxílicos heterocíclicos clasificados en cuatro grupos (*Figura 1.2*)⁵⁻⁶. Así tenemos:

- 1) Las 8-N-quinolonas (con un núcleo naftiridínico). Dentro de este grupo se incluyen el ácido nalidíxico, la enoxacina y la trovafloxacin.
- 2) Las 2-N-quinolonas (con un anillo cinolina). A este grupo pertenece como más claro representante la cinoxacina.
- 3) Derivados de la quinoleina. En este grupo nos encontramos a la norfloxacin, amifloxacin, ofloxacin, difloxacin, fleroxacin y flumequina.

⁴ Sumano H., Ocampo L., *Farmacología Veterinaria, McGraw-Hill Interamericana, 2^{da} Ed., 1999, Mexico.*

⁵ Bellido F., *Schweiz Apotheker-Zeitung, 5 (1987) 126.*

⁶ Neuman M., *Clinical Pharmacokinetics, 14 (1988) 96.*

- 4) Las 6,8-N,N-quinolonas (piridopirimidinas). Dentro de este grupo tenemos a los ácidos piromídico y pipemídico.

A todas estas sustancias se les conoce también como “análogos del ácido nalidíxico”, “4-quinolonas” o simplemente “quinolonas”.

Según se puede apreciar en la *Figura I.2*, todas las quinolonas tienen una estructura común compuesta de un anillo piridona (con un ácido carboxílico libre en la posición 3 y un nitrógeno en posición 1 que debe estar unido a una cadena lineal o cíclica (R_1) para que la sustancia presente actividad), unido a un anillo aromático.

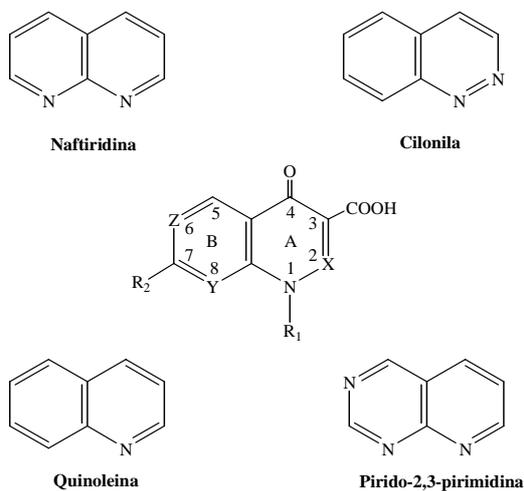


Figura I.2. Estructuras básicas de los cuatro grupos de quinolonas.

Otra posible clasificación de estas sustancias se establece por generaciones, de acuerdo a su evolución a lo largo del tiempo y a su aparición en el mercado. Siguiendo este criterio, en bibliografía se encuentran varias clasificaciones.^{7,8} A modo de ejemplo, se muestra una que propone cuatro etapas de desarrollo de las quinolonas:

⁷ Rothlin R.P., *Quinolonas, revisión histórica.*, *Medicina*, 59 (1999) 3.

⁸ Bal P., *J. Antimicrob. Chemother.*, 46(2000) 17.

- a) **Primera generación:** que engloba las primeras quinolonas surgidas a partir del descubrimiento del ácido nalidíxico (1962) y la aparición de otros compuestos más estables, pero con espectro de actuación similar: ácido pipemídico, ácido piromídico, ácido oxolínico y la cinoxacina entre otros (*Figura I.3*). Son utilizadas, principalmente, en el tratamiento de infecciones urinarias y desde el punto de vista farmacocinético su característica esencial es la rápida eliminación renal y la obtención de bajas concentraciones séricas.

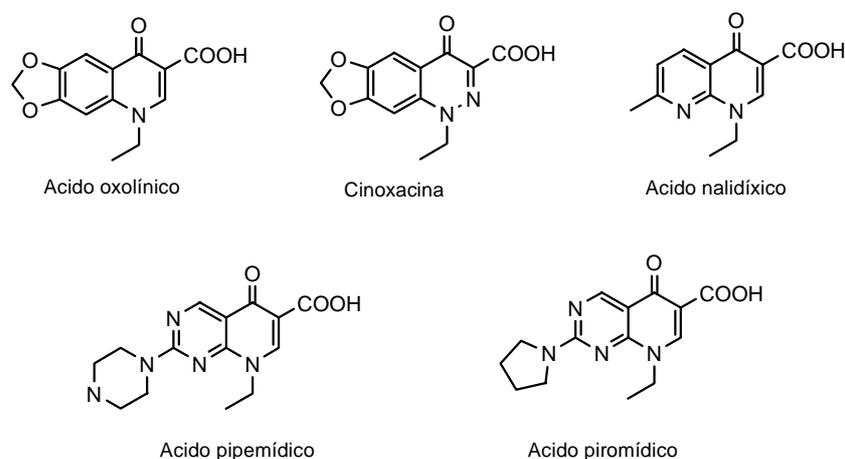


Figura I.3. Quinolonas de primera generación.

- b) **Segunda generación:** sintetizadas entre los años ochenta y principios de los años noventa, surgen con la aparición de las fluoroquinolonas al incorporar un átomo de flúor en posición 6 y un grupo piperacínilo en posición 7 (*Figura I.4*). Estas fluoroquinolonas fueron reconocidas como un grupo de agentes antimicrobianos de relevantes propiedades terapéuticas en función de:

- Poseer un amplio espectro de actividad antibacteriana.
- Inducir una baja frecuencia de mutaciones espontáneas.
- Presentar elevada biodisponibilidad oral.
- Exhibir una buena distribución tisular obteniendo niveles significativos en los fluidos intersticiales.
- Presentar una adecuada penetración intracelular en macrófagos y otras células fagocítica.
- Alcanzar concentraciones urinarias adecuadas.

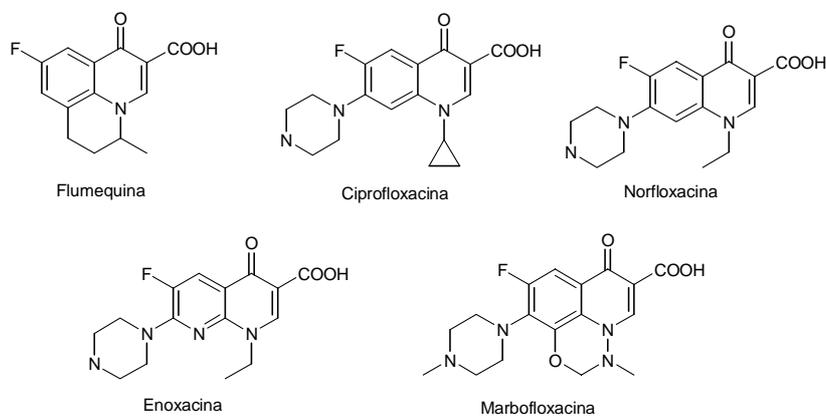


Figura I.4. Quinolonas de segunda generación.

- c) **Tercera generación:** engloba nuevas quinolonas aparecidas a partir se modificaciones de las anteriores, como la incorporación de nuevos átomos de flúor a la molécula, aumentándose así el espectro antimicrobiano, mejorando la actividad contra gram-positivos, anaerobios y microbacterias (*Figura I.5*).

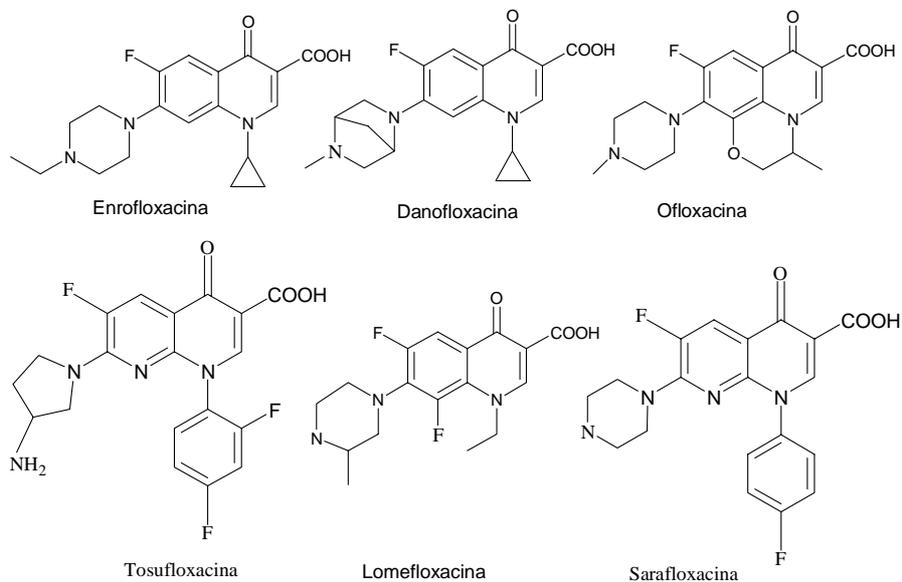


Figura I.5. Quinolonas de tercera generación.

- d) **Cuarta generación:** En los últimos 8 años han aparecido nuevas quinolonas que incorporan pequeñas modificaciones estructurales respecto a las quinolonas de tercera generación, sin embargo algunas publicaciones han propuesto que este grupo de quinolonas pertenecen a una **cuarta generación** tales como grepafloxacina⁹, clinafloxacina y trovafloxacina (Figura I.6). El rasgo más notorio de estos antibacterianos es una mayor potencia antibacteriana y mayor biodisponibilidad oral que sus antecesores.

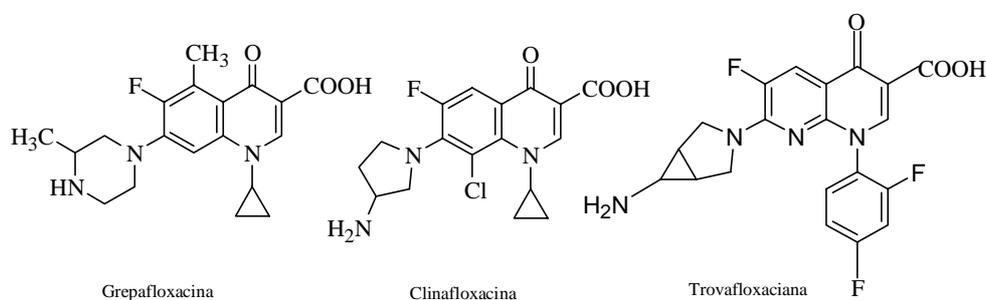


Figura I.6. Quinolonas de cuarta generación.

1.1.2.2.- Relación estructura-actividad

Las quinolonas utilizadas en la práctica médica son todas estructuralmente similares y presentan un núcleo básico en su molécula (Figura I.2).

Posición 1. Desde los primeros estudios, se descubrió que en la posición 1 existía una longitud óptima de la molécula de 0.42 nm, lo que corresponde a un grupo etilo. Más tarde, se encontró que el grupo ideal en esa posición era el ciclopropilo en función de sus características estéricas, espaciales y de interacción electrónica con su potencial receptor, ADN-girasa, también llamada topoisomerasa II de las bacterias. No obstante, en sustancias como la tosufloxacina, difloxacina y temafloxacina, las cuales poseen un grupo N-1-fluorofenil, se puede aumentar la eficacia contra las bacterias anaerobias, aunque a riesgo de perder algo de potencia contra el resto del espectro. Recientemente, se encontró que un sustituto t-butilo aumenta la eficacia contra las bacterias gram-positivas sin demasiada pérdida contra las bacterias gram-negativas.

⁹ Ernst M., Ernst E., Klepser M., *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 54 (1997) 2569.

Posición 2. Poco se ha logrado a este nivel. La cinoxacina ha introducido un nitrógeno en esta posición, logrando importantes ventajas farmacocinéticas, pero perdiendo potencia antibacteriana. Para resolver este problema se ha incluido en lugar de nitrógeno un azufre, unido cíclicamente al benceno; aún no se tienen datos clínicos de esta sustancia.

Posiciones 3 y 4. En ellas no se han podido modificar los grupos carboxílico y cetona, aparentemente necesarios para la unión de la molécula a la ADN-girasa. Un medicamento experimental derivado de la ciprofloxacina, con un anillo isotiazol, tiene de 4 a 10 veces la potencia de la ciprofloxacina, lo que probablemente se deba a que el nitrógeno actúa con un protón ácido de la misma manera que el grupo carboxilo. También se ha detectado que la situación en un mismo plano del grupo cetona y del grupo isotiazol-enolisado es esencial para mantener la capacidad de unión a la ADN-girasa.

Posición 5. Aunque se han intentado sustituciones en esta posición con diferentes grupos, hasta la fecha, no se han logrado resultados importantes. De hecho, existen opiniones encontradas acerca de la sustitución de las llamadas aminoquinolonas, pues hay quienes mencionan que tienen una reducción en la eficacia antibacteriana y quienes sostienen lo contrario.

Posición 6. De las sustituciones ensayadas con F, Cl, Br, CH₃, SCH₃, COCH₃, CN y NO₂, indudablemente ha sido el flúor el que ha constituido el avance más importante dando lugar a las quinolonas de segunda generación. Tal sustitución es una verdadera marca, ya que con ella se mejora la unión a la ADN-girasa de 2 a 17 veces y la penetración celular en 1 a 70 veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esta posición. Todas las fluoroquinolonas de mayor potencia y utilidad clínica tienen un flúor en la posición 6. La flumequina, ciprofloxacina, norfloxacina, enoxacina y marbofloxacina son quinolonas de segunda generación¹ (Figura 1.4).

Posición 7. En esta posición, se han intentado numerosas manipulaciones con mayor o menor éxito. Así como el flúor en posición 6 distingue a las quinolonas de segunda generación, en esta posición se diferencian las quinolonas de tercera generación. Se ha visto que la afinidad por la ADN-girasa aumenta de manera directamente proporcional al volumen del sustituyente. Esto es, grupos lineales en esta posición muestran menos potencia que grupos cíclicos como el de la enrofloxacin y danofloxacin; esta última es muy voluminosa y liposoluble en función de su grupo diazabicycloalquil en esta posición. Las quinolonas de segunda generación como la norfloxacina, enoxacina y ciprofloxacina tienen un grupo piperazinil, mientras que quinolonas de tercera generación, como la

ofloxacina, y fleroxacina, poseen un anillo 4-metil-piperazinil. Se ha dicho, acerca de dos quinolonas muy parecidas estructuralmente como son la ciprofloxacina y la enrofloxacina, que la segunda logra el doble de las concentraciones plasmáticas que la primera bajo iguales condiciones experimentales, a pesar de que la diferencia entre ambas quinolonas es de un grupo etilo en la posición 4 del anillo insertado en la posición 7 de la quinolona.

Posición 8. En este sitio, la existencia de un N (tosufloxacina) ha mejorado los rasgos farmacocinéticos aunque no tanto los antimicrobianos, de tal manera que la pérdida de actividad “in vitro” se sustituye con una mejor actividad “in vivo”. No se ha demostrado que se logre una mayor eficacia añadiendo más flúor a diversas partes de la molécula de las quinolonas. Por tanto, si la próxima quinolona que salga al mercado pondera como de utilidad antibacteriana que es bifluorada o trifluorada, será necesario conocer los detalles de la influencia de los átomos de flúor adicionales en la actividad antibacteriana y su farmacocinética.

De acuerdo con los últimos estudios, la sustitución en la posición 7 de las quinolonas de tercera generación tiene poco efecto electrónico o estérico sobre la disociación del grupo carboxílico de la posición 3, pero tienen un grupo de reacción básica funcional en esta posición que le confiere un pKa más alto que el proporcionado por el nitrógeno heterocíclico. Esto tiene un gran efecto sobre su solubilidad y su coeficiente de partición, lo que a su vez determina sus excelentes propiedades farmacocinéticas de penetración tisular y lenta eliminación y por ello su eficacia clínica. Enrofloxacina, lomefloxacina, danofloxacina, ofloxacina, tosufloxacina y sarafloxacina son algunas de las quinolonas de tercera generación (*Figura 1.5*). Las quinolonas de tercera generación presentan una serie de propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que, comparativamente a las quinolonas previas, constituyen ventajas significativas como agentes antimicrobianos.¹⁰ Entre las propiedades distintivas más relevantes podemos destacar:

- Fagocíticas, varias veces superiores a los niveles plasmáticos.
- Presentan una disolución rápida en el medio gastrointestinal que se acompaña con una adecuada y rápida absorción en el duodeno. La C_{max} se obtiene entre 1 y 2 horas después de la administración.
- Presentan grandes volúmenes de distribución, en general, superiores a los agentes de segunda generación.

¹⁰ Stein G., *Clin. Inf. Dis.*, 23 (1996) 19.

- Alcanzan concentraciones elevadas a nivel tisular pulmonar, renal, endometrial, miometrial, de cuello uterino, de ovario, vesicular y en líquido biliar, significativamente superiores a las plasmáticas.
- Se detectan concentraciones intracelulares muy altas en macrófagos y otras células fagocíticas, varias veces superiores a los niveles plasmáticos.
- La mayoría presenta vidas medias plasmáticas relativamente elevadas, que permiten el empleo de estos agentes en una sola toma diaria.
- Presentan un amplio espectro antimicrobiano con marcada actividad frente a bacterias, gram-positivas y gram-negativas, incluyendo anaerobias, y agentes patógenos intracelulares.

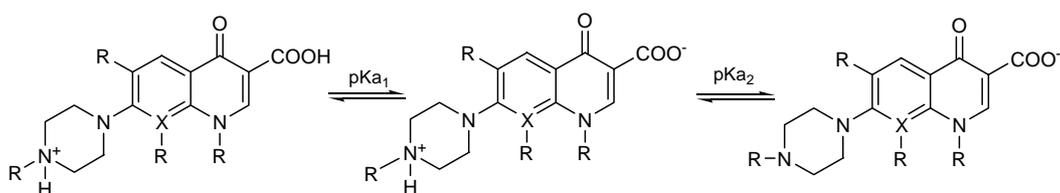
El empleo de las quinolonas de tercera generación está indicado en los procesos que a continuación se mencionan, ocasionados por bacterias sensibles: Infecciones urinarias, infecciones respiratorias, infecciones cutáneas, infecciones bucodentales, infecciones oftálmicas, infecciones otorrinolaringológicas, colecistitis y colangitis agudas, prostatitis, uretritis gonocócica y uretritis no gonocócica.

1.1.2.3.- Comportamiento ácido-base

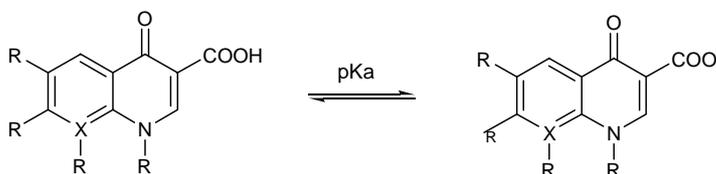
Es importante conocer las constantes de disociación de las quinolonas ya que definen su grado de ionización a cualquier valor de pH. Éste hecho es fundamental porque su absorción en el tracto gastrointestinal y su paso a través de las membranas biológicas dependen de la fracción de quinolona presente en un particular estado iónico. Asimismo, permiten la explicación de fenómenos físicos, como cambios en solubilidad y de fluorescencia. Por estos motivos, en la bibliografía son muchos los estudios en los que se han determinado los valores de las constantes de disociación de quinolonas.

La presencia del grupo carboxílico en la posición 3 determina que las quinolonas tengan carácter ácido, mientras que la introducción de grupos piperazinil en la posición 7, incorpora grupos amino, los cuales son básicos. Como consecuencia, en solución acuosa y en términos ácido-base, las quinolonas con grupos 7-piperazinil, presentan especies catiónica, zwitteriónica y aniónica, mientras que el resto de quinolonas sólo pueden ser neutras o aniónicas. Los equilibrios ácido-base para estos dos tipos de quinolonas en el intervalo fisiológico de pH se muestran en la *Figura 1.7*. Los valores referenciados de pKa para las quinolonas ácidas están entre 6.0-6.9, mientras que en el caso de las

quinolonas 7-piperazinil, los valores encontrados oscilan entre 5.5-6.6 y 7.2-8.9 para pK_{a1} y pK_{a2} , respectivamente¹¹.



Quinolonas con grupo 7-piperazinil



Quinolonas ácidas

Figura I.7. Equilibrio ácido-base de las quinolonas.

1.1.2.4.- Modo de acción

Estos compuestos actúan sobre los microorganismos sensibles inhibiendo la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano, careciendo de efecto sobre la síntesis nuclear de este ácido de las células eucarióticas. La mayor parte de los estudios están realizados con ácido nalidíxico. Este, inhibe específicamente, la síntesis de ADN bacteriano, al impedir tanto "in vitro" como "in vivo", la replicación más que la iniciación, de dicho ácido; sin embargo, el ácido nalidíxico no se une al ADN, no interfiere la síntesis de sus precursores (purinas y pirimidinas), ni inhibe a ninguna de las enzimas responsables de su formación. El ácido nalidíxico es un inhibidor de la replicación del ADN tanto cromosómico como extracromosómico; así, interrumpe la conjugación entre enterobacterias si la donadora es sensible pero no si es resistente a este fármaco. También se ha descrito que los cuatro ácidos, nalidíxico, oxolínico, piromídico y pipemídico, inhiben la transferencia de factores R durante la conjugación.

¹¹ Hernández-Arteseros J.A., Barbosa J., Compañó R., Prat M.D., *J. Chromatogr. A*, 945 (2002) 1.

Igualmente, el ácido nalidíxico puede inhibir la replicación del ADN de bacteriófagos, induce el paso de profagos a fagos virulentos en bacterias lisógenas y en determinadas condiciones, es un agente mutágeno. Aunque está admitido que el ácido nalidíxico carece de actividad para inhibir la síntesis de ADN nuclear (cromosomas) de las células eucarióticas, sin embargo, es capaz de alterar la replicación de dicho ácido en orgánulos citoplásmicos, tales como mitocondrias y cloroplastos, lo que podría explicar alguno de sus posibles efectos secundarios y la inhibición de algunas líneas de cultivos de tejidos.

La “diana” a nivel molecular, de estos compuestos es la girasa del ADN bacteriano, por ello se les engloba bajo la denominación de inhibidores de la girasa. Esta es una enzima esencial en la biología de la bacteria pues es la responsable del enrollamiento de las bandas de ADN, que constituyen su cromosoma, con objeto de fijarlas a la superficie interna de la célula. Por tanto, estos fármacos inhiben la síntesis del ADN mediante el bloqueo de la reacción de superenrollamiento de dicho ácido dependiente del trifosfato de adenosina (ATP) catalizada por la girasa.¹²

Estructuralmente, esta enzima contiene dos subunidades A, que son sendas proteínas codificadas por el gen *gyr A*, y otras dos subunidades B que son igualmente proteínas cuya codificación corresponde al gen *gyr B*. La girasa del ADN, posee otras actividades tales como acciones de catenación (unión) o descatenación (separación) de las dos bandas de ADN bacteriano, hidrólisis del ATP, etc., todas ellas tendentes a asegurar la integridad de dicho ácido.

Las bacterias, en presencia de las quinolonas, se alargan y luego se alisan. Para encontrar su diana (la girasa del ADN), tienen que penetrar en el interior de la célula bacteriana a través de las porinas; una vez dentro, se fijan y bloquean selectivamente, la acción de la girasa, que tiene como función preparar al ADN para la transcripción, catalizando la rotura de bridas de dicho ácido y posibilitando un enrollamiento tal, que cada uno de los aproximadamente, 30 bucles primitivos del cromosoma de la bacteria se convierten en más de 400. Las quinolonas se unirían a una de las bridas, impidiendo la formación de los bucles adicionales, y la molécula de ADN, demasiado extendida no tendría espacio suficiente en el interior de la célula bacteriana. Posteriormente, la muerte de la bacteria (acción bactericida) tendría lugar, de forma rápida, por la elaboración de exonucleasas.

¹² Dámaso D., “Antimicrobianos”, *Marketing Pharma S.A.*, 1990, Madrid, Cap. 24.

El proceso es antagonizado por la rifampicina, el cloranfenicol y el tianfenicol, lo que sugiere que estos fármacos inhiben, además de la girasa, la síntesis de nuevas proteínas; sin embargo la ofloxacina y la ciprofloxacina no experimentan este antagonismo, lo que hace pensar que ambos poseen, aparte del mecanismo común de todo el grupo de inhibición de la girasa del ADN, otro mecanismo diferente no relacionado con dicha enzima.

A concentraciones elevadas, los ácidos nalidíxico y oxolínico inhiben, además, la síntesis del ARN y de proteínas; esta acción podría explicar el efecto paradójico, en virtud del cual las concentraciones más altas de estos dos fármacos ocasionan, en algunas especies bacterianas, un efecto letal menor que a bajas concentraciones. Todo este grupo de fármacos, a bajas concentraciones bloquean la replicación del ADN bacteriano; cuando éstas se elevan, se impide la transcripción de dicho ácido.

En las células del hombre hay también una topoisomerasa II o girasa, pero afortunadamente no es reconocida como diana por estos fármacos debido a que a diferencia de la enzima bacteriana, sólo está formada por dos subunidades en lugar de cuatro; por ello, estos fármacos no modifican la estructura de los cromosomas humanos.

Aunque estos medicamentos pueden considerarse como primariamente bacteriostáticos, concentraciones idénticas o ligeramente superiores a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), resultan bactericidas para muchos microorganismos. Por otra parte, su actividad no depende de la tasa de crecimiento bacteriano, lo que puede resultar ventajoso para el tratamiento de infecciones por bacilos gram-negativos en las que, como es sabido, un gran número de ellos crece solo lentamente.

1.1.2.5.- Farmacocinética

A) Absorción.

En general, todas las quinolonas son absorbidas rápidamente al ser administradas por vía oral, oscilando el tiempo máximo para la absorción máxima entre 1 y 3 horas. Existen diferencias, no obstante, respecto a la velocidad de la absorción y al porcentaje de la dosis administrada que se absorbe. La concentración máxima (C_{\max}) y el área bajo la curva concentración-tiempo aumentan linealmente con la dosis, independientemente de la vía

de administración^{13,14,15}. En términos generales la administración concomitante de alimentos retrasa la absorción de las quinolonas, disminuyendo la concentración máxima que se alcanza en suero¹⁶. Esta administración concomitante de alimentos puede, de este modo, ser útil para minimizar las dificultades gastrointestinales¹⁷.

B) Distribución.

La penetración tisular de los agentes antibacterianos es seguramente el requisito más importante para su utilidad terapéutica y/o profiláctica ya que el proceso de infección primaria ocurre en los tejidos. Ninguna de las fluoroquinolonas recientemente desarrolladas se encuentra, significativamente, enlazada a proteínas plasmáticas (aproximadamente al 37% con la sparfloxacin, al 30% con la ciprofloxacina, 20% con la ofloxacina y 10% con la lomefloxacina), y además es independiente de la concentración y del pH¹⁸. Con este bajo grado de unión a proteínas plasmáticas, la penetración en los fluidos y tejidos es alta y las condiciones en las que cambia esta unión no cabe esperar que influya excesivamente en la farmacocinética de la mayoría de las fluoroquinolonas.

El bajo grado de ionización, baja unión a las proteínas plasmáticas, y alta solubilidad acuosa de todas las quinolonas fluoradas sirve para aumentar su transporte a los tejidos periféricos.

A pesar de las diferencias obvias en los tiempos de eliminación ($t_{1/2}$), C_{max} y eliminación urinaria de las fluoroquinolonas, el grado de penetración tisular es sorprendentemente constante. La concentración de fluoroquinolona en el tejido decrece, aproximadamente, de forma paralela con la concentración en suero.

Las fluoroquinolonas se concentran en el tejido mucoso gastrointestinal, y tracto genital urinario y respiratorio, en el tejido pulmonar y en el corazón.

¹³ Lambert H.P., O'Grady F.W., "Antibiotic and Chemotherapy", Ed. Churchill Livingstone, New York, 1992.

¹⁴ Schentag J.J., Nix D.E., Wise R., "The new generation of quinolones", Ed. Marcel Dekker, New York, 1990.

¹⁵ Wolfson J.S., Hooper D.C., *Eur. J. Clin. Microb. Inf. Dis.*, 10 (1991) 276.

¹⁶ Robson R.A., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2 (1992) 3.

¹⁷ LeBel M., *Eur. J. Clin. Microb. Inf. Dis.*, 10 (1991) 316.

¹⁸ Shimada J., Mogita T., Ishibashi Y., *Clin. Pharmacokinetics*, 25 (1993) 358.

Curiosamente, la concentración de las fluoroquinolonas en suero es menor en mujeres embarazadas que en mujeres no embarazadas. Además, se ha demostrado que estos compuestos han penetrado en la barrera placentar y se han concentrado en el fluido amniótico. Además, las elevadas concentraciones de algunas fluoroquinolonas han sido medidas en la leche materna, con un exceso del 75% de la concentración en suero solo 2 horas después de la administración del compuesto¹⁹.

C) Eliminación.

Las fluoroquinolonas difieren significativamente en el grado en que son eliminadas por transformación metabólica en la excreción hepática o renal²⁰. La eliminación de las quinolonas es fundamentalmente de tipo renal, tanto por filtración glomerular como por secreción tubular activa. El porcentaje de la dosis administrada que se elimina por la orina, inalterada, es variable, y lo mismo ocurre con el porcentaje de fármaco que resulta metabolizado a nivel hepático. Tanto la quinolona inalterada como los metabolitos de la misma son encontrados en la orina y en las bilis. Algunos de estos metabolitos son reciclados hepáticamente, y aparecen junto a la quinolona inalterada en altas concentraciones en las heces. El aclaramiento renal de las quinolonas oscila entre 50 y 500 mL/min, compatible con el del fármaco que se elimina no sólo por filtración pasiva sino también por secreción tubular activa.

La ofloxacina y la sparfloxacina son muy poco metabolizadas y la mayor parte se eliminan inalteradas en la orina. La pefloxacina, por el contrario, es ampliamente convertida en sus derivados con una menor actividad microbiológica. La ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina, lomefloxacina y norfloxacina son eliminados parcialmente por el metabolismo y parcialmente por excreción renal.

Las fluoroquinolonas excretadas predominantemente por alguno de los dos mecanismos, renal o hepático, generalmente tienen mayor tiempo de vida media en suero que aquellas que se eliminan por ambas vías. Así tenemos que el $t_{1/2}$ está entre 3 y 5 horas para la ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina y ofloxacina, sobre 8 horas para la lomefloxacina, y sobre 10 horas para fleroxacina y pefloxacina. La sparfloxacina y la difloxacina tienen, considerablemente, altos tiempos de vida media, de 20 y 26 horas, respectivamente.

¹⁹ Petrikos G., Giamarellou H., Kolokythas E., *Fortsch Antimikro. Chemoter.*, 11 (1992) 241.

²⁰ Von Rosenstiel N., Adam D., *Drugs*, 47 (1994) 1994.

I.1.2.6.- Desarrollo de resistencia

Las bacterias, por su gran capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una *resistencia natural o intrínseca* en las bacterias si carecen de diana (estructuras o mecanismos bioquímicos necesarios para multiplicarse o para sobrevivir) para un antibiótico. La *resistencia adquirida* es la realmente importante desde un punto de vista clínico, y es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismo de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la *resistencia transmisible* es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra.

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción. Los mecanismos de resistencia son fundamentalmente tres:

- 1) *Inactivación del antibiótico por enzimas.* La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico.
- 2) *Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana.* Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos o alteran los sistemas de transporte. En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.
- 3) *Alteración por parte de la bacteria de su punto diana.* Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), y del ARNr23S de las enzimas PBPs necesarias para la formación de la pared celular.

La resistencia a las quinolonas está relacionada con la diana principal de acción, la topoisomerasa II o girasa y fundamentalmente en la subunidad A del ribosoma, asociados a cambios en el contenido de lipopolisacáridos en la pared celular y alteraciones simultáneas de su permeabilidad. No obstante cada vez se da más importancia a la presencia de mecanismos de expulsión que impiden alcanzar concentraciones intracelulares de antibiótico suficientes o dificultan el paso a través de la pared; recientemente se ha descrito también la

presencia de plásmidos e incluso una cepa de *Klebsiella pneumoniae* con un plásmido de resistencia múltiple que incluía también quinolonas.

Generalmente, el uso de una terapia de combinación de antibióticos puede retrasar la aparición de resistencia. No obstante, el apropiado uso de una terapia combinatoria con quinolonas y sus ventajas para prevenir la resistencia ha sido establecido. Un corto tratamiento podría, probablemente, reducir el peligro de resistencia muy bien.

Finalmente, debido al completo solapamiento en la resistencia entre las nuevas fluoroquinolonas, así como el grado de solapamiento en la resistencia con el ácido nalidíxico y otros antibióticos como la tetraciclina, cloranfenicol y cefoxitin, es importante que todas las fluoroquinolonas sean usadas correctamente²¹.

1.1.2.7.- Interacción con otras sustancias.

En la bibliografía consultada se ha descrito diversas interacciones de las quinolonas cuando se encuentran presentes con sustancias de muy diversa naturaleza, en la *Tabla 1.2* se recogen algunas de ellas^{22,23,24}. Desde el punto de vista clínico, la interacción con antiácidos, teofilina, fenbufen y warfarina son los más importantes. Otros efectos son raramente encontrados en el marco clínico.

²¹ Barry, A.L., "In vitro activity of quinolones and related compounds: the new generation of quinolones", Ed. Marcel Dekker, New York, 1990.

²² Christ W., Lenhart T., "The new generation of quinolones", Ed. Marcel Dekker, New York, 1990.

²³ Ranandt J.M., Marchbanks C.R., Dudley, M.N., *Clin. Inf. Dis.*, 14 (1992) 272.

²⁴ Wolfson J.S., Hooper D.C., *Am. J. Med.*, 91 (1991) 153.

Tabla I.2. Interacciones entre las quinolonas y otras drogas.

Droga concomitante	Efecto
Antiácidos	Decrece la biodisponibilidad de la quinolona.
Bismuto	Decrece la biodisponibilidad de la quinolona.
Cafeína	Incrementa la concentración de cafeína en suero.
Cimetidina/ranitina	Altera la biodisponibilidad de la quinolona.
Digoxina	Incrementa la concentración de digoxina en suero.
Fenbufen	Incrementa el peligro de estimulación del SNC.
Hierro/multivitaminas	Decrece la biodisponibilidad de la quinolona.
Opiáceos	Incrementa la concentración de opiáceos en suero.
Fenazone (antipirina)	Incrementa la concentración de fenazone en suero.
Probenecid	Incrementa la concentración de quinolona en suero.
Teofilina	Incrementa la concentración de teofilina en suero.
Warfarina	Incrementa la concentración de warfarina en suero.

I.1.2.8.- Efectos adversos. Toxicidad

Las quinolonas son generalmente bien toleradas. Los perfiles de seguridad son equiparables para todas las quinolonas, aunque hay pequeñas diferencias en la incidencia y tipo de reacciones inducidas por ciertos compuestos^{25,26,27}. La mayor parte de los efectos adversos frecuentes atribuidos al tratamiento de fluoroquinolonas están relacionados con el sistema gastrointestinal, seguido por síntomas neuropsiquiátricos y reacciones de hipersensibilidad, como se observa en la *Tabla I.3*.

²⁵ Mäkien M., Forbes, P.D., Stenbäck, F., *J. Photochem. Photobiol.*, 37 (1997) 182.

²⁶ Urbach F., *J. Photochem. Photobiol.*, 37 (1997) 169.

²⁷ Stahlmann R., Lode, H., *Drugs*, 58 (1999) 37.

Tabla I.3. Listado de efectos adversos relacionadas, probablemente o posiblemente, con el uso de quinolonas.

Reacción	Incidencia total (%)
<i>Efectos clínicos adversos</i>	
Gastrointestinal.	2 - 16
Sistema nervioso central	1 - 7
Hipersensibilidad/Piel	0.2 - 3.0
Tromboflebitis	4 - 12
Cardiovascular	2 - 16
<i>Efectos de laboratorio adversos</i>	
Hepatobiliar	2 - 3
Renal/Urinario	1 - 2
Hematopoyético/Linfático	0.1 - 1.0
Propiedades séricas	0.1 - 1.0

La mayor parte de los efectos descritos pueden ser considerados leves o moderados en cuanto a su peligrosidad y rara vez requieren interrumpir el tratamiento (2.6% para enoxacina o lomefloxacin, 2% para ciprofloxacina, 1.5% para ofloxacina y < 1% para norfloxacina)²⁸. Los efectos colaterales disminuyen cuando se interrumpe la administración de la quinolona, según muestran las experiencias, excepto en muy pocos casos de reducción de la sensibilidad del olfato y del tacto. Algunas reacciones adversas están relacionadas con la dosis (reacciones del sistema nervioso central y gastrointestinal) y pueden aumentar con una larga duración de la terapia. En general, la incidencia de efectos adversos relacionados definitiva, probable o posiblemente, con la administración de estos compuestos, es similar a las encontradas en el tratamiento de pacientes con otros compuestos comparables incluyendo ampicilina, cefotaxime, ceftazidime y cotrimoxazole.

²⁸ Just P.M., *Pharmacotherapy*, 13 (1993) 5.

En la *Tabla I.4* se muestra los efectos adversos producidos por la administración de ciprofloxacina en 8861 pacientes distribuidos por toda la geografía²⁹.

Desde el punto de vista de los efectos adversos y sus relaciones con la estructura química es importante indicar que la fototoxicidad observada con el empleo de las fluoroquinolonas es particularmente significativa en las que presentan un átomo de halógeno en la posición C-8, como ocurre en la lomefloxacina, fleroxacina, sparfloxacina¹⁷, ciprofloxacina y ofloxacina³⁰. Se ha demostrado que las fluoroquinolonas en las cuales la posición C-8 es sustituida con flúor son muy inestables frente a la radiación UV y esto determina el desarrollo de productos de degradación tóxicos³¹. La introducción de un grupo metoxi en la posición 8 incrementa significativamente la estabilidad de las fluoroquinolonas frente a la radiación UV y, por lo tanto, disminuye la fototoxicidad³².

1.1.2.9.- Uso veterinario de las quinolonas

Como se ha indicado anteriormente, el uso de quinolonas no se restringe únicamente al campo de la salud humana, sino que también son ampliamente utilizadas en veterinaria, no sólo con fines terapéuticos sino también con fines profilácticos. Se administran a ganado bovino, porcino y ovino y también se usan en avicultura y para el tratamiento de animales de compañía.

Actualmente diferentes quinolonas están disponibles en muchos países para la terapia de animales. Sin embargo, el uso de estos fármacos difiere bastante dependiendo de la especie animal. En la *Tabla I.5* se muestra el uso de cada una de las quinolonas autorizadas en veterinaria³³.

²⁹ Campoli-Richards D.M., Monk J.P., Price A., Benfield P., Todd P.A., Ward A., *Drugs*, 35 (1988) 373.

³⁰ Tiefenbacher E.M., Haen E., Przybilla B., Kurz H., *J. Pharmace. Scien.*, 83 (1994) 463.

³¹ Matsumoto M., Kojima K., Nagano H., Matsubara S., Yokota, P., *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 36 (1992) 1715.

³² Marutani K., Matsumoto M., Otabe Y., *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 37 (1993) 2217.

³³ World Health Organization (WHO). *Use of quinolones in food animals and potential impact in human health* (1998).

Tabla I.4. Listado de efectos adversos relacionadas, probablemente o posiblemente, con el uso de ciprofloxacina.

Número de casos	Número de casos	Número de casos
Gastrointestinal	Otros 13	Reducción de plaquetas 4
Náuseas 141	Total 408	Aumento de plaquetas 3
Diarrea 108	Sistema Nervioso Central	Otros 5
Vómitos 51	Mareo 37	Total 88
Dispepsia 44	Dolor de cabeza 29	General
Dolor abdominal 33	Ansiedad 25	Debilidad 14
Anorexia 25	Temblores 16	Fiebre 11
Dificultad al tragar 8	Somnolencia 11	Malestar 6
Flatulencia 7	Confusión 5	Otros 13
Aumento de saliva 6	Alucinaciones 5	Total 44
Sequedad de boca 5	Otros 10	Cardiovascular
Estomatitis 5	Total 138	Flebitis 12
Otros 9	Piel	Palpitaciones 9
Total 442	Erupciones 60	Vasodilatación 3
Metabólico y nutricional	Pruritus 29	Otros 3
AST elevado 121	Dolor inyección 14	Total 33
ALT elevado 115	Edema local 6	Urinogenital
Fosfatasa alcalina alto 39	Otros 13	Vaginitis 12
Transpeptidasa γ -glutamil elevado 30	Total 122	Albuminuria 6
LDH elevado 23	Linfáticos	Otros 7
Creatina sérica elevado 23	Eosinofilia 57	Total 25
BUN elevado 23	Leucopenia 14	Otros 38
Bilirrubina elevado 9	Leucocitos elevados 5	
Ácido úrico elevado 7		
Colesterol elevado 5		

Tabla I.5. Listado de quinolonas autorizadas para su uso en salud animal.

Quinolona	Bovino	Porcino	Pollos	Pavos	Peces
Enrofloxacin	*	*	*	*	*
Danofloxacin	*	*	*		
Norfloxacin			*	*	
Ofloxacin			*	*	
Ciprofloxacin	*	*	*		
Sarafloxacin			*	*	*
Orbifloxacin	*	*			
Marbofloxacin	*	*			
Flumequina	*	*	*	*	
Ácido oxolínico	*	*	*		*
Difloxacin	*	*	*	*	

Por otro lado, la distribución geográfica de las quinolonas autorizadas para uso veterinario, varía en función de la quinolona y la especie animal estudiada. Así, en países como Estados Unidos y Canadá son pocas las quinolonas aprobadas para uso veterinario (enrofloxacin y sarafloxacin), mientras que en Australia, no se ha autorizado el uso de estos compuestos en animales destinados al consumo humano (*Tabla I.6*). La otra cara de la moneda la ofrecen los países asiáticos, tales como Japón, en los que las quinolonas son ampliamente utilizadas en prácticas veterinarias, especialmente en avicultura.

Tabla I.6. Listado de quinolonas autorizadas para su uso en animales por regiones geográficas.

Región	Animales	Aves	Pequeños animales	Peces
Europa	ENR, FLU, MAR, DAN	ENR, DIF, FLU, OXO	ENR, DIF, MAR	SAR, (OXO) ^a
USA	Ninguna	ENR, SAR	ENR, DIF, ORB	Ninguna
Japón	ENR, DIF, ORB, DAN, OXO	ENR, VEB, ORB, DAN, OXO	ENR, ORB	OXO
Asia	ENR, DAN, CIP	ENR, CIP, DAN, OFL, FLU, NOR, OXO, (SAR)	ENR	OXO, ENR, FLU
América latina	ENR, CIP, DAN, NOR, (FLU)	ENR, CIP, DAN, NOR, (FLU, OXO)	ENR	OXO
Canadá		ENR ^b	ENR	
Australia	Ninguna	Ninguna	ENR	Ninguna
Sudáfrica	ENR, DAN	ENR, DAN, NOR	ENR	

^a Las sustancias que están entre paréntesis tienen un uso restringido.

^b Voluntariamente retiradas del mercado en 1998.

En Europa, el uso de estas sustancias viene regulado por la normativa 2377/90 de la Comunidad Europea, en los anexos I y III, y sus posteriores modificaciones. En esta normativa aparecen las sustancias cuyo uso está regulado y para las que se ha establecido un límite máximo de residuo. En la *Tabla I.7* se muestran los LMR de las quinolonas reguladas en la normativa europea^{34,35}.

³⁴ Reglamento CEE núm. 2377/90 del consejo, de 26 junio 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, Diario Oficial de las Comunidades Europeas 18 agosto 1990 (L224) 2608.

Tabla I.7. Límites Máximos de Residuos (LMR) de quinolonas de uso veterinario establecidos por la Unión Europea.

Sustancia	Especie animal	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tejidos
Danofloxacin	Ganado ovino, bovino, caprino	200	Músculos
		100	Grasa
		400	Hígado, Riñón
		30	Leche
	Pollos	200	Músculos
		100	Grasa
		400	Hígado, Riñón
	Ganado Porcino	100	Músculos
		50	Piel + Grasa
		200	Hígado, Riñón
Sarafloxacin	Pollos	10	Piel + Grasa
		100	Hígado
	Salmón	30	Músculo + Piel
Ciprofloxacina + Enrofloxacin	Ganado bovino, ovino	100	Músculos
		300	Grasa
		200	Hígado, Riñón
	Conejos	100	Leche
		100	Músculos, Grasa
		200	Hígado
		300	Riñón
		100	Músculos, Grasa+Piel
	Ganado porcino	200	Hígado
		300	Riñón
		100	Músculos, Grasa+Piel
		200	Hígado
300		Riñón	
Difloxacin	Pollos, pavos	100	Músculos
		400	Grasa + Piel
		1900	Hígado
		600	Riñón
	Ganado bovino, ovino, caprino	400	Músculos
		100	Grasa
		1400	Hígado
	Ganado porcino	800	Riñón
		400	Músculos
100		Grasa + Piel	
800		Hígado, Riñón	

³⁵ The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Veterinary Medicine and Inspections. MRL assessments in the context of Council Regulation 2377/90, EMAA/CVMP/765/99-Rev 10, 12 July 2002, <http://www.emea-eu.int>.*

Tabla I.7. Límites Máximos de Residuos (LMR) de quinolonas de uso veterinario establecidos por la Unión Europea. (continuación)

Sustancia	Especie animal	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tejidos
Marbofloxacina	Ganado bovino	150	Músculos, Hígado, Riñón
		50	Grasa
		75	Leche
	Ganado porcino	150	Músculos, Hígado, Riñón
		50	Grasa + Piel
Flumequina	Ganado bovino, ovino, porcino	200	Músculo
		300	Grasa
		500	Hígado
		1500	Riñón
	Pollos	50	Leche
		400	Músculo
		250	Piel + Grasa
		800	Hígado
		100	Riñón
	Salmón	600	Músculo + Piel
	Pavos	400	Músculo
		250	Piel + Grasa
		800	Hígado
1000		Riñón	
Ácido oxolínico	Ganado bovino	100	Músculo
		50	Grasa
		150	Hígado, Riñón
	Ganado porcino	100	Músculo
		50	Grasa + Piel
		150	Hígado, Riñón
	Aleta de pescado	300	Músculo + Piel
	Pollo	100	Músculo + Piel
		50	Piel + Grasa, Huevos
		150	Hígado, Riñón

El riesgo del empleo de las quinolonas en animales es que, aunque la probabilidad de aparición de resistencia a estos principios activos por parte de las bacterias es muy baja, si estos organismos nos llegan a través de animales (de crianza, domesticados o de compañía) o personas que han sido o están siendo tratadas con quinolonas, la posibilidad de que se vea reducida la susceptibilidad frente a las quinolonas es mayor.

Las características y propiedades de las quinolonas empleadas en medicina veterinaria son análogas a las sustancias de la misma familia que se utilizan en medicina humana.

Junto a estas sustancias activas típicamente veterinarias, se emplean otras como la ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina que tienen un uso común con la medicina humana.

En general, las quinolonas de primera generación tienen una actividad limitada y suelen ser activas únicamente contra algunas bacterias gram-negativas. El espectro aumenta en la segunda generación, siendo la flumequina la más débil “in vitro” y sin efecto sobre micoplasma, y quizá la ciprofloxacina la más potente con importante efecto antimicoplásmico in vitro. En el caso de las quinolonas de segunda generación, hay actividad importante contra especies de *Pseudomonas*, de *Chlamydia*, de *Mycoplasma*, de *Ureaplasma*, de *Legionella*, de *Mycobacterium* y de *Staphylococcus*, aunque algunos estreptococos han demostrado cierto grado de resistencia. Indudablemente, en medicina veterinaria las más potentes son las fluoroquinolonas de tercera generación. Estas son activas contra todas las bacterias mencionadas y contra especies de *Brucella*, *Rickettsia*, *Coxiella burnetti* y *Plasmodium falciparum*. Nuevamente su actividad es menor contra especies de *Streptococcus* y de *Nocardia* y casi nula contra anaerobios. Algunas evidencias indican que las fluoroquinolonas pueden tener efectos importantes contra *Nocardia asteroides*; la ciprofloxacina fue activa contra 50% de las cepas probadas en un estudio y la tosufloxacina fue 100% eficaz contra especies de *Nocardia*. Las fluoroquinolonas de segunda y tercera generación son eficaces contra la mayoría de los microorganismos patógenos habituales de la mastitis, con las ventajas que no interfieren con las defensas orgánicas, una característica notable de las quinolonas de segunda y particularmente de tercera generación, no compartida por la mayoría de los antibacterianos. Mas aún, se les ha ponderado como una de las opciones potenciales como fármacos en las mastitis crónicas, incluso por especies de *Staphylococcus* de forma "L" intracelulares. No obstante, no es recomendable hasta contar con mayores elementos acerca de la persistencia de residuos.

La ofloxacina tiene excelente eficacia en el tratamiento de la *Coriza aviar* (*Hemophilus paragallinarum*). La enrofloxacina actúa eficazmente contra *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* en cerdos. Es muy probable que otras quinolonas de tercera generación muestren una eficacia comparable.

Sobre el estudio farmacocinética de las quinolonas de primera, segunda y tercera generación en medicina veterinaria, se puede mencionar la evaluación del ácido oxolínico inyectado en becerros a razón de 20 mg/kg donde se encontró que para obtener valores plasmáticos adecuados se debería inyectar el medicamento cada cuatro horas, razón por la

cual no es muy usado en esta especie. En aves, a mediados de la década de los 80, el ácido nalidíxico resultó ser una revelación contra infecciones por *Escherichia Coli*, pues no se le había utilizado para este fin. Incluso salió al mercado de manera inyectable combinada con la gentamicina. Luego, con el uso disminuyó su eficacia sobre la enfermedad crónica respiratoria complicada de las aves; esto se puede explicar en función de la inducción rápida de resistencias bacterianas. Del estudio de la cinética del ácido pipemídico y de otras quinolonas de la primera generación, se encontró que su biodisponibilidad fluctuaba del 39 al 61%, muy por debajo del 93% en el ser humano. Este es un ejemplo de las limitaciones que se originan al extrapolar datos de una especie a otra. Del estudio de la cinética de los ácidos oxolínico y piromídico, de la flumequina, norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacina en pollos, se encontró que se puede absorber por el tubo digestivo con relativa eficacia. Los más rápidamente absorbidos son el ácido piromídico y la ciprofloxacina; los más lentos fueron la flumequina, el ácido oxolínico y la enrofloxacin. No se determinaron sus distribuciones en los diversos tejidos claves, aunque de manera global se asegura que pueden alcanzar valores terapéuticos en sangre, sobre todo la enrofloxacin, seguida de la ciprofloxacina y la flumequina.

Se sabe poco sobre la toxicidad potencial de las fluoroquinolonas de segunda y tercera generación en animales domésticos productivos como aves, cerdos y bovinos (adultos o becerros). Se ha encontrado que se necesitan más de cinco frascos de 100 mL de las presentaciones comerciales de enrofloxacin o danofloxacin para inducir efectos tóxicos en un cerdo de 10 kg de masa. Tampoco se ha detectado que alguna combinación aumente la toxicidad de estos medicamentos en condiciones prácticas en veterinaria. En todo caso, los antiácidos disminuyen la absorción de estos compuestos por quelación, lo cual limita su eficacia.

Aunque se ha descrito la inducción de artropatías, alteraciones de la estructura del cartílago auricular en forma de erosiones en animales en crecimiento, esto no ha logrado adquirir relevancia en animales productivos. Tiene particular relevancia en cachorros, gatos en crecimiento y potrillos. El efecto se relaciona con dosificaciones altas y de manera crónica, aunque el inicio de la lesión se puede detectar desde la segunda dosis. En animales viejos este efecto ocurre únicamente después de un número mayor de tratamiento. Hasta la fecha no hay ningún informe de teratogenicidad. Se han efectuado pruebas de teratogenicidad, embriotoxicidad y mutagenicidad, con danofloxacin y enrofloxacin donde resultan completamente inocuas.

Dado que la principal vía de eliminación es por la orina, se ha especulado que pueden inducir un daño ulterior en un riñón previamente insuficiente manifestado por cristaluria, nefritis intersticial y sangre oculta en orina. El daño suele ser leve y sólo ocurre a grandes dosis, no usadas en clínica.

Efectos colaterales producidos por las quinolonas, tales como desorientación, alteraciones motoras y convulsiones, si se vinculan al uso de analgésicos, resulta poco relevante en veterinaria. No obstante, en animales sólo se ha detectado un retardo en los movimientos y un comportamiento anormal con dosis muy por encima de lo recomendado. En conclusión, las quinolonas son poco tóxicas para los animales, en particular a las dosis habituales.

En el camino hacia el futuro de las quinolonas se deben realizar los ensayos pertinentes para evitar la especulación comercial y el uso inadecuado de este notable grupo de medicamentos.

1.1.2.10.- Efectos del consumo abusivo de quinolonas. Resistencia antimicrobiana

En los últimos años, diferentes publicaciones han hecho referencia al impacto que puede tener el consumo de antibióticos por animales en el desarrollo de resistencias en microorganismos de interés en medicina humana. En el caso de las quinolonas, se han publicado incrementos en el grado de resistencia a quinolonas, en *Escherichia coli*, *Campylobacter* y *Salmonella* de origen animal y humano, que podrían estar relacionados con el amplio consumo de dichos antibióticos en profilaxis animal, además de su uso en humanos^{36,37}. La extremadamente elevada resistencia a ciprofloxacina encontrada en cepas de *Campylobacter* en aves (99%), cerdos (100%) y heces humanas (77%), es actualmente de gran interés y preocupación. Estudios llevados a cabo hasta 1987 mostraron que prácticamente no existían cepas resistentes a fluoroquinolonas. En España, la primeras cepas resistentes a ciprofloxacina en humanos fueron detectadas entorno a 1990, año en que se legalizó en España el uso de enrofloxacin en veterinaria. Desde entonces, un incremento vertiginoso en la resistencia a Ciprofloxacina se produjo en *Campylobacter* en la década de 1990 (1% a 12% en 1990, 30% a 50% en 1991-1993, y 80% en 1996). Durante este periodo, este incremento de resistencia a las quinolonas fue

³⁶ Torres C., Zarazaga M., *Rev. Esp. De Quimioter.*, 11 (1998) 29.

³⁷ Echeita A., Aladueña A., García-Peña J., Frias N., Usera M.A., *J. Antimicrob. Chemother.*, 47 (2001) 315.

observado también en otros países como Finlandia, Holanda, Inglaterra y Canadá. Sin embargo, no se encontró en Suecia, Estados Unidos o Austria.

Al contrario que en *Salmonella*, *Campylobacter* desarrolla resistencia completa a las quinolonas con una simple etapa de mutación, siendo bastante propensas a producir resistencia. En la actualidad, las infecciones más habituales adquiridas por vía alimenticia, son producidas por esta bacteria, causando millones de infecciones gastrointestinales anualmente. El incremento del uso terapéutico y profiláctico en las producciones de aves, se cree que está directamente relacionado con el incremento de la resistencia a quinolonas en infecciones humanas producidas por *Campylobacter* en diferentes países³⁸.

Otros estudios relacionan el consumo de quinolonas en animales, con el desarrollo de resistencias en cepas *Escherichia coli* tanto en animales (pavos: 49% de resistencia a ciprofloxacina) como en los humanos que los cuidan (29%), planteando que el uso de enrofloxacin desarrollaba dicha resistencia en *Escherichia coli* a partir de la flora intestinal de los animales y que las cepas resistentes se diseminan y colonizan en humanos. El grado de resistencia fue muy bajo en el grupo de animales que no recibían quinolonas y en sus cuidadores (0 a 2%)³⁶.

En cada país donde las quinolonas han sido aprobadas para uso animal, la resistencia de quinolonas en *Salmonella* en animales ha sufrido un incremento significativo en un espacio corto de tiempo tras la aprobación de su uso, seguida de la aparición concomitante de resistencia en humanos. La **European Agency for the Evaluation of Medicinal Products** (EMA) ha realizado un amplio estudio para relacionar el consumo de quinolonas en veterinaria con la aparición de resistencia a estos medicamentos, no pudiendo llegar a ninguna conclusión en este aspecto, poniendo de manifiesto el desconocimiento real de la influencia del consumo veterinario de medicamentos en la salud humana³⁹. En todo caso, organismos que velan por la salud como la **Organización Mundial de la Salud** (OMS), apuntan hacia el uso correcto de estas sustancias, en los casos permitidos legalmente y respetando los tiempos de espera, haciendo pues necesario el desarrollo de métodos de análisis que permitan la determinación de estos compuestos.

³⁸ Wegener H.C., WHO collaborating center, Danish Veterinary Institute, Denmark. International conference of drug regulatory Authorities (ICDRA), June (2002).

³⁹ World health organization, Use of quinolones in food animals and potential impact on human health, (1998).

I.2.- ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

I.2.1.- Generalidades

Los métodos de análisis de rutina de residuos de medicamentos de uso veterinario suelen estar basados en técnicas inmunológicas, químicas y, en caso de que el residuo presente actividad antibacteriana, también se utilizan métodos microbiológicos.

Los métodos químicos constan generalmente de una etapa de extracción y otra de purificación del extracto obtenido, antes de proceder a la determinación del analito y suelen presentar una buena sensibilidad y en la mayoría de los casos son más selectivos que los métodos microbiológicos y de inmunoensayo. A modo de resumen, en la *Tabla I.8* se muestran las principales características de cada uno de los métodos de análisis descritos.

Tabla I.8. Resumen de las características de los diferentes métodos de análisis⁴⁰.

	Químico	Inmunoensayo	Microbiológico
Sensibilidad	+ /+++	++ /+++	+ /+++
Especificidad	++	++	+
Confirmación	+ /+++	+	-
Preparación de la muestra	-	- /++	++
Disponibilidad	+++	+	++
Tiempo de análisis (1 muestra)	+	+	- /+
Tiempo de análisis (muchas muestras)	+	+ /+++	+++

⁴⁰ Shepherd M.J., *Analysis of veterinary drug residues in edible animal tissues, en food contaminants. Sources and surveillance.* Edited by C.S. Crease y R. Purchase. The royal society of chemistry, Cambridge (1991).

Otra forma de clasificar los métodos de análisis es de acuerdo con la finalidad a la que van destinados. Aunque se han empleado diferentes términos para definir los diferentes métodos, todos se pueden clasificar en tres grupos: métodos destinados a cribado (screening), métodos para determinación y métodos confirmatorios. Esta clasificación coincide con el sistema utilizado por el *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods* (CCRVDF) que distribuye los métodos en tres niveles. Los métodos de Nivel III son cualitativos o semicuantitativos. Los métodos de Nivel II permiten la cuantificación del analito de interés, pero no su inequívoca identificación. Los métodos de Nivel I permiten confirmar inequívocamente el analito y generalmente se usan también para cuantificar⁴¹. Por su parte, la Unión Europea en su Decisión de la Comisión 93/256/EEC y 93/257/EEC sólo distingue entre métodos de cribado y métodos confirmatorios^{42, 43}.

I.2.2.- Análisis de quinolonas

La gran variedad de usos de las quinolonas en medicina humana y veterinaria ha incrementado, en los últimos 15 años, el interés en esta clase de antibacterianos, lo que ha motivado el desarrollo de métodos analíticos que permitan la cuantificación de las quinolonas en las formulaciones farmacéuticas para el control de calidad, en fluidos biológicos para estudios de farmacocinética y control clínico y en productos alimenticios de origen animal (riñón, hígado, músculo, piel, grasa, leche, huevo...), con el objeto de obtener un control tóxico sanitario en estos alimentos destinados al consumo humano y así garantizar la salud del consumidor.

El análisis de quinolonas en muestras alimentarias, y por tanto en muestras complejas, requiere una etapa de extracción del analito de la matriz, seguida de una o varias etapas de limpieza o clean-up, en las que se intenta eliminar la máxima cantidad posible de sustancias co-extraídas de la matriz y preconcentrar los analitos, para finalmente llevar a cabo la determinación de los analitos mediante una técnica analítica adecuada.

⁴¹ MacNeil J.D., Ka J.F., *Regulatory aspects of residue analyse, Principles and applications*. Editado por M. O'keefe. Harwood Academic publishers, Amsterdam (2000).

⁴² Decisión 93/256/CEE de la comisión, de 14 de abril de 1993. (Diario oficial nº L118 de 14/05/1993, p. 64-74).

⁴³ Decisión 93/257/CEE de la comisión, de 15 de abril de 1993. (Diario oficial nº L118 de 14/05/1993, p. 75-79).

1.2.2.1.- Etapa de extracción

Las quinolonas son sustancias solubles en disolventes orgánicos polares, pero no en disolventes totalmente apolares tales como el hexano o el tolueno. A causa de sus características ácido-base, su solubilidad en agua pura es limitada, pero puede disolverse fácilmente en medio ácido y/o básico, dependiendo de las características de los analitos. Así, las quinolonas anfóteras son solubles tanto en medio ácido como básico, mientras que las ácidas no son solubles en medio ácido. Así pues, los agentes extractantes más usados son disolventes orgánicos polares, así como las disoluciones acuosas o hidroorgánicas a pH adecuado.

Para la extracción con disolventes orgánicos, se han empleado disolventes de polaridad intermedia miscibles^{44,45} o no con agua⁴⁶ tales como acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, acetona y acetonitrilo. La extracción se puede realizar directamente sobre la muestra húmeda. Otra alternativa consiste en emplear disolventes inmiscibles con el agua para la extracción de la muestra, previamente homogeneizada con una disolución acuosa a un pH adecuado que permita tener las moléculas neutras.

Una representación esquemática de los tratamientos de extracción descritos en bibliografía se muestra en la *Figura 1.8*.

⁴⁴ Volmer A., Mansoori B., Locke S.J., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4143.

⁴⁵ ENG G.Y., Maxwell R..J., Cohen E., Piotrowski E.G., Fliddler V., *J. Chromatogr. A*, 799 (1998) 349.

⁴⁶ Hernández-Arteseros J.A., Compañó R., Prat M.D., *Chromatographia*, 52 (2000) 58.

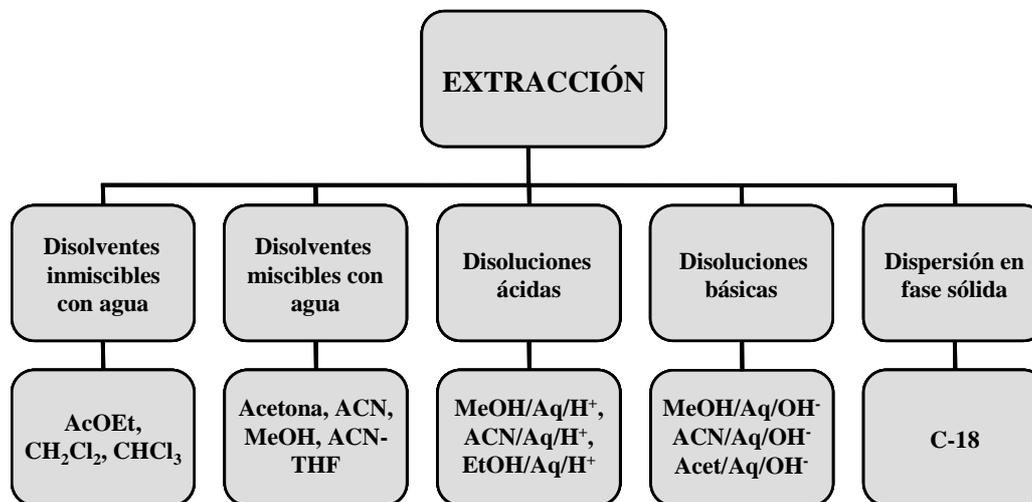


Figura I.8. Resumen de las técnicas de extracción más utilizadas.

I.2.2.2.- Métodos de limpieza (“clean-up”)

Como consecuencia de la naturaleza compleja de las muestras donde se analizan residuos de quinolonas, normalmente se requiere de una etapa de limpieza antes de la determinación analítica. La mayoría de los tratamientos descritos en la literatura consisten de extracciones líquido-líquido y/o extracciones en fase sólida. Sin embargo el procedimiento de limpieza puede variar ampliamente; mientras algunos autores reportan extensos tratamientos de limpieza que involucran varias etapas de extracción líquido-líquido o combinaciones de extracciones líquido-líquido con extracciones en fase sólida, el uso de diálisis o la ultrafiltración, otros autores reportan que la misma no es necesaria o el empleo de una breve limpieza de los extractos^{11,47}.

Los autores que emplean la extracción líquido-líquido lo hacen como método de limpieza del extracto obtenido con disolventes orgánicos puros. Puede tratarse solamente de una etapa de limpieza con hexano para eliminar grasas, pero gracias a las características ácido-base de las quinolonas, lo más habitual es realizar extracciones líquido-líquido en las que le analito se transfiere de una fase a otra por control del pH. También es habitual

⁴⁷ Belal F., Al Majed A.A., Al-oBaid A.M., *Talanta*, 50 (1999) 765.

la combinación de estas particiones ácido-base con etapa de lavado con hexano o incluso con extracción en fase sólida con cartuchos de fase normal⁴⁸.

Una representación esquemática de los tratamientos de limpieza de muestra descritos en la bibliografía se muestra en la *Figura I.9*.

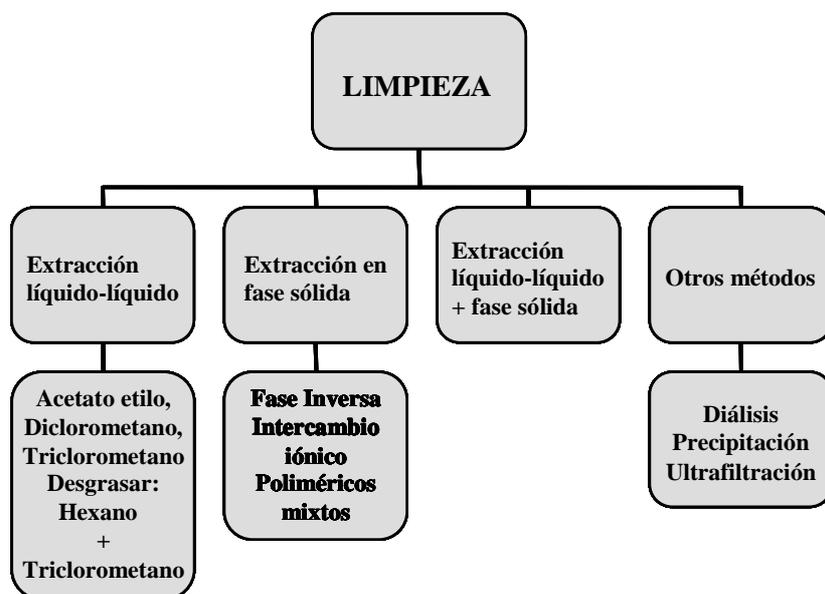


Figura I.9. Resumen de las técnicas de limpieza más utilizadas.

1.2.2.3.- Técnicas de determinación

La mayoría de los métodos reportados para el análisis de quinolonas están basados en el empleo de la cromatografía líquida para la separación y cuantificación de las mismas. Otras técnicas de uso menos frecuente son la espectrofotometría de absorción molecular, la espectrofluorimetría, la electroforesis capilar, la cromatografía de gases y las técnicas electroanalíticas.

A) Métodos espectrofotométricos:

Las quinolonas son especies químicas altamente absorbentes de radiación ultravioleta. Las quinolonas muestran dos bandas de absorción: una ancha entre 300-350 nm que es común para todas las quinolonas y una segunda centrada a 245-290 nm que es específica para cada quinolona. Estos máximos de absorción han sido utilizados para cuantificar a estos compuestos. Por otra parte la reacción de las quinolonas con iones metálicos y con reactivos orgánicos tales como el p-nitrofenol, la p-benzoquinona, el 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ), el 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ), el violeta de supraceno (SV 3B), el violeta de bromocresol (BCP), el azul de bromofenol (BPB) y el azul de bromotimol (BTB) producen complejos y pares iónicos coloreados que han permitido el desarrollo de diversos métodos de análisis. En la *Tabla 1.9* se presentan algunos de los métodos espectrofotométricos encontrados en la literatura.

Tabla I.9. Análisis de quinolonas por espectrofotometría.

COMPUESTO	LD	REACTIVO	MATRIZ
NOR ⁴⁸	50 µg/mL	Fe (III)	Preparados farmacéuticos
NOR, CIP, OFL, ENR ⁴⁹	2.5-5.0 µg/mL	SV 3B y TP 000	Preparados farmacéuticos
NOR ⁵⁰	10 µg/mL	DDQ y TCNQ	Preparados farmacéuticos
NOR ⁵¹	7.5 µg/mL	p-Benzoquinona	Preparados farmacéuticos
CIP ⁵²	6 µg/mL	Fe (III)	Preparados farmacéuticos
CIP, NOR ⁵³	50 µg/mL	Fe (III)	Preparados farmacéuticos
PEF ⁵⁴	0.2 µg/mL		Preparados farmacéuticos
OFL, LOM ⁵⁵	2 µg/mL	BPB, BTB, BCP	Preparados farmacéuticos
PIP, NOR, CIP ⁵⁶	30-90 ng/mL	p-Nitrofenol	Preparados farmacéuticos
NOR ⁵⁷	5 µg/mL	Fe (III)	Preparados farmacéuticos
ENR ⁵⁸	25, 4, 50 µg/mL	Fe (III), BCP y DDQ	Preparados farmacéuticos
CIP ⁵⁹	0.2 µg/mL	Fe (III)	Preparados farmacéuticos

⁴⁸ Sultan S.M., Suliman F.E.O., *Analyst*, 118 (1993) 573.

⁴⁹ Sastry C.S.P., Rao K.R., Prasad D.S., *Talanta*, 42 (1995) 311.

⁵⁰ Amin A.S., El-Sayed G.O., Issa Y.M., *Analyst*, 120 (1995) 1189.

⁵¹ Al-Khamees H.A., *Anal. Letters*, 28 (1995) 109.

⁵² Fratini L., Schapoval E.E.S., *Int. J. Pharm.*, 127 (1996) 279.

⁵³ Suliman F.E.O., Sultan S.M., *Talanta*, 43 (1996) 559.

⁵⁴ Ahmad A.K.S., Kawy M.A., Nebsen M., *Anal. Letters*, 30 (1997) 809.

⁵⁵ Issa Y.M., Abdel-Gawad, F.M., Abou Table M.A., Hussein H.M., *Anal. Letters*, 30 (1997) 2071.

⁵⁶ Xuan C.S., Wang Z.Y., Song J.L., *Anal. Letters*, 31 (1998) 1185.

⁵⁷ El-Khateeb S.Z., Abdel Razeq S.A., Amer M.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998) 829.

⁵⁸ El-Sherif Z.A., *Anal. Letters*, 32 (1999) 65.

⁵⁹ Djurdjevic P., Todorovic M., Stankov M.J., Odovic J., *Anal. Letters*, 33 (2000) 657.

B) Métodos espectrofluorimétricos:

Las quinolonas son especies químicas que se caracterizan por presentar fluorescencia nativa. Su espectro de excitación coincide con el espectro de absorción molecular, mientras que el espectro de emisión consiste en una banda ancha centrada entre 350 y 400 nm en el caso de las quinolonas ácidas y entre 440 y 500 nm para las quinolonas anfóteras. Es de importancia remarcar que a medida que aumenta el pH del medio la intensidad de fluorescencia disminuye, hasta el punto que la especie aniónica de las quinolonas no presenta fluorescencia nativa^{60,61}. Las ventajas de estos métodos espectrofluorimétricos respecto de los espectrofotométricos son su mayor sensibilidad y selectividad. Por esta razón, son muchos los métodos espectrofluorimétricos que se han empleado para analizar quinolonas en muestras biológicas. A pesar que las quinolonas presentan fluorescencia nativa, se han desarrollado métodos de análisis basándose en la formación de complejos altamente fluorescentes. Entre los métodos espectrofluorimétricos recogidos en la bibliografía cabe destacar aquellos que utilizan una reacción de complejación con Tb(III)^{62,63} o con Al(III)^{64,65}, produciéndose de esta forma un aumento de la sensibilidad. En la *Tabla I.10* se muestran algunos de los métodos encontrados en la bibliografía, que emplean la medida de fluorescencia para el análisis de quinolonas.

⁶⁰ Sortino S., De Guido G, Giuffrida S., Monti S, Velardita A., *Photochem. Photobiol.*, 67 (1998) 167.

⁶¹ Amin A.S., El-Sayed G.O., Issa Y.M., *Analyst*, 120 (1995) 1189.

⁶² Hernández Arteseros J.A., Compañó R., Prat M.D., *Analyst*, 125 (2000) 1477.

⁶³ Panadero S., Gómez-Hens A., Pérez-Bendito D., *Anal. Chim. Acta*, 303 (1995) 39.

⁶⁴ Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Carpena J., *Analyst*, 122 (1997) 705.

⁶⁵ Stankov M.J., Stankov D., *Anal. Chim. Acta*, 300 (1995) 253.

Tabla I.10. Análisis de quinolonas por espectrofluorimetría.

COMPUESTO	LD	REACTIVO	MATRIZ
ENR ⁶⁶	20 ng/mL		Tejido de ave
NAL ⁶⁷	0.1 µg/mL	γ-CD	Orina
NAL, NOR ⁶⁸	6 y 13 ng/mL	Tb (III)	Suero
NOR ⁶⁹	1 ng/mL	Al (III) y SDS	Suero
NOR ⁷⁰	17 ng/mL	Tb (III)	Suero
NOR ⁷¹	0.4 ng/mL	Al (III) y SDS	Orina
PEF, CIP, NOR ⁷²	0.4-12 ng/mL	Tb (III) y TOPO	Suero
OFL, NOR, CIP, PEF ⁷³	0.2 0.3 ng/mL	Sc (III)	Suero
NAL y metab. ⁷⁴	Identif. simult.	PLS	
LOM ⁷⁵	2.3 ng/mL	Tb (III)	Orina y suero
CIP, ENR ⁷⁶	3.5 µg/kg	Tb (III)	Muslo de pollo
NOR ⁷⁷	3.2 ng/mL	Micelas inversas	Orina y suero
LEV ⁷⁸	3 ng/mL	Tb (III)	Orina y suero
LEV ⁷⁹	10 ng/mL	Directa	Orina y suero
NAL, OXO, PIP, CIN ⁸⁰	50-300 ng/mL	Zn (II) y Al (III)	Orina
CIP ⁸¹	0.1 ng/mL	Fase sólida	Orina y suero

⁶⁶ Waggoner T.B., Bowman M.C., *J. AOAC Int.*, 70 (1987) 813.

⁶⁷ Durán I., Muñoz A., Salina F., Rodríguez M.I., *Analyst*, 119 (1994) 1215.

⁶⁸ Panadero S., Gómez-Hens A., Pérez-Bendito D., *Anal. Chim. Acta*, 303 (1995) 39.

⁶⁹ Djurdjevic P., Stankov M.J., Stankov D., *Anal. Chim. Acta*, 300 (1995) 253.

⁷⁰ Huang, Z., Cai R., Shang K., Huang H., Zeng Y., *Anal. Letters*, 30 (1997) 1531.

⁷¹ Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Carpena J., *Analyst*, 122 (1997) 705.

⁷² Veiopoulou C.J., Ionnou P.C., Lianidou E.S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (1997) 1839.

⁷³ Drakopoulos A.I., Ioannou P.C., *Anal. Chim. Acta*, 354 (1997) 197.

⁷⁴ Durán, I., Muñoz A., Rodríguez M.I., Salina F., *Talanta*, 45 (1998) 899.

⁷⁵ Tieli Z., Huichun Z., Linpe, J., *Talanta*, 49 (1999) 77.

⁷⁶ Hernández-Arteseros J.A., Compañó R., Prat M.D., *Analyst*, 123 (1998) 2729.

⁷⁷ Liu Z., Huang, Z., Cai R., *Analyst*, 125 (2000) 1477.

⁷⁸ Ocaña J.A., Callejón M., Barragán F.J., *Analyst*, 125 (2000) 1851.

⁷⁹ Ocaña J.A., Callejón M., Barragán F.J., *Talanta*, 52 (2000) 1149.

⁸⁰ Durán I., Muñoz A., Salina F., Rodríguez M.I., *Analyst*, 125 (2000) 1471.

⁸¹ Navalón A., Ballesteros O., Blanc, R., Vílchez J.L., *Talanta*, 52 (2000) 845.

C) Métodos mediante cromatografía de gases:

Las quinolonas son sustancias muy polares y no volátiles, que se descomponen por efecto de altas temperaturas, como consecuencia para su análisis mediante cromatografía de gases deben obtenerse previamente derivados volátiles. Todos los métodos propuestos implican la reducción de las quinolonas con NaBH_4 , ya que la esterificación produce compuestos que mantienen su carácter polar⁸². Existen muy pocos artículos describiendo métodos de análisis de quinolonas mediante cromatografía de gases.

D) Métodos electroanalíticos:

La presencia en las quinolonas de un grupo carbonilo adyacente a un grupo carboxilo ha motivado la realización de diversos estudios electroquímicos con esta clase de compuestos. Para el análisis de quinolonas se han utilizado una gran diversidad de técnicas electroquímicas, como son la polarografía clásica de barrido simple (SSP), oscilopolarografía (SSOP), polarografía pulsante diferencial (DPP), voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV), fundamentalmente, en preparados farmacéuticos y en fluidos biológicos. En la *Tabla I.11* se muestran algunos de los trabajos publicados en los últimos años.

E) Métodos electroforéticos:

Una técnica que está teniendo en los últimos años un gran auge es la electroforesis capilar debido a su gran capacidad para separar compuestos. Esto se debe a que los capilares empleados tienen un número mayor de platos que las columnas cromatográficas. Sin embargo, presentan el inconveniente de la detección que es muy poco sensible.

Son varios los artículos publicados en este campo para la determinación de quinolonas. Estos se muestran en la *Tabla I.12*.

⁸² Takatsuki K., *J. Chromatogr.*, 538 (1991) 259.

Tabla I.11. Análisis de quinolonas con métodos electroquímicos.

COMPUESTO	LD	TÉCNICA	MATRIZ
NAL ⁸³	0.77 ng/mL	AdSV	Orina y suero
PIP ⁸⁴	0.76 ng/mL	AdSV	Drogas y orina
CIP ⁸⁵	0.18 µg/mL	AdSV	Orina
NOR, CIN, PIP, OXO, PIR ⁸⁶	0.2-0.3 µg/mL	DPP	Orina, plasma, tabletas
NOR ⁸⁷	0.3 ng/mL	AdSV	Preparados farmacéuticas
NOR ⁸⁸	10 µg/mL	DPP	Preparados farmacéuticas
OFL ⁸⁹	1.2 ng/mL	SSOP	Preparados farmacéuticas
CIN ⁹⁰	1.2 ng/mL	AdSV	Plasma
ENO ⁹¹	1.8 ng/mL	SSP	Orina y suero
OFL ⁹²	15 ng/mL	DPP	Fluidos biológicos
ENR, SPA, FLE ⁹³	30 ng/mL	DPP	Fluidos biológicos
NOR ⁹⁴	1.1 ng/mL	SWV	Orina

⁸³ Ibrahim M., Shehatta I., Sultan M., *Talanta* 56, (2002) 471.

⁸⁴ Telting M., Miranda A., Costa A., Tuñón P., Diamond D., Smyth M., *Analyst*, 115 (1990) 1215.

⁸⁵ O'Dea P., Costa A., Miranda A.J., Tuñón P., Smyth M.R., *Electroanalysis*, 3 (1991) 337.

⁸⁶ Corti P., Corbini G., Gratteri P., Furlanetto S., Pinzauti S., *Int. J. Pharm.*, 111 (1994) 83.

⁸⁷ Jaber A.M.Y., Lounici A., *Analyst*, 119 (1994) 2351.

⁸⁸ Jaber A.M.Y., Lounici A., *Anal. Chim. Acta*, 291 (1994) 53.

⁸⁹ Zhou G., Pan J., *Anal. Chim. Acta*, 307 (1995) 49.

⁹⁰ Gratteri P., Furlanetto S., Pinzauti S., Leardi R., Corti P., *Electroanalysis*, 7 (1995) 1161.

⁹¹ Zhang Z., Li Y., He X., Zhang H., *Talanta*, 43 (1996) 635.

⁹² Rizk M., Belal F., Aly F.A., El-Enany N.M., *Talanta*, 46 (1998) 83.

⁹³ Rizk M., Belal F., Ibrahim F., Ahmed S., El-Enany N.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2000) 211.

⁹⁴ Ghoneim M.M., Radi A., Beltagi A.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 205.

Tabla I.12. Análisis de quinolonas por electroforesis.

COMPUESTO	DETECTOR	LD	MATRIZ
CIP ⁹⁵	UV	0.5 µg/mL	Preparados farmacéuticos
OFL, LEV ⁹⁶	UV	Identificación	Preparados farmacéuticos
CIN, CIP, ENO, FLU, LOM, NAL, NOR, OFL, OXO, PEF, PIP, PIR, ROS, SPA ⁹⁷	UV	Identificación	Preparados farmacéuticos
NOR, CIP, OFL, ENR, DAN ⁹⁸	UV	Identificación	Preparados farmacéuticos
CIN, CIP, ENO, FLU, LOM, NAL, NOR, OFL, OXO, PIR ⁹⁹	DAD	0.1 - 0.5 µg/mL	Plasma
NAL, OXO, PIP, CIN, NOR, CIP, OFL, PEF, FLE, FLU ¹⁰⁰	UV	Identificación	Preparados farmacéuticos
OFL y metabol. ¹⁰¹	FD	0.5 µg/mL	Orina
ENR, CIP ¹⁰²	DAD	10 y 25 µg/kg	Músculo de pollo
DIF, SAR ¹⁰³	DAD	10 y 25 µg/kg	Músculo de pollo
MAR ¹⁰⁴	UV	20 µg/L	Plasma de cerdo

⁹⁵ Altria K.D., Chanter Y.L., *J. Chromatogr. A*, 652 (1993) 459.

⁹⁶ Arai Nimura N., Kinoshita T., *J. Chromatogr. A*, 736 (1996) 303.

⁹⁷ Sun A.W., Chen L.Y., *J. Chromatogr. A*, 766 (1997) 215.

⁹⁸ Schmitt-Kopplin P., Burhenne J., Freitag D., Spiteller M., Kettrup A., *J. Chromatogr. A*, 837 (1999) 253.

⁹⁹ Hernández M., Borrull F., Calull M., *J. Chromatogr. B*, 742 (2000) 255.

¹⁰⁰ Fierens C., Hillaert S., Van den Bossche W., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 763.

¹⁰¹ Horstkötter C., Blaschke G., *J. Chromatogr. B*, 754 (2001) 169.

¹⁰² Barrón D., Jiménez-Lozano E., Cano J., Barbosa J., *J. Chromatogr. B*, 759 (2001) 73.

¹⁰³ Barrón D., Jiménez-Lozano E., Bailac S., Barbosa J., *J. Chromatogr. B*, 767 (2002) 313.

¹⁰⁴ Hernández M., Borrull F., Calull M., *Chromatographia*, 55 (2002) 585.

Tabla I.12. Análisis de quinolonas por electroforesis. (cont.)

COMPUESTO	DETECTOR	LD	MATRIZ
CIP, ENR, FLU ¹⁰⁵	UV	50-85 µg/L	Plasma de cerdo
OXO ¹⁰⁶	UV	80 µg/L	Pescado
CIP, DAN, DIF, MAR, FLU, OXO ¹⁰⁷	UV	50-120 µg/kg	Plasma y Músculo de cerdo
OXO, LOM, NOR, CIP, ENR, FLU, FLE, MOX, OFL ¹⁰⁸	FD	1-50 µg/kg	Plasma, aguas
SAR, CIP ¹⁰⁹	DAD	-	Músculo de pollo
OXO, FLU ¹¹⁰	UV	10-50 µg/kg	Músculo de pollo
CIP y Metabolitos ¹¹¹	UV	0.2-0.7 µg/mL	Preparados farmacéuticos

¹⁰⁵ Hernández M., Borrull F., Calull M., *J. Chromatogr. B*, 772 (2002) 163.

¹⁰⁶ Saad B., Mohamad R., Mohamed N., Lawrence G.D., *Food Chem.*, 78 (2002) 3078.

¹⁰⁷ Hernández M., Borrull F., Calull M., *Electrophoresis*, 23 (2002) 3078.

¹⁰⁸ Ferdig M., Kaleta A., Thanh Vo T.D., Buchberger W., *J. Chromatogr. A*, 1047 (2004) 305.

¹⁰⁹ Beltrán J.L., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Barbosa J., *Anal. Chim. Acta*, 501 (2004) 137.

¹¹⁰ Barron D., Jiménez-Lozano E., Bailac S., Barbosa J., *Anal. Chim. Acta*, 477 (2003) 21.

¹¹¹ Katarzyna M., Genowefa P., Stefan T., *J. Chromatogr. A*, 1051 (2004) 267.

F) Métodos mediante cromatografía líquida de alta resolución:

La separación de quinolonas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realiza usualmente con columnas de fase reversa, principalmente C-18 y C-8, pero en algunas situaciones se han empleado fases fenil y amida. Como consecuencia de la presencia de grupos silanol libres residuales en los empaques de fase reversa, se obtienen picos cromatográficos con notables colas. Una forma de disminuir este fenómeno es emplear columnas con fases estacionarias de alta pureza.

Las fases móviles consisten principalmente de mezclas acetonitrilo-agua, aunque también se han utilizado mezclas ternarias de acetonitrilo-metanol-agua, acetonitrilo-tetrahidrofurano-agua o acetonitrilo-dimetilformamida-agua. El pH de las fases móviles se mantiene en el rango 2-4 con el propósito de reducir la ionización de los grupos silanol y minimizar de ese modo sus interacciones con las quinolonas, las que están presentes en su forma catiónica. Normalmente se añaden aditivos tales como sulfatos de alquilo y sulfonatos de alquilo que forman pares iónicos con los analitos protonados o trietilamina o sales cuaternarias de amonio que compiten con las quinolonas por los grupos silanol residuales, reduciendo de esa forma las colas cromatográficas e incrementando la agudeza de los picos. Para la detección se ha reportado el uso de espectrofotometría de absorción UV-visible, la espectrofluorescencia y la espectrometría de masas. Cuando se emplea la espectrometría de masas como técnica de detección es necesario añadir a las fases móviles, aditivos volátiles tales como el acetato de amonio o los ácidos fórmico, acético o trifluoroacético. En la *Tabla 1.13* se muestran algunos de los trabajos publicados en los últimos años.

Tabla I.13. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

COMPUESTO	DETECTOR	LD	MATRIZ
TEM, SAR, DIF ¹¹²	UV	Identificación	Preparados farmacéuticos
ENR, SAR ¹¹³	FD	5 y 10 µg/kg	Tejido de pescado
ENR, CIP ¹¹⁴	FD	Identificación	Músculo de cerdo y de bovino
DAN ¹¹⁵	ESI-MS/MS	Identificación	Hígado de pollo y de bovino
NOR ¹¹⁶	UV	20 ng/mL	Suero
NOR ¹¹⁷	FD	15 ng/mL	Plasma de rata
DAN, N-DAN ¹¹⁸	FD	1 ng/mL	Tejido de pollo y reses
SAR ¹¹⁹	MS/MS	Identificación	Tejido de pescado
DAN y metabol. ¹²⁰	FD	< 10 ng/g	Tejidos de bovino y pollo
PIP, ENO, NOR, OFL, CIP, LOM, N-DAN, DAN, ENR, SAR, CIN, OXO, NAL, FLU, PIR ¹²¹	MS/MS	0.2-2 ng/mL	Leche, salmón, orina

¹¹² Bauer J.F., Elrod L., Fornnarino J.R., Heathcote D.E., Krogh S.K., Linton C.L., Norris B.J., Quick J.E., *Pharm. Res.*, 7 (1990) 1177.

¹¹³ Hormazabal V., Rogstad A., Steffenak I., Yndestad M., *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 1605.

¹¹⁴ Tarbin J.A., Tyler D.J., Shearer G., *Food Additives Contamin.*, 9 (1992) 345.

¹¹⁵ Schneider R.P., Ericson J.F., Lyncj M.J., Fouda H.G., *Biol. Mass Spectr.*, 22 (1993) 595.

¹¹⁶ Wallis S.C., Charles B.G., Gahan L.R., *J. Chromatogr. B*, 674 (1995) 306.

¹¹⁷ Hussain M.S., Chukwumaeze-Obiajunwa V., Micetich R.G., *J. Chromatogr. B*, 663 (1995) 379.

¹¹⁸ Strelevitz T.J., Linhares M.C., *J. Chromatogr. B*, 675 (1996) 243.

¹¹⁹ Schilling J.B., Cepa S.P., Menacherry S.D., Bavda L.T., Heard B.M., Stockwell B.L., *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1905.

¹²⁰ Strelevitz T.J., Linhares M.C., *J. Chromatogr. B*, 675 (1996) 243.

¹²¹ Volmer D.A., Mansoori B., Locke S.J., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4143.

Tabla I.13. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución. (cont.)

COMPUESTO	DETECTOR	LD	MATRIZ
CIP, ENR, SAR, DIF ¹²²	FD	0.3-1.2 ng/mL	Leche
CIP, DAN, DEC, ENO, ENR, FLU, LOM, MAR, NAL, NOR, OFL, OXO, SAR ¹²³	FD	5-50 µg/kg	Músculo de cerdo, de pollo, huevos, miel
CIP ¹²⁴	UV	10 ng/mL	Orina y plasma
ENR, CIP ¹²⁵	UV	19 y 20 ng/mL	Cerdo y conejo
CIP, DIF, ENR, SAR ¹²⁶	DAD	5 µg/kg	Músculo, hígado y riñón
ENR, CIP ¹²⁷	FD	10 ng/mL	Plasma
DIF, SAR ¹²⁸	FD	12 ng/mL	Plasma de conejo
CIP, DIF, ENR, NOR, MAR ¹²⁹	DAD	50-200 ng/mL	Tejido animal y huevos
CIP, DAN, DIF, ENR, FLU, MAR, NAL, OXO, SAR ¹³⁰	FD	0.5-12 µg/kg	Tejido de pollo

¹²² Roybal J.E., Pfenning A., Turnipseed S.B., Walker C.C., Hurlbut J.A., *J. AOAC Int.*, 80 (1997) 982.

¹²³ Rose M.D., Bygrave J., Stubbings G.W.F., *Analyst*, 123 (1998) 2789.

¹²⁴ Kamberi M., Tsutsumi K., Kotegawa T., Nakamura K., Nakano S., *Clin. Chem.*, 44 (1998) 1251.

¹²⁵ Manceau J., Gicquel M., Laurentie M., Sanders P., *J. Chromatogr. B*, 726 (1999) 175.

¹²⁶ Posyniak A., Zmudzki J., Semeniuk S., Niedzielska J., Ellis R., *Biomed. Chromatogr.*, 13 (1999) 279.

¹²⁷ García M.A., Solans C., Aramayona J.J., Rueda S., Bregante M.A., de Jong A., *Biomed. Chromatogr.*, 13 (1999) 350.

¹²⁸ García M.A., Solans C., Aramayona J.J., Rueda S., Bregante M.A., *Chromatographia*, 51 (2000) 487.

¹²⁹ Gigosos P.G., Revesado P.R., Cadahía O., Fente C.A., Vázquez B.I., Franco C.M., Cepeda A., *J. Chromatogr. B*, 871 (2000) 31.

¹³⁰ Yorke J.C., Froc P., *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 63.

Tabla I.13. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución. (cont.)

COMPUESTO	DETECTOR	LD	MATRIZ
OXO, FLU ¹³¹	UV	0.2 µg/kg	Riñón de pescado
CIP, ENR, SAR ¹³²	FD	1-3 µg/kg	Huevo
OXO, FLU, SAR ¹³³	FD	15, 75 ng/kg	Pescado
ENO, NOR, OFL, CIP ¹³⁴	UV		Plasma y preparados farmaceuticos
CIP, ENR ¹³⁵	DAD	20 µg/kg	Leche
CIP, ENR, SAR, OXO, FLU ¹³⁶	FD	< 5 µg/kg	Tejidos
NAL, FLU, OXO, PIR, DAN, ENR, SAR ¹³⁷	DAD y FD	10-40 µg/kg y 6-50 µg/kg	Pollo, cerdo y pescado
CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU ¹³⁸	DAD	5-10 µg/kg	Músculo de pollo
ENR, CIP, SAR, OXO, FLU ¹³⁹	FD	17-24 µg/kg	Leche
CIP ¹⁴⁰	UV y FD	100, 20 ng/mL	Suero y orina

¹³¹ Touraki M., Ladoukakis M., Prokopiou C., *J. Chromatogr. B*, 751 (2001) 247.¹³² Pak-Sin C., Ro-Chen W., Hifung V.C., *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4452.¹³³ Roudaut B., Yorke J.C., *J. Chromatogr. B*. 780 (2002) 481.¹³⁴ Samanido V.F., Demetriou C.E., Papadoyannis I.N., *Anal. Bioanaly. Chem* 375 (2003) 623.¹³⁵ Cinquina A.L., Roberti P., Gianneti L., Longo F., Draisci R., Fagiolo A., Brizioli N.R., *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 221.¹³⁶ Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H., *J. Chromatogr. B*, 789 (2003) 373.¹³⁷ Su S.C., Chang M.H., Chang C.L., Chang P.C., Chou S.S., *J. Food Drug Anal.*, 11 (2003) 114.¹³⁸ Bailac S., Ballesteros O., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Sanz-Nebot V., Navalón A., Vilchez J.L., Barbosa J., *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004) 145¹³⁹ Claro Ho., Della W.M. Sin, Hubert P.O.T., Lucy P.K.C., Sylvia M.P.S., *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 123.¹⁴⁰ Sowinski K.M., Kays M.B., *J. Clin. Pharm. Thera.*, 29 (2004) 381.

Tabla I.13. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución. (cont.)

COMPUESTO	DETECTOR	LD	MATRIZ
NOR, OFL, CIP, PEF, DAN, ENR, SAR, DIF, LOM ¹⁴¹	FD	5-20 µg/kg	Huevo
ENO, OFL, NOR, CIP, ENR ¹⁴²	DAD	20-200 pg	Tejido, riñón, hígado
MAR, CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU ¹⁴³	UV	9-13 µg/kg	Músculo de cerdo
MAR, CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU ¹⁴⁴	UV, MS MS/MS	7-13 µg/kg, 0.6-1.8 µg/kg, < 0.2 µg/kg	Músculo de cerdo

¹⁴¹ Zeng Z., Dong A., Yang G., Chen Z., Huang X., *J. Chromatogr. B*, 821 (2005) 202.

¹⁴² Samanido V.F., Christodoulou E.A., Papadoyannis I.N., *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 555.

¹⁴³ Hermo M.P., Barrón D., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta*, 539 (2005) 77.

¹⁴⁴ Hermo M.P., Barrón D., Barbosa, J. *Chromatogr. A* 1104 (2006) 132.

CAPÍTULO II

REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

II.1.- INTRODUCCIÓN

II.1.1.- Disoluciones

Se recogen en este apartado todos los reactivos y disoluciones utilizados a lo largo del trabajo experimental llevado a cabo en esta Memoria de Doctorado.

- ✚ **Disoluciones patrón.** Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón correspondiente mostradas en la *Tabla II.1* y posterior disolución en etanol, acetonitrilo o en una mezcla acetonitrilo-agua. Estos compuestos presentan una gran solubilidad y estabilidad en medio acuoso y en medio hidroorgánico, acetonitrilo-agua. Las disoluciones fueron conservadas en botes de cristal ámbar para evitar la acción de la luz y en un refrigerador a 4 °C. Para comprobar la estabilidad de las disoluciones, se hizo un seguimiento periódico del valor de la señal analítica correspondiente y se observó la evolución de ésta con el tiempo. Se comprobó que no existían diferencias superiores al 5% en la señal emitida por las distintas disoluciones durante un periodo de al menos seis meses. En la *Tabla II.1* se muestran los patrones empleados, su grado de pureza, el fabricante y la concentración de la disolución madre.

Tabla II.1. Sustancias patrón.

Patrón	Pureza	Fabricante	C (mg/L)
Ácido oxolínico	≥ 99.0%	Sigma-Aldrich	100
Ciprofloxacina	≥ 99.0%	Lab. Lasa	100
Danofloxacina	≥ 99.0%	Lab. Pfized	100
Difloxacina	≥ 99.0%	Lab. Abbott	100
Enrofloxacina	≥ 99.0%	Lab. Cenavisa	100
Flumequina	≥ 99.0%	Sigma-Aldrich	100
Marbofloxacina	≥ 99.0%	Lab. Vetequinol	100
Norfloxacina	≥ 99.0%	Sigma-Aldrich	100
Sarafloxacina	≥ 99.0%	Lab. Abbott	100

- ❑ **Ácido Oxolínico (OXO):** Ácido 1-etil-1,4-dihidro-6,7-metilendioxi-4-oxo-3-quinolincarboxílico.
- ❑ **Ciprofloxacina (CIP):** Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico.
- ❑ **Danofloxacina (DAN):** Ácido 7-[(1's,4's)-5'-metil-2',5'-diazabicyclo [2.2.1] hept-2'-il]-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico.
- ❑ **Difloxacina (DIF):** Ácido 1-(4-fluorofenil)-6-fluoro-1,4-dihidro-7-(4-metil-1-piperazinil)-4-oxo-3-quinolincarboxílico.
- ❑ **Enrofloxacina (ENR):** Ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico.
- ❑ **Flumequina (FLU):** Ácido 1H,5H-benzo[*ij*]-9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo-quinolizina-2-carboxílico.

- ❑ **Marbofloxacin (MAR):** Ácido 9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7-H-pirido [3,2,1-ij][4,1,2] benzoxadiazin-6-carboxílico
- ❑ **Norfloxacin (NOR):** Ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico.
- ❑ **Sarafloxacin (SAR):** Ácido 1-(4-fluorofenil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico.

Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de éstas por dilución con agua desionizada o con mezcla de acetonitrilo-agua (12:88; v/v).

Otras disoluciones.

- Disolución de ácido *m*-fosfórico 0.3% (m/v).
- Disolución reguladora de ácido *o*-fosfórico/fosfato amónico 50 mM de pH 3. Esta disolución se prepara a partir del ácido *o*-fosfórico concentrado y con amoníaco concentrado.
- Disolución de ácido fórmico al 1% (v/v).
- Disolución de ácido trifluoroacético al 2% (v/v).
- Disolución reguladora de ácido cítrico/citrato amónico 10 mM de pH 4.5. Esta disolución se prepara a partir del ácido cítrico (PA-ACS), se pesa la cantidad adecuada, se disuelve en agua y se ajusta el pH con amoníaco concentrado.
- Disoluciones de HCl y NaOH de diferentes concentraciones preparadas a partir de los reactivos puros (PANREAC).

II.1.2.- Gases empleados

- ✚ **Nitrógeno** AIR LIQUID ALFA Gaz 99.999% de pureza.

II.1.3.- Reactivos y disolventes

- ✚ **Ácido clorhídrico**, 35% y 1.185 g/mL (PANREAC, PRS).
- ✚ **Ácido nítrico**, 60% y 1.38 g/mL (PANREAC, PRS).
- ✚ **Ácido fórmico**, 98% y 1.22 g/mL (PANREAC, PA).
- ✚ **Ácido o-fosfórico**, 85% y 1.70 g/mL (PANREAC, PA).
- ✚ **Ácido m-fosfórico** (PANREAC, PA).
- ✚ **Amoniaco**, 30% y 0.897 g/mL (PANREAC, PRS).
- ✚ **Ácido cítrico anhidro** (PANREAC, PA)
- ✚ **Diclorometano** (PANREAC, PRS).
- ✚ **Metanol** (MERCK, HPLC-gradiente).
- ✚ **Acetonitrilo** (PANREAC, HPLC-gradiente).
- ✚ **Agua desionizada**. Obtenida en el equipo de ósmosis inversa Milli RO 12 Plus (MILLIPORE) acoplado con a un equipo de refinado Milli Q Plus 185 (MILLIPORE). La resistividad del agua fue controlada periódicamente, no bajando en ningún momento el valor de 18 MOhm/cm.

II.2.-MATERIALES DE LABORATORIO, INSTRUMENTACIÓN Y PROGRAMAS

II.2.1.- Material de laboratorio.

- ✚ **Cartuchos de Extracción en fase Sólida:** Isolute Env+, 200 mg de 3 mL de capacidad.
- ✚ **Matraces aforados** (AFORA) clase A, de diferentes capacidades.
- ✚ **Pipetas graduadas y aforadas** (AFORA) clase A de diferentes capacidades.
- ✚ **Micropipetas automáticas** de 10-50 μL (BOECO), 50-200 μL (BOECO y BIBB y STERILIN PIPETTOR), 200-1000 μL , 1-10 mL (BIBBY STERILIN PIPETTOR).
- ✚ **Tubos de centrifugación de plástico con tapón de rosca** de 50 mL de capacidad (AFORA).
- ✚ **Tubos de centrifugación de vidrio graduados:** capacidad 10 mL.
- ✚ **Jeringas de plástico (2 cuerpos)** de 2, 5 y 10 mL de capacidad.
- ✚ **Filtros de jeringa de Nylon** de 0.22 μm y 0.45 μm .
- ✚ **Filtros de jeringa de fluoruro de polivinilideno (PVDF)** de 0.22 μm y 0.45 μm .
- ✚ **Agujas** (MICROLANCE 3) de 0.8 mm-50 mm.
- ✚ **Viales de 7 mL de color ámbar y transparentes** (SUPELCO).
- ✚ **Viales de inyección cromatográfica** (HP) de 2 mL de capacidad transparentes y de color ámbar.
- ✚ **Insertos de cristal** (SUPELCO) de 0.2 y 0.35 mL de capacidad.

- ✚ *Encapsulador de viales cromatográficos* (HP).
- ✚ *Descapsulador de viales cromatográficos* (TECNOKROMA).
- ✚ *Equipo de filtración* (MILLIPORE) provisto de:
 - *Embudo de dos cuerpos para filtros* (MILLIPORE) de 47 mm de diámetro.
 - *Matraz kitasato para vacío* de 500 mL.
- ✚ *Goteros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer, pesa sustancias*, así como otro tipo de material elemental de vidrio que podemos encontrar en cualquier laboratorio analítico.

La limpieza y mantenimiento del material de vidrio empleado a lo largo del trabajo experimental se llevó a cabo con disolución crómica y enjuagando posteriormente con abundante agua desionizada antes de su utilización.

II.2.2.- Instrumentación.

- ✚ *Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100*, provisto de:
 - Muestrador automático (capacidad máxima de 100 muestras).
 - Bomba cuaternaria.
 - Desgasificador de vacío.
 - Compartimento de columna termostaticado.
 - Válvula de inyección de volumen variable (1-100 μ L).
 - Detector de fluorescencia Agilent-1100, provisto de:

- Lámpara de descarga modulada de Xenón de 20 W en modo normal y de 5 W en modo económico.
- Célula de flujo de 8 μ L.
- Monocromadores con intervalos de longitudes de onda de:
 - Excitación: 200 a 700 nm en orden cero.
 - Emisión: 280 a 900 nm en orden cero.
- Rendijas de excitación y emisión de 20 nm.

 **Otros aparatos, instrumentos y materiales.**

- Columna de cromatografía líquida Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m).
- Precolumna Zorbax Eclipse XDB-C8 (12.5 mm x 4.6 mm, 5 μ m).
- Sistema de Extracción en Fase Sólida (SUPELCO VISIPREP) de 12 puestos.
- Sistema de evaporación (SUPELCO) Min-Vap Evaporator/Concetrator.
- Balanzas analíticas (METTLER) AE163, AND GX400 y AND GR-200.
- pH-metro digital (CRISON), modelo MicropH 2000, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.
- pH-metro digital (CRISON), modelo MicropH 2002, provisto de electrodo combinado ORION 8102 Ross.
- Estufa (HEAREUS) 50-300 °C.
- Baño de ultrasonidos (SELECTA) de 1 litro de capacidad.

- Agitador de tubos (HEIDOLPH REAX 2000).
- Placa agitadora-calefactora (HEILDOPH, modelo 2002).
- Centrifugadora (HETTICH Universal 32).
- Placa de evaporación Multi Blok Heater (LAB-LINE) con adaptador para viales de 7 mL.

II.2.3.- Software.

✚ **La recogida y tratamiento de los datos del sistema HPLC-FLD** se ha realizado mediante el programa HP-UX ChemSystem para LC proporcionado por la casa comercial AGILENT TECHNOLOGY.

✚ **Las representaciones gráficas** se han realizado mediante el programa Microsoft Excel 2003, Copyright 1983-2003, Microsoft Corporation (2003).

✚ **Las estructuras químicas** se han dibujado con el programa CS ChemDraw Pro, Cambridge Soft Corporation 1985-2002 (2002).

✚ **Los programas de cálculo utilizados han sido:**

- ✓ *Statgraphics Plus* versión 5.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corporation, USA (2002).
- ✓ *Alamín*¹ (1997).
- ✓ *Microsoft Excel 2003* Copyright 1985-2003, Microsoft Corporation (2003).

✚ **El tratamiento de texto** se ha realizado mediante el programa Microsoft Word 2003, Copyright 1983-2003, Microsoft Corporation (2003).

¹ *García Campaña A.M., Cuadros L., Alés F., Jiménez C., Román M., Sierra J.L., Trends Anal. Chem., 16 (1997) 381.*

II.3.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS.

En este capítulo se resumen las diferentes metodologías empleadas en esta tesis de doctorado para el tratamiento de los datos analíticos. Esta descripción se divide en dos secciones: por una parte el estudio de la etapa de calibración; y por otra parte, los procedimientos de validación aplicados a los diferentes métodos analíticos que se proponen.

II.3.1.- Calibración.

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos. Por tanto, el primer paso en el desarrollo de un método de análisis relativo para obtener la concentración de analito presente en una muestra es la comparación de la medida física con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que llamamos proceso de calibración química.

Es por ello por lo que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo podremos obtener una buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración.

La calibración univariante, usando un modelo lineal, es una de las operaciones más frecuentes en química analítica. Basta pensar en la existencia de una relación de este tipo entre la respuesta medida y la concentración de analito que da lugar a dicha respuesta en el análisis instrumental. Esta relación, se considera del tipo $R = a + bC$ donde R representa la respuesta medida y C la concentración del analito presente. La relación entre R y C podría incluir otros términos, como en el caso de la ecuación $R = a + b_1C + b_{11}C^2$. De este modo no nos tendríamos que restringir únicamente al intervalo recto sino que podríamos extendernos hacia concentraciones más elevadas. Sin embargo, existen diversas razones que justifican la utilización preferente de ecuaciones del tipo lineal.

En primer lugar, existe a menudo un soporte teórico en forma de ley, (ecuación de Lambert-Beer, ecuación de Ilkovich, etc.) que justifica la relación lineal entre la respuesta instrumental y la concentración de analito presente. Si superamos este intervalo y nos adentramos en la parte curvada del modelo matemático, al no tener el fundamento teórico, disminuye la seguridad de que la relación buscada entre señal y concentración no se deba a errores experimentales.

En segundo lugar, cualquier modelo que incluya términos de segundo grado o más elevados, introducen curvaturas en la representación gráfica $R = f(C)$, con lo que a medida que se aumenta la concentración de analito, normalmente se pierde sensibilidad en el análisis y como consecuencia se incrementa notablemente la imprecisión asociada al valor buscado de la concentración del analito.

El proceso de calibración consta de dos etapas:

Etapas de calibración. En ella se establece el modelo que relaciona la variable dependiente, señal analítica, con la variable independiente, concentración.

Etapas de predicción. Consiste en obtener las variables independientes, es decir las concentraciones, de una o más muestras problema a partir del valor obtenido para la variable dependiente. El valor de la variable independiente correspondiente a muestras patrón junto con las sensibilidades, permiten predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

De todos los modelos de regresión, el que ajusta los valores experimentales por medio del algoritmo gaussiano de hacer mínimo el cuadrado de los residuales es el más frecuentemente usado para el establecimiento de la ecuación de la recta de calibrado. La aplicación de este algoritmo implica el cumplimiento de las siguientes condiciones:

- 1) La relación entre la variable independiente y la variable dependiente, concentración y señal analítica, respectivamente, será lineal en todo el rango de aplicabilidad.
- 2) Los errores se tienen que producir únicamente en la medida de la señal instrumental. Esto significa que la variable concentración no debe ser aleatoria, es decir que esté medida sin error o su error aleatorio sea despreciable frente a la respuesta. En la práctica este error se minimiza con el empleo de sustancias patrón.
- 3) Los errores en la respuesta deben presentar una distribución normal, es decir, deben ser independientes entre sí, estar distribuidos por igual y su media sea cero, lo que implica que, para cada concentración de analito, la dispersión de las medidas de la señal analítica debe ser la misma e independiente de dicha concentración. De esta forma, se establece una única desviación estándar, $S_{R,C}$

como representativa de la dispersión de la señal analítica para todo el rango dinámico lineal de concentración de analito, condición esta a la que se denomina *homocedasticidad*.

II.3.1.1.- Recta de calibrado.

La estimación de los parámetros a y b del modelo es la primera operación a realizar, con objeto de obtener la función lineal de calibración. Para ello partimos de una serie de n pares de datos experimentales correspondientes a las concentraciones y señales analíticas, y les aplicamos el método de mínimos cuadrados. Con los datos obtenidos se calculan los valores de la pendiente b y del término independiente a (ordenada en el origen), a partir de las ecuaciones correspondientes:

$$b = \frac{\sum[(R_i - \bar{R})(C_i - \bar{C})]}{\sum(C_i - \bar{C})^2} \quad (1)$$

$$a = \bar{R} - b \cdot \bar{C} \quad (2)$$

donde R_i representa el valor de la señal del instrumento obtenido para una concentración C_i de analito patrón; \bar{R} y \bar{C} son los valores medios del conjunto de señales y concentraciones utilizadas en el calibrado.

Asimismo, se calcula la desviación estándar de regresión de R sobre C , $S_{R,C}$ mediante la ecuación 3:

$$S_{R,C} = \sqrt{\frac{\sum(R_i - R_i^c)^2}{n - 2}} \quad (3)$$

R_i^c es el valor de la señal calculado sobre la recta de regresión correspondiente a la concentración C_i y n es el número total de parejas de puntos utilizados para calcular la recta de regresión. $S_{R,C}$ mide la dispersión de las señales analíticas medidas alrededor de la recta de calibrado ajustada. Un valor de $S_{R,C}$ de cero indicaría que todos los valores medidos están sobre la recta de regresión. Su valor indica el error experimental que afecta a la regresión de los datos y puede considerarse, en primera aproximación una medida de la bondad del ajuste de los datos experimentales a la recta.

La verificación de las hipótesis del modelo en un problema particular es clave para establecer la validez de dicho modelo. En primer lugar se asume la aleatoriedad de la muestra, parámetro controlado por una planificación correcta de la experiencia de calibración. Se asume así mismo la normalidad de los datos.

Para comprobar la tendencia lineal de los datos, en esta tesis se ha optado por la determinación del coeficiente de correlación lineal, r y por la evaluación del fallo de ajuste de los datos homocedásticos al modelo. El test se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales empleadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello, tener más de una réplica de algunas de las parejas de datos. Este test compara el valor del estadístico F , calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste MS_{FA} y al error puro MS_{PE} , con los valores tabulados para un determinado nivel de significación α , fijado en el 5 % y con $k-2$ y $n-k$ grados de libertad, siendo k el número de patrones de calibración diferentes y n el número total de observaciones. Esta condición será evaluada mediante el cálculo del valor P_{lof} del *test de fallo de ajuste*. Si $P \geq 20$ % se concluirá por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

Finalmente, se estudia la *homogeneidad de varianzas* es decir, la condición de homocedasticidad. Para comprobar esta hipótesis, se emplea el análisis gráfico de los residuos, según propone Boqué y Rius², definiendo como residuo la distancia vertical desde cada punto experimental al valor que le correspondería mediante la recta de regresión estimada por mínimos cuadrados. Normalmente se realizan representaciones gráficas de los residuos frente a las respuestas calculadas por el modelo o frente a la variable independiente (concentración). De la observación de estas gráficas, puede evaluarse el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos y detectarse la presencia de valores anómalos, para ello se debe cumplir que sea igual el número de residuos positivos y negativos encontrado, que haya aleatoriedad en la distribución y se obtengan valores similares entre los residuales.

² Boqué R.; Rius F.X.; "Avances en Quimiometría Práctica", Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (1994).

II.3.2.- Validación de un método analítico.

La validación de un método o procedimiento analítico, consiste en demostrar experimentalmente y formalmente su capacidad para la obtención de información analítica que sea útil para los requerimientos de un problema analítico específico. Este concepto de validación está enmarcado dentro de un contexto y definido para un problema analítico particular pero no necesariamente para otros.

La validación implica en primer lugar la verificación de la exactitud de los resultados que genera un método analítico. La exactitud combina dos propiedades complementarias: la veracidad y la precisión de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la mejor precisión se obtiene al minimizar los errores al azar. Para completar la validación de un método de análisis es necesario establecer otras propiedades analíticas de calidad, dentro de las cuales se incluyen: rango lineal, linealidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación³. Dependiendo del método que se ha desarrollado, los parámetros analíticos que van a ser validados pueden variar. A continuación se describen algunos de los parámetros de calidad de un método analítico, así como también las diferentes formas de evaluar la veracidad de un método analítico.

II.3.2.1.- Parámetros de calidad de un método analítico.

Los parámetros de calidad de los métodos de análisis desarrollados y que son presentados en esta tesis fueron los siguientes: linealidad, sensibilidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y el rango dinámico lineal. A continuación se presenta una descripción y formas de cálculos de los mismos.

Linealidad:

La linealidad mide el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado. Habitualmente la linealidad se suele deducir a través de la desviación estándar de los residuales ($S_{R,C}$), o de los coeficientes de correlación (r) y de determinación (R^2), sin embargo valores de r muy próximos a la unidad no indican necesariamente una alta

³ Otto Matthias "Chemometrics". Wiley-VCH, (1999).

calidad de los datos analíticos⁴. *Cuadros y col.*⁵ han reportado el empleo de la desviación estándar relativa de la pendiente, *DER* (*b*), que se calcula por el cociente del valor de la desviación estándar de la pendiente (*S_b*) entre la pendiente (*b*), como medida matemática de la linealidad. De esa forma la linealidad viene dada por la *ecuación 4*, expresada en forma de porcentaje.

$$\text{LIN} = [1 - \text{DER}(b)]100 \quad (4)$$

✚ **Precisión:**

La precisión mide el grado de incertidumbre de los resultados analíticos. Matemáticamente la precisión se expresa por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, (*S_C/C*)·100.

*Cuadros y col.*⁵ han descrito el cálculo de la precisión de las concentraciones de un calibrado, utilizando directamente los valores de las señales correspondientes a cada patrón. Para ello calculan los valores de la desviación estándar de la concentración *S_C*, empleando la *ecuación 5*:

$$S_C = \frac{S_{R,C}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R_i - \bar{R})^2}{b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (5)$$

Donde *S_(R,C)* es la desviación estándar de la regresión; *b* es la pendiente de la recta de regresión; *m* es el número de repeticiones del análisis; *n* es el número total de parejas de valores utilizados para calcular la recta de regresión; \bar{R} es la media aritmética de los valores de señal obtenidos a partir de los *m* análisis; *R_i* es la media aritmética de todos los valores de señal utilizados en el cálculo de la recta de regresión; *C_i* son cada uno de los valores de concentración determinados en el análisis; \bar{C} es la media aritmética de todos los valores de concentración utilizados en el calibrado. El modelo permite representar los datos obtenidos para cada valor de concentración y por interpolación, estimar la precisión para cualquier valor del intervalo de concentraciones del calibrado.

La precisión puede obtenerse bajo dos tipos de condiciones de trabajo:

⁴ *Analytical Methods Committee. Analyst, 113: 1469 (1988).*

⁵ *Cuadros R.L., García C.A., Jiménez L., Román C.M., Anal. Lett, 26 (1993) 1243.*

- a) *Condiciones de repetibilidad*, cuando se obtienen resultados de ensayos independientes aplicando un mismo método a una misma muestra en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos e instrumentos, el mismo operador y en un intervalo corto de tiempo (en un mismo día o dentro de la misma semana).
- b) *Condiciones de reproducibilidad*, cuando se obtienen resultados de ensayos independientes aplicando un mismo método a una misma muestra en distintos laboratorios, o bien con distintos operadores o con distinto equipamiento o en un período de tiempo superior a una semana.

✚ **Límites de detección y cuantificación:**

Varios son los modelos propuestos para calcular el límite de detección de un método analítico instrumental. Para métodos espectroscópicos la IUPAC⁶ recomienda tres veces el valor de la desviación estándar de la señal analítica correspondiente al blanco, obtenida para al menos diez determinaciones, dividida por la pendiente de la recta de calibrado.

$$LD = 3 \cdot S_{R0} / b \quad (6)$$

En aquellas técnicas donde no es posible realizar determinaciones del blanco (cromatografía, voltamperometría, etc.) se puede hacer una estimación del límite de detección estadístico calculando un valor aproximado de desviación estándar a concentración "cero" a partir de la desviación estándar de los residuales, empleando la siguiente ecuación⁷:

$$LD = 3 \cdot \left(\frac{S_{R,C}}{b} \sqrt{\frac{(n-2)}{(n-1)}} \right) \quad (7)$$

El límite de determinación o cuantificación se calcula sustituyendo en la ecuación 6 o en la ecuación 7 el valor 3 por 10.

⁶ IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Spectrochim. Acta B*, 33B (1978) 242.

⁷ Morelli B., *Analyst*, 113 (1988) 1077.

En los métodos cromatográficos se puede obtener el límite de detección a partir del ruido de la señal analítica⁸. La magnitud del ruido se toma como un estimado de la desviación estándar del blanco. En la práctica, el ruido y la señal cromatográfica son medidos manualmente sobre un cromatograma impreso. El límite de detección corresponde a la cantidad de analito para la cual la razón señal/ruido es igual a 3 y el límite de cuantificación corresponde a una razón de 10.

Otra forma de determinar el límite de detección en los métodos cromatográficos es a partir de la desviación estándar de un patrón de nivel preestablecido. Corrientemente se emplea el patrón de menor concentración⁹. Este procedimiento involucra el análisis repetido de la solución patrón. Se considera a ésta desviación estándar equivalente a la del blanco, por lo que el cálculo se finaliza aplicando la *ecuación 6*.

Sensibilidad:

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de calibrado (recomendada por la IUPAC)⁶ mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito y depende de las condiciones instrumentales utilizadas. Se indica por el valor de la pendiente de la recta de calibrado. Según la variación de sensibilidad, la curva de calibración se divide en tres partes¹⁰:

- a) A concentraciones bajas de analito ($S=0$) no es posible detectarlo o determinarlo. La señal corresponde al blanco que es ordenada en el origen. Si el blanco no origina señal, la curva pasa por el origen ($R = 0$ a $C = 0$).
- b) A concentraciones intermedias del analito, la sensibilidad es superior a cero ($S > 0$). Cuando esto ocurre queda acotado el **intervalo dinámico lineal** que tiene como límite inferior al límite de detección. Dentro del mismo pueden diferenciarse tres subzonas. La central, en la que S es constante, es el denominado intervalo lineal, que está acotado por unas regiones en las que S crece y decrece. El límite inferior son las coordenadas del límite de cuantificación. El límite superior del intervalo lineal se establece cuando la desviación de la linealidad ($x'-x''$) se hace igual o mayor que 0.03 veces el

⁸ Vial J., Jardy A., *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2672.

⁹ Baynes R., Bowen J., *J. AOAC Int.*, 78 (1995) 812.

¹⁰ Varcalcel M., "Principios de Química Analítica", Springer (1999).

valor de x' (valor correspondiente a la linealidad); si esta diferencia es superior la concentración está fuera del intervalo lineal.

- c) A concentraciones muy altas de analito, la señal ya no varía con la concentración ($S = 0$), obteniéndose un tramo paralelo (pero de mayor nivel de señal que el inicial).

II.3.2.2.- Evaluación de la veracidad.

La evaluación de la veracidad de un resultado consiste en estimar la concentración del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado¹¹. Ya que es imposible conocer el valor verdadero de una especie química en una muestra, es necesario obtener un valor verdadero convencional o aceptado para emplearlo como valor de referencia; este último puede ser obtenido mediante dos estrategias: empleando un estudio interlaboratorio o un estudio intralaboratorio.

Dentro de un laboratorio están disponibles dos alternativas para demostrar la veracidad de un método analítico: el uso de materiales de referencia y la comparación con métodos de referencia.

Antes de realizar las experiencias necesarias para demostrar la veracidad del método de análisis desarrollado es necesario evaluar si los constituyentes de las muestras sobre las que se aplicará el nuevo método de análisis generan errores sistemáticos constantes o proporcionales sobre la respuesta analítica. Estos efectos pueden demostrarse cuando se comparan rectas de calibrado realizadas en ausencia y presencia de la matriz.

Las interferencias causan un error sistemático constante manifestándose con iguales valores de las pendientes de los calibrados en ausencia o presencia de la muestra y señales más altas (error por exceso) o más bajas (error por defecto) que las esperadas. El error sistemático debido a las interferencias se corrige restando a las medidas la media del blanco (con errores positivos) o bien tomando como origen de coordenada el valor del blanco (con errores negativos).

¹¹ Kellner R., Mermet J., Otto M., Widmer H., "Analytical Chemistry", Wiley-VCH, 1998.

El efecto matriz causa un error sistemático proporcional manifestándose con un cambio de las pendientes de los calibrados en ausencia o presencia de la muestra. Las dos soluciones posibles para reducir el efecto matriz son: 1) Preparar la serie de disoluciones patrón imitando la composición de la muestra, lo que se conoce como *calibración externa* y 2) Preparar la recta de calibrado de forma que todos los patrones contengan muestra y la contengan en la misma cantidad. Este procedimiento se denomina *método de adición de patrón*. Se aplica cuando la matriz es compleja y no puede ser imitada artificialmente. Ninguna de ambas soluciones ofrece garantías totales de que el error sistemático por efecto matriz se haya eliminado por completo, lo que obliga a validar la veracidad de los métodos analíticos mediante el uso de materiales de referencia y/o la comparación con métodos de referencia.

En muchas situaciones es necesario demostrar estadísticamente que existen diferencias entre los calibrados en ausencia o presencia de la muestra. El protocolo estadístico que se aplica en este caso es el test o prueba de comparación de dos rectas de regresión.

✚ *Test de comparación de dos rectas de regresión:*

Esta metodología implica la realización de dos experiencias de calibrado: un calibrado con patrones (*CP*) y un calibrado de adición de patrón (*CA*). A continuación se comparan ambas funciones de calibrado para conocer la existencia o no de diferencias significativas.

Para llevar a cabo la comparación, se realiza inicialmente un test de comparación de las varianzas de los residuos de ambas rectas. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1) *Comparación de las varianzas de ambos calibrados.*

Se comparan mediante un test de *F de Snedecor*. Las hipótesis consideradas en este test son:

<i>Varianzas iguales</i>	$s_1^2 = s_2^2$	$F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$	Hipótesis nula (H_0)
<i>Varianzas distintas</i>	$s_1^2 \neq s_2^2$	$F_{\text{cal}} \geq F_{\text{tab}}$	Hipótesis alternativa (H_1)

Este test compara un valor del estadístico F calculado según la ecuación 8 con un valor tabulado para n_1-2 y n_2-2 grados de libertad, con un nivel de significación del 5%, siendo n_1 y n_2 el número de puntos experimentales de cada una de las funciones de calibrado.

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}; (s_1 > s_2) \quad (8)$$

donde s_1^2 y s_2^2 representan las varianzas de los residuos para ambas rectas de calibrado (con patrones y adición de patrón).

2) Comparación de pendientes.

Se realiza el *test de comparación de pendientes* para comprobar si la adición de patrón provoca un error sistemático constante, o sea que la recta de adición de patrón está desplazada paralelamente respecto a la recta del calibrado con patrones. Para lo cual se realiza el test de la *t-Student*. Se calcula el estadístico t_{cal} para $(n_1 + n_2 - 4)$ grados de libertad. Las hipótesis a tener en cuenta son las siguientes:

<i>Pendientes iguales</i>	$b_1 = b_2$	$t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$	Hipótesis nula (H_0)
<i>Pendientes distintas</i>	$b_1 \neq b_2$	$t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}}$	Hipótesis alternativa (H_1)

Si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos t será calculado según la ecuación 9.

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{b_1}^2}{\sum (c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{s_{b_2}^2}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}} \quad (9)$$

donde s_{b_1} y s_{b_2} representan los valores de la desviación estándar de la pendiente para CP y CA respectivamente.

El valor de t calculado se compara con un valor de t tabulado para un nivel de significación del 5% y f grados de libertad, calculados según la expresión 10.

$$f = \frac{\frac{s_{b_1}^2}{\sum (c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{s_{b_2}^2}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}{\frac{s_{b_1}^2 / \sum (c_1 - \bar{c}_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{s_{b_2}^2 / \sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}{n_2 - 2}} \quad (10)$$

Si no existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{s_{b_{1,2}} \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c}_1)^2} + \frac{1}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}} \quad (11)$$

donde

$$s_{b_{1,2}}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{b_1}^2 + (n_2 - 2)s_{b_2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (12)$$

El valor de t calculado se compara con el valor de t tabulado con (n_1+n_2-4) grados de libertad y con un nivel de significación del 5%, siendo n_1 y n_2 el número de patrones empleados en la preparación de las rectas de calibrado comparadas.

II.3.2.3.- Empleo de materiales de referencia.

Un material de referencia es una sustancia o material que presenta propiedades suficientemente homogéneas, estables y bien establecidas que se emplean con tres propósitos claramente distinguibles: calibración y validación de un equipo, validación y comparación de métodos y control de calidad. El *Comité de Métodos Analíticos* de la *Royal Society of Chemistry*¹² ha clasificado los términos para designar los diferentes materiales de referencia: materiales de referencia certificados, materiales de referencia estándar y materiales de referencia caseros. A continuación, se describen las principales características de estos tres tipos de materiales de referencia.

¹² Analytical Methods Committee, Analyst, 120 (1995) 29.

Materiales de referencia certificados:

Son materiales de referencia que tienen certificados uno o varios valores de sus propiedades (con sus incertidumbres específicas) obtenidos por procedimientos especiales (ej: ejercicio interlaboratorio) bajo la responsabilidad de un organismo competente e independiente. Debe acompañarse de una amplia documentación. Esto significa que los valores certificados proveen la mejor aproximación posible a la verdad y son entonces ideales para evaluar la trazabilidad de un procedimiento analítico particular. El protocolo estadístico utilizado para evaluar la veracidad de un método es la comparación de dos medias independientes (test de student).

Materiales de referencia estándar:

Estos son preparados de constituyentes puros, tal y como una solución estándar preparada para técnicas espectroscópicas y luego empleadas en el análisis de especies químicas específicas. Este tipo de material de referencia es exclusivamente empleado para evaluar el error sistemático cometido durante un proceso de calibración. Un test de student es empleado para determinar la veracidad, comparando la media obtenida en el análisis con el valor verdadero convencional asignado.

Materiales de referencia caseros:

Los laboratorios analíticos pueden preparar sus propios materiales de referencia, asignando valores de concentración convencionales a los analitos. Existen dos situaciones donde se presenta esta posibilidad: 1) Como una etapa previa al establecimiento de la trazabilidad, haciendo posible la evaluación de la veracidad del método analítico sin el uso de un material de referencia certificado y 2) cuando no hay disponibilidad de materiales de referencia certificados. La asignación del valor verdadero aceptado puede llevarse a cabo por tres diferentes vías, produciéndose así tres diferentes materiales de referencia caseros.

Material previamente analizado:

El valor verdadero convencional es determinado mediante el análisis de un material natural o artificial, con el analito presente en la matriz, por uno o más laboratorios independientes empleando, si es posible, diferentes técnicas analíticas o métodos. El valor medio encontrado del análisis del material de referencia casero por el procedimiento que

está siendo validado es comparado con la media obtenida de los análisis previos, usando el *test de la t de student* para dos medias experimentales.

II.3.2.4.- *Materiales sintéticos.*

Un material de referencia puede ser preparado mezclando cantidades predeterminadas de los constituyentes conocidos de un material y en los cuales el analito no este presente. Seguidamente el analito de interés es añadido, lo que permite asignarle un valor verdadero convencional en el material preparado. La principal desventaja de este procedimiento es que en ocasiones no es posible garantizar que la forma química deseada del analito este presente en el material sintético preparado. Un test de student es empleado para determinar la veracidad del método, mediante la comparación de la media obtenida del análisis con el valor verdadero asignado.

✚ *Material fortificado:*

En este caso, un material natural o sintético debe estar disponible de tal forma que tenga una matriz que sea similar o idéntica a la de la muestra y en el cual el analito no este presente; seguidamente cantidades conocidas del analito son añadidas a esta matriz. La incertidumbre asociada al valor asignado está limitado, exclusivamente, al error que pueda cometerse en la adición de la cantidad de analito al material. El uso de este material de referencia casero es conveniente cuando el analito es inestable. El porcentaje de recuperación %R, se calcula dividiendo la cantidad neta encontrada con la cantidad añadida de analito como se indica en la *ecuación 13*.

$$R (\%) = \frac{C_{\text{encontrada}}}{C_{\text{añadida}}} \cdot 100 \quad (13)$$

El protocolo empleado para determinar la veracidad está basado en la aplicación del test de comparación de una media experimental con un valor conocido. En este caso, el valor conocido es 100. El estadístico con n-1 grados de libertad es calculado empleando la *ecuación 14*:

$$t = (\bar{R} (\%) - 100) \cdot \sqrt{\left(\frac{n}{s_{R(\%)}}\right)} \quad (14)$$

En esta ecuación $s_{R(\%)}$ indica la desviación estándar de los n valores de recuperación obtenidos experimentalmente. La hipótesis nula (la recuperación es cercana a 100 y el método es veraz) es aceptada para un nivel de significancia mayor del 5%.

II.3.2.5.- Empleo de métodos de referencia.

Una alternativa al uso de materiales de referencia para la validación de la veracidad de un método analítico es el uso de un método de referencia del cual se conoce que puede aplicarse al mismo tipo de muestras y además está suficientemente evaluado, por ejemplo un método que ha sido previamente validado. Los dos métodos de análisis son aplicados a diferentes alícuotas provenientes de una misma disolución de la muestra. El contenido de analito debe ser apropiado para los requerimientos de cada método. El procedimiento estadístico usado para determinar la veracidad es la comparación de 2 medias independientes (*test de la t de student*).

Para iniciar el protocolo estadístico se evalúa si las desviaciones estándar de los dos métodos difieren o no significativamente. Se emplea la prueba F de Snedecor. Este test compara un valor del estadístico F calculado según la ecuación 15 con un valor tabulado para n_1-1 y n_2-1 grados de libertad, con un nivel de significación del 5%, siendo n_1 y n_2 el número de medidas experimentales de cada uno de los métodos.

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}; (s_1 > s_2) \quad (15)$$

Si no existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S \cdot \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}} \quad (16)$$

Donde t tiene (n_1+n_2-2) grados de libertad y S es la desviación estándar ponderada calculada según la siguiente ecuación:

$$S = \frac{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) \cdot S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (17)$$

Si existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2}} \quad (18)$$

En este caso el *número de grados de libertad* (f) se consigue con la *ecuación 19*:

$$f = \frac{\left[\left(S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2 \right)^2 \right]}{\left[\frac{\left(S_1^2/n_1 \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(S_2^2/n_2 \right)^2}{n_2 + 1} \right]} - 2 \quad (19)$$



CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN TEJIDO DE POLLO



III.1.- INTRODUCCIÓN

El uso de agentes antimicrobianos en animales de consumo humano es un asunto de especial preocupación debido a la posible amenaza para la salud humana, causada por el riesgo de transferencia de bacterias resistentes a antimicrobianos o de genes resistentes a antimicrobianos a través de la cadena alimentaria¹. Algunos investigadores han argumentado que la administración de antimicrobianos a los animales permite la aparición y selección de bacterias resistentes en la cadena alimentaria y que ésta sería la principal causa del incremento de la incidencia de la resistencia a antimicrobianos en humanos. Sin embargo, otros científicos consideran que la resistencia bacteriana a antimicrobianos se debe principalmente al excesivo uso de los mismos en humanos².

Debido a la preocupación de que el uso de quinolonas en los animales de granja podría contribuir a la resistencia en bacterias transmitidas por alimentos (como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.) y que esto, a su vez, podría conducir a una reducción en la eficacia de estos antimicrobianos en el tratamiento de infecciones en humanos, la **Organización Mundial de la Salud** (OMS) convocó una reunión en 1998 sobre el

¹ Threlfall E.J., Ward L.R., Skinner J.A., Rowe B., *Microbial Drug Resistance*, 3 (1997) 263.

² Rankin S.C. *Vet. Rec.*, 143 (1998) 698.

impacto en la salud humana del uso de quinolonas en animales de consumo humano³. Hasta la fecha, no hay muchos datos documentados sobre el impacto en la salud humana del uso de las quinolonas en el ganado pero existe una gran preocupación sobre las potenciales consecuencias sobre la salud humana si esta resistencia se incrementa y extiende. En esa reunión de la OMS se recomendó determinar de la forma más precisa posible el uso de quinolonas fuera de la medicina humana y mejorar las evidencias epidemiológicas sobre como la resistencia tanto en humanos como en animales se desarrolla, persiste y extiende entre los animales y el hombre. También se recomendó determinar los niveles de resistencia a quinolonas en bacterias zoonóticas y definir estrategias para un uso adecuado de estos antimicrobianos en animales con el objeto de maximizar el beneficio terapéutico a la vez que minimizar la amenaza de la resistencia^{3,4}.

La resistencia a ciertos antimicrobianos es más crítica que a otros. Así, la resistencia a las quinolonas es altamente indeseable dado que estos antimicrobianos son altamente eficaces para el tratamiento de algunas enfermedades graves producidas por bacterias multiresistentes en humanos⁵. Así, las quinolonas son usadas en humanos para el tratamiento de un amplio rango de infecciones tales como infecciones complicadas del tracto urinario, infecciones gastrointestinales, enfermedades de transmisión sexual o infecciones pulmonares.

Se han propuesto algunas medidas restrictivas sobre el uso de quinolonas en medicina veterinaria pero generalmente no han sido aplicadas. En 1994, algunos expertos recomendaron a los miembros de la agencia norteamericana de medicamentos y alimentos "**Food and Drug Administration**" que el uso terapéutico de quinolonas en animales fuera permitido siempre y cuando se controlara el uso inadecuado y el desarrollo de resistencias a los mismos⁶. El gobierno japonés ha impuesto 3 restricciones al uso de quinolonas en medicina veterinaria: 1) sólo son prescritas cuando los antimicrobianos de primera elección son infectivos, 2) son administradas sólo por, o bajo la supervisión, de veterinarios y 3) el tratamiento con quinolonas está limitado a un período de 5 días o

³ Organización Mundial de la Salud. *Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Informe de una reunión de la Organización Mundial de la salud, 1998 junio 2-5, Ginebra, Suiza, 1998.*

⁴ *Call for international code on use of antimicrobials in animals [editorial], Vet. Rec., 142 (1998) 706.*

⁵ *Pedersen K.B., Aarestrup F.M., Jensen N.E., Bager F., Jensen L.B., Jorsal S.E., Vet. Rec., 145 (1999) 50.*

⁶ *Food and Drug Administration. FDA panel urges restricted use of fluoroquinolones in animals. ASM News, 60 (1994) 350.*

menos⁷. También la asociación de veterinarios británicos especialistas en avicultura ha publicado unas recomendaciones sobre el uso de antimicrobianos en gallinas, incluyendo un apartado específico sobre el uso de quinolonas⁸. En Europa, el uso de estas sustancias viene regulado por la normativa 2377/90 de la Comunidad Europea, en los anexos I y III, y sus posteriores modificaciones. En esta normativa aparecen las sustancias cuyo uso está regulado y para las que se ha establecido un límite máximo de residuos^{9,10}.

En aves, está permitido por la Unión Europea el uso de las siguientes quinolonas: enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, flumequina y ácido oxolínico. Sin embargo, está prohibido totalmente su uso en aves que produzcan huevos destinados al consumo humano. Para detectar la presencia de una o varias de estas quinolonas en tejido de pollo y establecer si la concentración está por encima o por debajo del LMR es necesario el desarrollo de una metodología analítica suficientemente sensible y con capacidad para identificar las posibles quinolonas presentes. Por esta razón, se ha desarrollado un método por cromatografía líquida con detección fluorescente para la separación y cuantificación de las anteriores quinolonas junto con la ciprofloxacina como uno de los residuos marcadores de la enrofloxacin empleando la norfloxacina como patrón interno.

⁷ Nakamura S., *Drugs*, 49 (1995) 152.

⁸ Thorp B., McMullin P.F., *Vet. Rec.*, 143 (1998) 203.

⁹ Reglamento CEE núm. 2377/90 del consejo, de 26 junio 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 18 agosto 1990 (L224) 2608.

¹⁰ The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Veterinary medicine and Inspections. MRL assessments in the context of Council Regulation 2377/90*, EMEA/CVMP/765/99-Rev 10, 12 July 2002, <http://www.emea-eu.int>.

III.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE UNA MEZCLA DE QUINOLONAS

III.2.1.- Fundamentos de la técnica

En cromatografía líquida de alta resolución son varias las variables que influyen en la separación de una mezcla de analitos, como son el tipo de columna, la naturaleza de la fase orgánica, composición y pH de la fase móvil, naturaleza de los compuestos empleados para regular el pH, así como, la naturaleza de otras sustancias que se adicionan a la fase móvil. En este Capítulo se va a desarrollar la metodología que se ha empleado para optimizar la composición (porcentaje de acetonitrilo) y pH de la fase móvil con el objetivo de separar una mezcla de quinolonas (norfloxacina -patrón interno-, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina, difloxacina, ácido oxolínico y flumequina) previamente seleccionadas.

La columna seleccionada para el estudio fue una columna Eclipse XDB C₈ con una precolumna de la misma composición. Como fase móvil se utilizó una mezcla acetonitrilo y disolución reguladora citrato amónico/ácido cítrico. Se ha empleado amoniaco para ajustar el pH de la fase móvil. La selección tanto de la columna como de la fase móvil se ha realizado teniendo en cuenta resultados previos realizados por nuestro grupo de investigación.

III.2.2.- Optimización de la fase móvil

III.2.2.1.- Introducción

Debido a la capacidad de separación y amplio campo de aplicación que tiene la cromatografía de líquidos, ya que solo requiere que el soluto sea soluble en la fase móvil, es actualmente una de las técnicas analíticas de mayor potencialidad práctica. Por otra parte, su aplicación permite la estimación de diferentes propiedades de los solutos. Razón por la cual encontramos un gran número de publicaciones en la bibliografía que estudian la dependencia de la retención de los solutos en cromatografía líquida con las condiciones experimentales en las que se lleva a cabo la separación.

La retención en cromatografía de líquidos implica un proceso de transferencia de un soluto de la fase móvil a la fase estacionaria. Por tanto, la retención es una función

compleja que depende del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria. Idealmente, el conocimiento del mecanismo de este proceso permitiría la predicción del tiempo de retención de los solutos, el desarrollo y racionalización de procedimientos de optimización para la separación cromatográfica de familias de sustancias, el desarrollo de columnas con características de retención específicas, la predicción de propiedades del soluto como su hidrofobicidad, etc.

Sin embargo, los parámetros de retención no nos dan ninguna información acerca del propio mecanismo de retención, es decir, de cómo las moléculas se distribuyen entre ambas fases. De modo que los estudios sobre la retención de los solutos deberían incluir medidas físicas de la fase estacionaria, de la fase móvil o una combinación de ambas.

A pesar del gran número de estudios que han abordado el establecimiento de teorías capaces de explicar la retención en cromatografía de líquidos en fase inversa^{11,12,13,14,15,16}, nuestro conocimiento acerca de los procesos de retención de los solutos es todavía incompleto. Existe una serie de puntos fundamentales que no han sido suficientemente aclarados: si la retención de los solutos puede describirse como un proceso de partición, de adsorción o una combinación de ambos; cuál es la naturaleza de las fuerzas de interacción que predominan en la retención cromatográfica de los solutos; y cuál es la estructura de las fases, tanto de la fase estacionaria como de la fase móvil, entre las que tiene lugar la separación.

Un gran número de investigaciones se ha centrado en el estudio de la estructura y naturaleza de las fases estacionarias en cromatografía de líquidos en fase inversa, principalmente en las más comúnmente utilizadas que son las consistentes en sustratos de sílice a los que se unen cadenas alquílicas de mayor o menor longitud (C₈, C₁₈, ...). Según algunos estudios^{11,12,13}, el hecho de que en la retención predominen mecanismos de distribución del soluto entre las fases móvil y estacionaria o mecanismos de adsorción del soluto sobre la superficie de la fase estacionaria está estrechamente relacionado con la configuración física de las cadenas alquílicas apolares que constituyen la fase

¹¹ Horváth C., Melander W., Molnár I., *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 129.

¹² Melander W.R., Horváth C., Horváth C. (editor), "High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives", vol. 2, Academic Press, New York, 1980.

¹³ Dill K.A., *J. Phys. Chem.*, 91 (1987) 1980.

¹⁴ Dorsey J.G., Dill K.A., *Chem. Rev.*, 89 (1989) 331.

¹⁵ Álvarez-Zepeda A., Barman B.N., *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1978.

¹⁶ Martire D.E., Boehm R.E., *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 1045.

estacionaria. Según estos trabajos, en fases móviles con una alta proporción de agua las cadenas alquílicas hidrofóbicas de la fase estacionaria adoptan una configuración "rígida" de manera que se minimiza su superficie de contacto con la fase móvil polar. Así dispuesta la fase estacionaria, las moléculas de soluto sólo pueden ser adsorbidas sobre las cadenas alquílicas rígidas y no se ven sometidas a procesos de partición o distribución. Por otra parte, cuando la concentración de modificador orgánico en la fase móvil es elevada, las cadenas alquílicas de la fase estacionaria adoptan una configuración "extendida" de manera que existe solvatación por parte de los componentes de la fase móvil, y las moléculas de soluto pueden penetrar y estar sometidas tanto a procesos de partición como de adsorción. Sin embargo, en otra serie de estudios^{17,18,19} se ha demostrado que las cadenas alquílicas de la fase estacionaria (C₄-C₂₀) no tienen una estructura rígida y que presentan un comportamiento similar al de los líquidos incluso en estado sólido⁹⁻¹⁰. Además, como la densidad de las cadenas alquílicas sobre el soporte de sílice es muy baja (2-3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$), presentan una gran movilidad e incluso a elevadas concentraciones de agua en la fase móvil las moléculas de soluto pueden penetrar fácilmente en la fase estacionaria y producirse tanto fenómenos de adsorción como de partición¹⁹.

Se han intentado aproximaciones al conocimiento del efecto que produce un cambio en la proporción de modificador orgánico de la fase móvil en la retención en cromatografía de líquidos en fase inversa. El conocimiento de esta relación para un amplio número de solutos y de condiciones cromatográficas podría ser de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de retención en fase inversa. Además, las variaciones en la proporción de modificador orgánico en la fase móvil dan como resultado cambios significativos en la selectividad cromatográfica, por lo tanto, un mejor conocimiento de la relación existente entre retención y proporción de disolvente orgánico resultará en un mejor y más efectivo conocimiento de la fuerza elutrópica de los disolventes, lo que puede ser útil a la hora de desarrollar procesos de optimización de separaciones en cromatografía de líquidos. Por otra parte, los parámetros de retención en fase inversa han sido utilizados para estimar el valor del coeficiente de partición octanol/agua ($\log P_{o/w}$), coeficiente que se ha utilizado para medir la hidrofobicidad de los compuestos y que está relacionado con su actividad

¹⁷ Albert K., Pfeleiderer B., Bayer E., in D.E. Leyden and W.T. Collins (Editors), "Chemically Modified Oxide Surfaces (Chemically Modified Surfaces, vol. 3)", Gordon and Breach, New York, 1990, 233.

¹⁸ Albert K., Bayer E., J. Chromatogr., 544 (1991) 345.

¹⁹ Schure M., Pesek J.J., Leigh I.E. (Editors), "Chemically Modified Surfaces", Royal Society of Chemistry, 1994.

biológica y farmacológica²⁰. Estos procedimientos implican extrapolaciones de valores de retención en agua pura y, por lo tanto, el conocimiento de cómo varía la retención cromatográfica con el tanto por ciento de modificador orgánico es fundamental para esta aplicación.

Se han propuesto ecuaciones, tanto empíricas como teóricas^{21,22,23,24,25}, que describen la retención cromatográfica como función del porcentaje de disolvente orgánico en fases móviles hidroorgánicas para solutos tanto polares como apolares. En todas estas teorías la retención cromatográfica se mide mediante el factor de retención (k), que se define como la relación entre el número de moles de soluto asociados a la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil. Un aumento en el contenido de disolvente orgánico en la fase móvil produce, normalmente, una disminución en la retención de los solutos, es decir, en el valor del factor de retención. Una de las expresiones más sencillas, y más aproximadas, que se ha empleado para relacionar retención y proporción de disolvente orgánico en la fase móvil es²²:

$$\ln k = \ln k_w - S \varphi \quad (1)$$

donde φ es la fracción de volumen de modificador orgánico; k es el factor de retención de un soluto a una determinada composición de la fase móvil (φ); k_w es el valor del factor de retención cuando la fase móvil es agua pura ($\varphi = 0$); y S es constante para un soluto en un determinado sistema de cromatografía líquida en fase inversa. La aplicación de la ecuación 1 queda restringida a un intervalo muy limitado de φ ya que las representaciones de $\ln k$ frente a φ presentan una pronunciada curvatura. Esta curvatura es especialmente importante cuando se trabaja con solutos básicos y catiónicos, y cuando $\varphi > 0.5$. Esto suele ser debido a que los compuestos básicos interaccionan con los grupos silanol residuales de la fase estacionaria^{26,27}. Los datos que aparecen en la bibliografía sugieren que la ecuación 1 es una buena aproximación cuando se utiliza metanol o tetrahidrofurano como disolvente, ya que en ambos casos se obtienen coeficientes de regresión lineal para las representaciones de $\ln k$ frente a φ superiores a 0.98. Sin

²⁰ Lambert W.J., *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 469.

²¹ Dolan J.W., Gant J.R., Snyder L.R., *J. Chromatogr.*, 165 (1979) 31.

²² Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R., *J. Chromatogr.*, 165 (1979) 3.

²³ Geng X.D., Regnier F.E., *J. Chromatogr.*, 296 (1984) 15.

²⁴ Geng X.D., Regnier F.E., *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 147.

²⁵ Johnson B.P., Khaledi M.G., Dorsey J.G., *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2354.

²⁶ Stadalius M.A., Berus J.S., Snyder L.R., *LC-GC*, 6 (1988) 495.

²⁷ Cox G.B., *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 353.

embargo, cuando se utiliza acetonitrilo como componente orgánico de la fase móvil se observa una mayor curvatura en las representaciones de $\ln k$ frente a ϕ y sólo se obtienen coeficientes de regresión lineal entre 0.8 y 0.9^{25,28,29,30,31,32,33,34}.

También se han intentado aproximaciones al conocimiento del efecto de la fase móvil en la retención cromatográfica aplicando teorías basadas en parámetros de solubilidad²²⁻²⁵ de las que se ha derivado la siguiente relación entre k y ϕ :

$$\ln k = A \phi^2 + B \phi + \ln k_w \quad (2)$$

donde A y B son constantes para un soluto dado en un determinado sistema de cromatografía líquida en fase inversa, y k_w el factor de retención cuando la fase móvil es agua. El modelo a partir del cual se deriva la *ecuación 2* asume que las interacciones disolvente-soluto en disolución son determinantes en la retención, y esto a su vez implica que la retención cromatográfica es debida más a un proceso de partición que de adsorción sobre la fase estacionaria. Como era de esperar, la *ecuación 2* proporciona un mejor ajuste de los datos experimentales de $\ln k$ frente a ϕ que la *ecuación 1*³³ ya que incorpora un término adicional. Además, una ecuación cuadrática, como es la *ecuación 2*, se ajusta mejor a la curvatura que presentan los datos experimentales de $\ln k$ frente a la proporción de modificador orgánico.

En otros trabajos^{35,36,37,38} se ha comparado la aplicabilidad de estos y otros modelos que relacionan la retención cromatográfica con la proporción de modificador orgánico en la fase móvil, pero los resultados obtenidos han sido contradictorios lo que sugiere que ninguna ecuación sencilla proporciona ajustes adecuados de k y ϕ para unas determinadas condiciones experimentales³¹.

²⁸ Schoenmakers P.J., Billie H.A.H., De Galan L., *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 179.

²⁹ Dondi F., Kahis Y.D., Lodi G., Blo G., Pietrogrande C., Reschiglian R., *J. Chromatogr.*, 461 (1989) 281.

³⁰ Jandera P., Colin H., Guiochon G., *Anal. Chem.*, 54 (1982) 435.

³¹ Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., De Galan L., *Chromatogr.*, 15 (1982) 205.

³² Jandera P., *J. Chromatogr.*, 314 (1984) 13.

³³ Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., de Galan L., *J. Chromatogr.*, 282 (1983) 107.

³⁴ Schoenmakers P.J., Tijssen R., *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 577.

³⁵ Melander W.R., Horváth C., *Chromatogr.*, 18 (1984) 353.

³⁶ Saddlej-Sosnowska N., Sledzinska I., *J. Chromatogr.*, 595 (1992) 53.

³⁷ Geng X.D., Bian L.J., *Chin. Chem. Lett.*, 1 (1990) 135.

³⁸ Geng X.D., Bian L.J., *Sci. China*, 35B (1992) 262.

Uno de los modelos más ampliamente utilizados para tratar de explicar los procesos de retención en cromatografía de líquidos en fase inversa es el basado en la teoría solvofóbica, propuesta por **Sinanoğlu**³⁹ y aplicada por **Melander y Horváth** a la retención cromatográfica^{1,2,40,41}. Según esta teoría el mecanismo de retención estaría gobernado por las fuerzas de repulsión entre la fase móvil y los solutos más que por la afinidad entre soluto y fase estacionaria. La retención cromatográfica implica la transferencia del soluto desde la fase móvil a la fase estacionaria, de manera que la energía libre total necesaria en este proceso de transferencia representa un balance entre las interacciones soluto-disolvente y las interacciones disolvente-disolvente, es decir, que depende de la energía necesaria para separar las moléculas de disolvente de la fase móvil y crear en él una cavidad para albergar al soluto. La teoría solvofóbica se basa en la premisa de que la formación de esta cavidad en la fase móvil es el proceso más relevante en la retención cromatográfica mientras que la fase estacionaria no juega un papel muy activo en la separación. Sin embargo, a pesar de que la teoría solvofóbica ha sido ampliamente utilizada, en estudios recientes se ha demostrado que no es del todo correcta ya que no es capaz de explicar los procesos de transferencia de energía libre desde la fase móvil hidroorgánica a la fase estacionaria para solutos polares y apolares^{42,43,44}. Para solutos no polares se ha demostrado que la retención no está gobernada por las interacciones en la fase móvil hidroorgánica, tal como indica la teoría solvofóbica, sino por las fuerzas de atracción entre grupos no polares de los solutos y la fase estacionaria apolar. Estas fuerzas de atracción presentan mayor contribución a la energía libre total de transferencia del soluto de la fase móvil a la fase estacionaria que las fuerzas de repulsión solvofóbicas en la fase móvil. Por otra parte, en los procesos de retención cromatográfica de solutos polares intervienen, además de la energía necesaria para crear una cavidad para el soluto en la fase móvil, interacciones dipolares (dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido) e interacciones por enlaces de hidrógeno que se establecen entre los grupos funcionales polares de los solutos y los componentes de la fase móvil. En este caso queda claro que las interacciones de los grupos funcionales polares de los solutos son mayores con los componentes de la fase móvil que con la fase estacionaria apolar y, por tanto, la retención cromatográfica estará gobernada por las interacciones entre solutos y fase móvil.

³⁹ Sinanoğlu O., in B. Pullman (Editor), "In Molecular Associations in Biology", Academic Press, New York, 1968.

⁴⁰ Horváth C., Melander W., Molnár I., *Anal. Chem.*, 49 (1977) 142.

⁴¹ Horváth C., Melander W., *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 393.

⁴² Cheong W.J., Carr P.W., *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 373.

⁴³ Carr P.W., Li, Dallas A.J., Eikens D.I., Tan L.C., *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 113.

⁴⁴ Carr P.W., Tan L.C., Park J.H., *J. Chromatogr. A*, 724 (1996) 1.

Con el objetivo de entender mejor y con más detalle qué tipo de interacciones existe entre los solutos y las fases, tanto estacionaria como móvil, en cromatografía de líquidos en fase inversa se ha aplicado la metodología de las Relaciones Lineales de Energía de Solvatación (*Linear Solvation Energy Relationships*, LSER). La metodología LSER permite relacionar el valor de una propiedad determinada de un soluto con las propiedades del medio con el que interacciona. De acuerdo con esta metodología una propiedad del soluto (SP), que dependa de las interacciones soluto-disolvente, puede expresarse en función de varios términos correspondientes a contribuciones de energía libre diferentes^{45,46,47}:

$$SP = SP_0 + C + D + E \quad (3)$$

donde C es el término de cavidad; D, es el término de dipolaridad; y E, es el término de enlaces de hidrógeno. El término de cavidad mide la energía necesaria para separar las moléculas de disolvente y crear en él una cavidad para el soluto. Este término depende del volumen molar del soluto y de la energía necesaria para romper los enlaces entre las moléculas del disolvente. El término de dipolaridad representa la energía de polarización soluto-disolvente y mide el efecto de las posibles interacciones dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido. Este término depende del parámetro π^* del disolvente y del parámetro π^* del soluto, parámetro que evalúa la dipolaridad/polarizabilidad y es una medida de la capacidad para estabilizar una carga o dipolo⁴⁸. Por último, el término de enlaces de hidrógeno mide la influencia de las interacciones entre solutos con capacidad aceptora de enlaces de hidrógeno y disolventes con capacidad donora de enlaces de hidrógeno, y/o de las interacciones entre solutos con capacidad donora de enlaces de hidrógeno y disolventes con capacidad aceptora de enlaces de hidrógeno. Los parámetros que miden la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno son: α , que mide la capacidad donora de enlaces de hidrógeno⁴⁹; y β , que mide la capacidad aceptora de enlaces de hidrógeno⁵⁰. Los parámetros π^* , α y β son llamados parámetros solvatocrómicos ya que dan idea de las características de los disolventes basándose en la variación de la longitud de onda del máximo de absorción en la región del espectro del ultravioleta-visible de ciertos

⁴⁵ Sadek P.C., Carr P.W., Doherty R.M., Taft R.W., Abraham M.H., *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2971.

⁴⁶ Kamlet M.J., Doherty R.M., Abboud J.M., Abraham M.H., Taft R.W., *J. Pharm. Sci.*, 75 (1985) 2971.

⁴⁷ Cheong W.J., Carr P.W., *Anal. Chem.*, 61 (1989) 1524.

⁴⁸ Kamlet M.J., Abboud J.L., Taft R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 6027.

⁴⁹ Taft R.W., Kamlet M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 2886.

⁵⁰ Kamlet M.J., Taft R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 377.

compuestos estándar sensibles al disolvente en estudio.

Cuando se aplica la metodología LSER a la retención cromatográfica, la propiedad SP corresponde al logaritmo del factor de retención ($\log k$) y la expresión anterior puede escribirse como⁴⁷:

$$\log k = (\log k)_o + \frac{m(\delta_s^2 - \delta_m^2)\bar{V}_2}{100} + s(\pi_s^* - \pi_m^*)\pi_2^* + a(\beta_s - \beta_m)\alpha_2 + b(\alpha_s - \alpha_m)\beta_2 \quad (4)$$

donde $(\log k)_o$ es el término independiente; m , s , a y b los coeficientes de correlación; \bar{V}_2 el volumen molar del soluto, que se multiplica por 1/100 para que los valores de este término sean comparables al resto; δ es el parámetro de solubilidad de Hildebrand, indicativo de la energía de enlace entre las moléculas del disolvente; y π^* , α y β son los parámetros solvatocrómicos de **Kamlet y Taft**. Los subíndices s y m se refieren a la fase estacionaria y a la fase móvil, respectivamente, y el subíndice 2 se utiliza para designar propiedades del soluto. En la *ecuación 4*, que constituye la base del método LSER, cada una de las propiedades del soluto está multiplicada por un término que representa la diferencia entre las propiedades de las dos fases, móvil y estacionaria, e indica que es la diferencia en las propiedades de estas dos fases lo que influye en la retención cromatográfica.

La metodología LSER se ha aplicado a la evaluación y racionalización de las diversas interacciones soluto-fase estacionaria y soluto-fase móvil que afectan a la retención en cromatografía líquida. Si se estudia la retención de un único soluto en una columna determinada y se varía la composición de la fase móvil, los términos que dependen del soluto y de la estacionaria permanecen constantes y se pueden incluir en el término independiente y en los coeficientes de correlación. En ese caso la *ecuación 4* se reduce a:

$$\log k = (\log k)_s + m_2\delta_m^2 + s_2\pi_m^* + a_2\beta_m + b_2\alpha_m \quad (5)$$

donde $(\log k)_s$ depende de $(\log k)_o$ y de parámetros de la fase estacionaria y del soluto, y m_2 , s_2 y b_2 dependen de parámetros del soluto. Para hacer esta simplificación ha sido necesario suponer que las propiedades de la fase estacionaria no varían al modificar la composición de la fase móvil, aunque se sabe que la fase estacionaria esta parcialmente solvatada por la fase móvil. Esto significa que el disolvente menos polar del eluyente se

acumula en la superficie apolar de la fase estacionaria formando una capa de fase móvil rica en el disolvente menos polar. Por tanto, las propiedades solvatocrómicas de la fase estacionaria varían al variar la composición del eluyente y los solutos polares pueden interactuar con la fase estacionaria por interacciones de tipo dipolar o por formación de enlaces de hidrógeno^{25,44,47,51}. Los parámetros de solubilidad de Hildebrand se conocen para muchos disolventes puros, pero no han sido determinados para mezclas binarias agua-disolvente orgánico. Suponiendo que existe una relación entre δ_m^2 y π_m^* , y posiblemente con α_m y β_m , la ecuación 5 puede simplificarse a:

$$\log k = (\log k)_s + s_2' \pi_m^* + a_2' \beta_m + b_2' \alpha_m \quad (6)$$

donde el superíndice ' indica la dependencia del término independiente y de los coeficientes con la correlación de δ_m^2 y π_m^* , α_m y β_m para la fase móvil estudiada. La ecuación 6 puede utilizarse para predecir la retención de los solutos en función de las características de polaridad y capacidad donora y aceptora de puentes de hidrógeno de diferentes mezclas agua-disolvente orgánico utilizadas como eluyente; así como para comprobar cuál o cuáles de estas características solvatocrómicas tienen mayor influencia en la retención cromatográfica^{52,53,54,55,56}. Las correlaciones que se establecen entre la retención cromatográfica de los solutos en una determinada columna y las variaciones en la composición de la fase móvil serán útiles a la hora de predecir el orden de elución y prever la retención de los compuestos considerados para cualquier composición de la mezcla eluyente, así como para predecir la composición óptima de la fase móvil a utilizar en la separación de las sustancias en estudio.

Se han descrito diversas escalas empíricas de polaridad de los disolventes, tanto puros como mixtos, basadas normalmente en medidas cinéticas y espectroscópicas^{57,58,59}. Para el desarrollo de estas escalas se estudia el efecto de los disolventes en determinadas reacciones químicas, o su influencia en algunas propiedades espectroscópicas de una serie

⁵¹ Jones J.L., Rutan S.C., *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1318.

⁵² Rosés M., Bosch E., *Anal. Chim. Acta*, 274 (1993) 147.

⁵³ Barbosa J., Bergés R., Sanz-Nebot V., *J. Liq. Chromatogr.*, 18 (1995) 3445.

⁵⁴ Barrón D., Pascual J.A., Segura J., Barbosa J., *J. Chromatogr.*, 41 (1995) 573.

⁵⁵ Barbosa J., Bergés R., Sanz-Nebot V., *J. Chromatogr. A*, 719 (1996) 27.

⁵⁶ Barbosa J., Sanz-Nebot V., Toro I., *J. Chromatogr. A*, 725 (1996) 249.

⁵⁷ Reichardt C, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 4 (1965) 29.

⁵⁸ Griffiths T.R., Pugh D.C., *Coord. Chem. Rev.*, 29 (1979) 129.

⁵⁹ Reichardt C, "Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988.

de indicadores. Una de las escalas de polaridad de los disolventes más utilizada es la escala de polaridad de **Dimroth y Reichardt** descrita por el parámetro $E_T(30)$, que se basa en el desplazamiento de la longitud de onda de absorción del 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-(piridinio)fenolato (ET-30), también conocido como betaína de Dimroth y Reichardt. Esta molécula tiene un máximo de absorción a 453 nm en agua, un disolvente muy polar, y un máximo a 810 nm en difeniléter, un disolvente apolar, de manera que presenta un desplazamiento solvatocrómico muy amplio y muy sensible a los cambios de polaridad y al carácter donador de enlaces de hidrógeno del medio, esto último debido a la localización de la carga negativa en el átomo de oxígeno fenólico. La escala de polaridad de Dimroth y Reichardt descrita por el parámetro $E_T(30)$, o por el parámetro normalizado E_T^N , es una medida de la polaridad de los disolventes. Es sensible tanto a los cambios en la dipolaridad/polarizabilidad (π^*) como a los cambios en la capacidad donora de puentes de hidrógeno (α) de los disolventes^{60,61,62}.

Se han establecido correlaciones entre el parámetro de Dimroth y Reichardt normalizado, E_T^N ⁵⁹, más adecuado para poder utilizar unidades del mismo orden que para el resto de parámetros, y los parámetros α y π^* ⁶⁰ del tipo:

$$E_T^N = 0.009 + 0.415 \pi^* + 0.465 \alpha \quad (7)$$

n = 40 r = 0.984

En esta correlación puede observarse que el parámetro E_T^N es igualmente sensible a la polaridad (π^*) y a la capacidad donora de puentes de hidrógeno (α), por lo tanto, es de esperar que exista una buena correlación entre $\log k$ y el parámetro E_T^N teniendo en cuenta que la ecuación 6 puede simplificarse, obteniéndose la relación lineal:

$$\log k = C + e E_T^N \quad (8)$$

La ecuación 8 ha sido utilizada para relacionar el logaritmo del factor de retención de diferentes solutos con el parámetro de polaridad E_T^N de diferentes mezclas agua-disolvente orgánico (acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano e isopropanol) utilizadas como fase móvil^{25,56,61,63,62,63,64} obteniéndose coeficientes de regresión lineal entre $\log k$ y

⁶⁰ Kamlet M.J., Abboud J.L.M., Taft R.W., *Prog. Phys. Org. Chem.*, 13 (1981) 485.

⁶¹ Park J.H., Jang M.D., Kim D.S., Carr P.W., *J. Chromatogr.*, 513 (1990) 107.

⁶² Michels J.J., Dorsey J.G., *J. Chromatogr.*, 457 (1988) 85.

⁶³ Ying P.T., Dorsey J.G., *Talanta*, 38 (1991) 237.

⁶⁴ Hsieh M.M., Dorsey J.G., *J. Chromatogr.*, 631 (1993) 63.

E_T^N superiores a 0.99. El hecho de que exista una relación lineal entre la retención de un soluto en una columna cromatográfica determinada y la polaridad de la fase móvil, representada por el parámetro E_T^N , supone una importante mejora en los procesos de optimización de la proporción de modificador orgánico en la fase móvil a utilizar en la separación de una serie de compuestos. Una vez verificada esta linealidad, en principio, sólo serán necesarios dos valores experimentales de k para cada compuesto en dos fases móviles con diferentes proporciones de disolvente orgánico, y sus correspondientes valores del parámetro de Dimroth y Reichardt, para poder predecir la retención de los solutos en estudio en fases móviles con cualquier proporción de modificador orgánico, y comprobar así en qué fase móvil la separación será óptima.

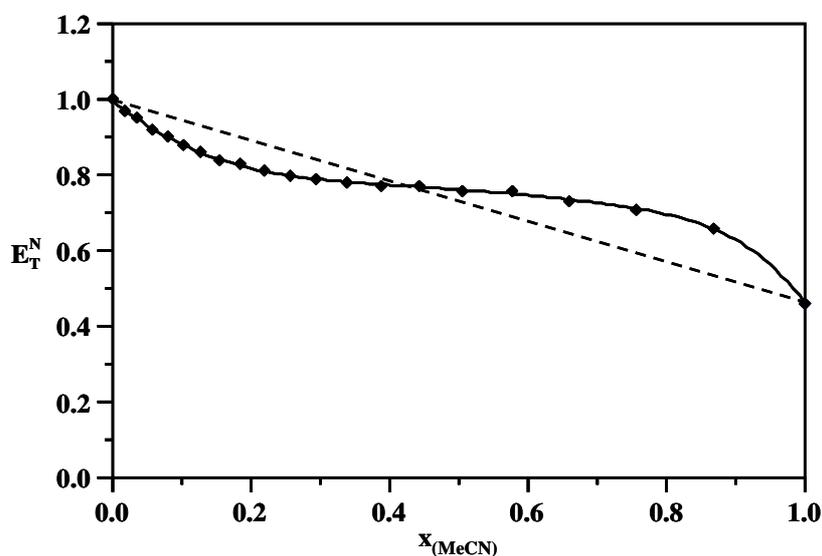


Figura III.1. Variación del parámetro de polaridad E_T^N en función de la fracción molar de acetonitrilo (x_{MeCN}). Comportamiento esperado (- - -); variación real (—).

En la *Figura III.1* se representa la variación del parámetro E_T^N en función de la fracción molar de acetonitrilo. La línea discontinua muestra el comportamiento esperado que no se corresponde con la variación real, representada por la línea continua, debido a la existencia de una solvatación preferencial del indicador solvatocrómico ET-30 por uno de los disolventes que componen la mezcla. Esto quiere decir que existe un exceso o deficiencia de moléculas de uno de los disolventes alrededor del soluto y la composición de la mezcla binaria en esa zona es diferente de la composición en el seno del disolvente

mixto^{65,66,67,68}. En la región rica en agua existe una solvatación preferencial de la betaína de Dimroth y Reichardt por el acetonitrilo, las moléculas de agua interaccionan fuertemente por enlaces por puente de hidrógeno entre ellas y no con el indicador solvatocrómico lo que hace que la polaridad de estas mezclas sea menor a la esperada. Al ir aumentando la proporción de acetonitrilo se va destruyendo progresivamente la estructura original del agua, las moléculas individuales de agua ya no interaccionan entre sí y si lo hacen con la betaína de forma que la polaridad de estas mezclas es superior a la esperada.

III.2.2.2.- Procedimiento Experimental

A) Introducción

La bibliografía consultada pone de manifiesto que la separación de quinolonas por cromatografía líquida se lleva a cabo en condiciones ácidas, debido que a valores bajos de pH la disociación de los grupos silanol residuales se reduce al mínimo, por lo que la posible interacción entre éstos y las quinolonas disminuye, aumentando por tanto la eficacia de la separación. Asimismo, a pH ácido, el grupo carboxilo de las quinolonas se encuentra protonado, por lo que queda neutralizada su carga. Mientras que el grupo amino, se encuentra cargado positivamente, por lo que la adición de un reactivo formador de par iónico disminuye las interacciones de las quinolonas con columnas octadecilsilano y de sílice, debido principalmente a la eliminación de los procesos de adsorción de dichos compuestos con los rellenos de las columnas, traduciéndose este hecho en una mejora de la simetría y de la anchura de los picos cromatográficos.

El resultado de la búsqueda bibliográfica de las disoluciones utilizadas como fase móvil y de las columnas cromatográficas para el análisis de quinolonas por HPLC se resume en la *Tabla III.1*. Tal y como puede verse, el modificador orgánico más comúnmente utilizado es acetonitrilo debido a su baja viscosidad, alta volatilidad y transparencia al ultravioleta a bajas longitudes de onda. Otros modificadores orgánicos incluidos en la bibliografía son el metanol y el tetrahidrofurano (THF).

⁶⁵ Marcus Y., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 85 (1989) 381.

⁶⁶ Barbosa J., Sanz-Nebot V., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 90 (1994) 3287.

⁶⁷ Marcus Y., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2 (1994) 1751.

⁶⁸ Bosch E., Rosés M., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 88 (1992) 3541.

Tabla III.1. Condiciones cromatográficas descritas en la bibliografía para la separación y detección de quinolonas.

Compuestos analizados	Columna	Fase móvil*	Detector
NOR, DIF, CIP, SAR ⁶⁹	Alltech C ₁₈ , 5 µm	MeCN/D.R. citrato, pH 2.4, (7:13)	DAD
FLUROQUINOLONAS ⁷⁰	C ₁₈	MeCN/D.R. fosfato, pH 2	FLU
FLUROQUINOLONAS ⁷¹	LiChrosphere	MeCN/Ácido cítrico 0.4 M (1:5)	MS
ENO, OFL, NOR, CIP, PEF, ENR ⁷²	Shimpack CLC-ODS	MeCN/Hidróxido tetrabutilamonio (1:9)	FLU
NOR, CIP, LOM, PEF, OFL, AMI ⁷³	LiChrosphere C ₁₈ , 5 µm	Metanol/D.R. fosfato (1:1)	DAD/FLU
ENR, CIP ⁷⁴	Spherisorb	MeCN/Metanol/Trietilamina/SDS	DAD
ENR, CIP, SAR, DIF ⁷⁵	Inertsil phenyl	MeCN/2% AcH (15:85)	DAD/FLU
ENR, CIP, DIF, SAR, DAN, MAR ⁷⁶	LiChrosphere RP18e, 5 µm	MeCN/1% HCOOH/AcNH ₄ 0.05 M, pH 3	FLU
CIP, ENR, SAR, DIF ⁷⁷	Inertsil phenyl, 5 µm	MeCN/2 % HCOOH (14:85)	DAD
OXO, NAL, FLU, PIR ⁷⁸	Dionex Co. NS1 5 µm	MeCN/THF/AcH y HCOOH	MS

* D.R. = Disolución reguladora

⁶⁹ Bauer J.F., Howard S., Schmidt A., *J. Chromatogr. A*, 514 (1990) 348.

⁷⁰ Nangia A., Lam F., Hung C.T., *J. Pharm. Sci.*, 79 (1990) 998.

⁷¹ Chan C.Y., Lam A.W., French G.L., *J. Antimicrob. Chemother.*, 23 (1989) 597.

⁷² Jain R., Jain C.L., *LC. GC.*, 10 (1992) 707.

⁷³ Budvari-Barany Z., Szasz G., Takacs-Novak K., Hermecz I., Lore A., *J. Liquid Chromatogr.*, 14 (1991) 3411.

⁷⁴ Tyczkowska K.L., Voyksner R.D., Anderson K.L., Papich M.G., *J. Chromatogr. B*, 658 (1994) 341.

⁷⁵ Roybal J.E., Pfenning A.P., Turnipseed S.B., Walker C.C., Hurlbut J.A., *J. AOAC Int.*, 80 (1997) 982.

⁷⁶ Delephine B., Hurtaud P., Sanders P., *Analyst*, 123 (1998) 2743.

⁷⁷ Turnipseed S.B., Walter C.C., Roybal J.E., Pfenning A.P., Hurlbut J.A., *J. HOAC Int.*, 81 (1998) 554.

⁷⁸ Doerge D., Bajic S., *Rapid Commun. Mass. Spectr.*, 9 (1995) 1012.

Tabla III.1. Condiciones cromatográficas descritas en la bibliografía para la separación y detección de quinolonas. (cont.)

Compuestos analizados	Columna	Fase móvil	Detector
CIP, DAN, DIF, ENR, FLU, MAR, NAL, OXO, SAR ⁷⁹	LiChrosphere C ₁₈ , 5 µm	MeCN/H ₃ PO ₄ con hidróxido de tetrabutilamonio 0.1 M, pH 3.88, (7:93)	FLU
CIP, DIF, ENR, NOR, MAR ⁸⁰	Hypersil C ₁₈ , 5 µm	MeCN/H ₃ PO ₄ 0.1 M, pH 3.5, (15: 85)	DAD
ENR, CIP, SAR, DIF ⁸¹	Lichrospher 100 RP-8	MeCN/H ₃ PO ₄ con ácido 1-heptasulfónico	FLU
DAN, CIN, CIP, ENO, ENR, FLU, MAR, NAL, NOR, OFL, OXO ⁸²	Nucleosil C ₁₈ , 5 µm	MeCN/HCOOH diluido, pH 2.5,	MS
CIP, ENR, SAR ⁸³	PLRP-S, 5 µm	MeCN/1% TFA, (25:75)	FLU
PIP, RUF, ENO, OFL, NOR, CIP, DAN, ENR, DIF, CIN, OXO, NAL, FLU ⁸⁴	LUNA, C ₅ , 5 µm	(MeCN:THF: KH ₂ PO ₄ 0.04 M 50:1:49 pH 2.6)/ (MeCN:THF: KH ₂ PO ₄ 0.12 M 10:1:899 pH 2.6)	DAD/FLU
CIP, ENR ⁸⁵	Zorbax C ₁₄ , 5 µm	MeCN/H ₃ PO ₄ 0.05 M, pH 3.4 (13:87)	DAD
CIP, ENR, MAR, DAN, SAR, NOR ⁸⁶	AQUA C ₁₈ , 5 µm	MeCN/H ₃ PO ₄ 0.025 M, pH 3 (18:82)	DAD/FLU
ENR, CIP, SAR, OXO, FLU ⁸⁷	Xterra phenyl, 5 µm	MeCN/1% HCOOH	FLU

⁷⁹ Yorke J.C., Froc P., *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 63.

⁸⁰ Gigoso P.G., Revesado P.R., Cadahía O., Fente C.A., Vazquez B.I., Franco C.M., Cepeda .A., *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 31.

⁸¹ Posyniak A., Zmudzki J., Semeniuk S., *J. Chromatogr. A*, 914 (2001) 89.

⁸² Toussaint B., Bordin G., Janosi A., Rodríguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 195.

⁸³ Chu P.S., Wang R.C., Chu H.V., *Agricult. Food Chem.*, 50 (2002) 4452.

⁸⁴ Pecorelli I., Galarini R., Bibi R., Floridi Al., Casiarri E., Floridi A., *Anal. Chem.*, 483 (2003) 81.

⁸⁵ Cinquina A.L., Roberti A., Gismnetti L., Longo F., Draisci R., Fagiolo A., Brizioli N.R., *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 221.

⁸⁶ Marazuela M.D., Moreno Bondi M.C., *J. Chromatogr. A*, 1034 (2004) 25.

⁸⁷ Ho C., Sin D.W.M., Tang H.P.O., Chung L.P.K., Siu S.M.P., *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 123.

Tabla III.1. Condiciones cromatográficas descritas en la bibliografía para la separación y detección de quinolonas. (cont.)

Compuestos analizados	Columna	Fase móvil*	Detector
CIP,DAN,ENR,SAR,DIF,OXO, FLU ⁸⁸	Kromasil C ₈ , 5 µm	MeCN/D.R. citrato 0.01 M, pH 4.5	DAD
ENO, OFL, NOR, CIP, ENR ⁸⁹	Inertsil C ₈ , 5 µm	MeCN/Metanol/D.R. citrato 0.4 M (4:9:87)	UV
CIP, ENR, DIF ⁹⁰	Novapack C ₁₈	MeCN/D.R. fosfato pH 3	FLU
ENR, CIP, SAR, DAN, OXO, FLU, DIF, MAR ⁹¹	WATERS C ₁₈ , 5 µm	0.1% TFA en Metanol/0.1% TFA	MS
NOR, OFL, CIP, PEF, LOM, DAN, ENR, SAR, DIF ⁹²	Hypersil-BDS C ₁₈ , 5 µm	MeCN/D.R. citrato-acetato de amonio, pH 4, (9:91)	FLU
NOR, OFL, ENO, MAR, ENR, CIP, DAN, CIN, FLU, OXO, NAL ⁹³	Shield RP-8, 5 µm	MeCN/AcH diluido, pH 2.5	MS
MAR, CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU ⁹⁴	Zorbax C ₈ 5 µm	MeCN/D.R. citrato 0.01 M pH 4.5	DAD
MAR, CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU ⁹⁵	Zorbax C ₈ , 5 µm	MeCN/D.R. citrato 0.01 M pH 4.5	MS
GAT, LEV, LOM, PEF ⁹⁶	LiChrospher C ₁₈ ,5 µm	MeCN/0.3% Trietilamina- H ₃ PO ₄ pH 3.3 (80:20)	UV

* D.R. = Disolución reguladora

⁸⁸ Bailac S., Ballesteros O., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Sanz-Nebot V., Navalón A., Vílchez J.L., Barbosa J., *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004) 145.

⁸⁹ Samanidou V.F., Christodoulou E.A., Papadoyannis L.N., *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 555.

⁹⁰ García M.A., Solans C., Calvo A., Hernández E., Rey R., Bregante M.A., Puig M, *Biomed. Chromatogr.*, 19 (2005) 27.

⁹¹ Van Hoof N., De Wasch K., Okerman L., Reybroeck W., Poelmans S., Nppe H., De Brabander H., *Anal. Chem.*, 529 (2005) 265.

⁹² Zeng Z., Dong A., Yang G., Chen Z., Huang X., *J. Chromatogr. B*, 821 (2005) 202.

⁹³ Toussaint B., Bordin G., Janosi A., Rodríguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 32.

⁹⁴ Hermo M.P., Barrón D., Barbosa J., *Anal. Chem.*, 539 (2005) 77.

⁹⁵ Hermo M.P., Barrón D., Barbosa J., *J. Chromatogr. A*, 1104 (2006) 132.

⁹⁶ Santoro M.I.R.M., Kassab N.M., Singh A.K., Kedor-Hacknam E.R.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 179.

B) Análisis cromatográfico

En vista de los trabajos encontrados en la bibliografía se seleccionó el acetonitrilo como modificador orgánico y se probó el comportamiento cromatográfico de las siete quinolonas reguladas en tejidos de pollo con diversas fases estacionarias basadas en C₈ (Zorbax, Inertsil y Kromasil) y otras columnas basadas en C₁₈ (Lichrospher y Nucleosil) para obtener la mejor separación. Es decir, obtener buenas resoluciones entre los picos en el menor tiempo posible.

En las pruebas previas que se realizaron se observó un ensanchamiento de los picos al usar columnas basadas en C₁₈ que provoca un solapamiento considerable. Mientras que, con las columnas C₈ se obtuvieron mejores picos y por tanto mejor separación.

Cuando se utiliza una columna Kromasil C₈ se observa un solapamiento entre la sarafloxacina y la difloxacina. También se producen solapamientos cuando se emplea una columna Inertsil C₈. Esto no ocurre con la última de las columnas C₈ empleadas. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las experiencias realizadas se seleccionó para nuestro estudio una fase estacionaria Zorbax C₈ (la interacción con las quinolonas de la fase estacionaria es menor).

Como se pone de manifiesto en la *Tabla III.1* la separación de diferentes mezclas de quinolonas se lleva a cabo a valores de pH comprendido entre 2 y 5. Por lo que se decidió probar como componente acuoso de la fase móvil los siguientes ácidos: ácido oxálico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido acético y ácido cítrico.

A pH ácido las quinolonas se eluyen dando picos anchos y asimétricos debido a que presentan grupos amina protonados y se producen interacciones entre las moléculas cargadas positivamente y los grupos silanol residuales polares de la fase estacionaria. Para aumentar la simetría de los picos se ha descrito la introducción de una base orgánica, como es la propilamina, en la fase móvil^{97,98,99,100,101,102} de manera que el reactivo

⁹⁷ De Croo F., Van den Bosche W., De Moerloose P., *J. Chromatogr.*, 325 (1985) 395.

⁹⁸ Coope S.F., Massé R., Dugal R., *J. Chromatogr.*, 489 (1989) 65.

⁹⁹ Tsai F.Y., Lui L.F., Chang B., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 1069.

¹⁰⁰ Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P., Sevillano-Cabeza A., *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992) 2205.

¹⁰¹ Campíns-Falcó P., Herráez-Hernández R., Sevillano-Cabeza A., *J. Chromatogr.*, 612 (1993) 245.

¹⁰² Campíns-Falcó P., Herráez-Hernández R., Sevillano-Cabeza A., *Anal. Chem.*, 66 (1994) 244.

adicionado interacciona con los grupos silanol residuales excluyendo a los compuestos básicos cargados, los cuales se eluyen más rápidamente dando picos simétricos. Se ha comprobado también que la adición a la fase móvil de una sal de amonio produce el mismo efecto que la propilamina ya que el amonio interacciona con los grupos silanol y su carga positiva excluye a los compuestos con la misma carga. El mismo efecto se observa utilizando acetato de amonio en lugar de fosfato de amonio^{103,104}.

Teniendo en cuenta los procedimientos descritos en la bibliografía y los resultados obtenidos en experiencias previas seleccionamos para nuestro estudio una fase estacionaria C₈ (la interacción con las quinolonas de la fase estacionaria es menor) Zorbax y una fase móvil compuesta por acetonitrilo como fase orgánica y una disolución reguladora ácido cítrico/citrato amónico como fase acuosa. En cuanto a la detección, se seleccionó una longitud de onda de emisión y excitación de 280/450 nm, respectivamente, adecuada para la detección de la mayor parte de los compuestos, y de 325/365 nm, respectivamente, para el ácido oxolínico y la flumequina.

Para optimizar la separación de las quinolonas de interés, hay que estudiar tanto el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil como el pH de la misma. Para llevar a cabo estas operaciones se ha aplicado la metodología LSER de la misma manera que se ha descrito en otros trabajos realizados por nuestro grupo de investigación^{88,105}.

a) *Porcentaje de disolvente:*

El objetivo principal a la hora de establecer la separación de una serie de compuestos es obtener una buena resolución entre todos ellos. La resolución, R_s, entre dos picos consecutivos del cromatograma puede estudiarse considerando la ecuación general:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{1 + k} \right) \quad (9)$$

Eficacia Selectividad Retención

¹⁰³ Ventura R., Nadal T., Alcalde P., Pascual J.A., Segura J., *J. Chromatogr. A*, 655 (1993) 233.

¹⁰⁴ Ventura R., Segura J., De la Torre R., Shipe J.R., Savory J. (Editors), "Drugs in Competitive Athletics", Blackell Scientific Publications, Oxford, 1991, 47.

¹⁰⁵ Ballesteros O., Toro I., Sanz-Nebot V., Navalón A., Vélchez J.L., Barbosa J., *Chromatographia*, 56 (2002) 413.

de manera que la resolución máxima podría alcanzarse teóricamente optimizando individualmente cada uno de los términos: eficacia, selectividad y retención. La selección de los componentes de la fase móvil para la separación de las quinolonas nos ha permitido obtener tiempos de retención y comportamientos cromatográficos adecuados, es decir, factores de retención próximos o superiores a 1.5 y picos simétricos, de manera que se ha obtenido una eficacia y retención óptimas. Por lo tanto, una forma de optimizar la resolución es optimizar la selectividad, α , que se define como el cociente de los factores de retención de dos picos consecutivos:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (10)$$

Una vez establecidas las rectas $\log k - E_T^N$ teniendo en cuenta únicamente dos valores experimentales de k para cada compuesto en dos fases móviles de diferente composición, pueden predecirse los valores de k , de α , y por tanto, de la resolución teórica para picos consecutivos dentro del intervalo estudiado.

La resolución experimental se puede calcular a partir de la diferencia de tiempos de retención (t_R) de dos picos consecutivos dividida por la semisuma de las anchuras de los picos en la base (w_b):

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})} \quad (11)$$

Un valor de resolución igual a 1 corresponde a una separación del 94%, mientras que una resolución de 1.5 corresponde a una separación completa de los dos componentes.

En la *Figura III.2*, las líneas indican la resolución teórica entre picos adyacentes calculada a partir de los valores de k predichos utilizando las relaciones lineales entre $\log k$ y E_T^N establecidas con dos puntos experimentales. Los puntos representan los valores de resolución experimental entre picos adyacentes calculados utilizando los valores de los factores de retención experimentales obtenidos a 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25 y 27% de acetonitrilo. A valores de porcentaje de acetonitrilo inferiores al 15% se obtienen resoluciones superiores a 1.5 que indica una completa separación de todas las parejas de compuestos. Se seleccionó como porcentaje óptimo un valor del 12% de acetonitrilo. A este porcentaje tenemos totalmente separadas todas las quinolonas, sin embargo el tiempo

de análisis es demasiado alto como para trabajar en isocrático. Igual ocurre si se trabajamos con un porcentaje del 15%, por lo que se optó por trabajar con un gradiente. En la figura se observa, además, que el cálculo de la resolución teórica a partir de la relación entre $\log k$ y E_T^N suponen una buena aproximación a los valores reales dando validez a todo el razonamiento previo.

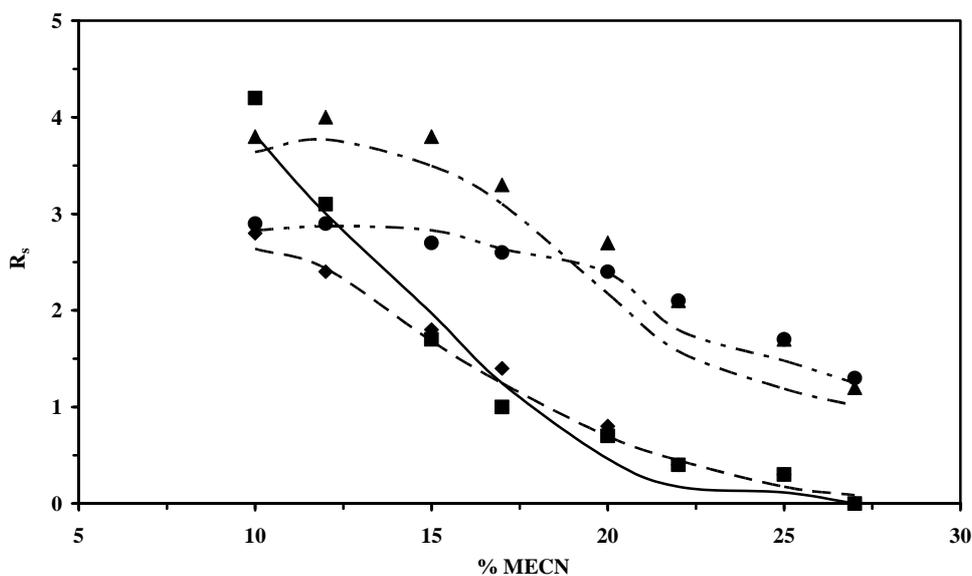


Figura III.2. Influencia de porcentaje de MeCN sobre la resolución de los picos. (◆: Nor/Cip; ■: Cip/Dan; ▲: Dan/Enr; ●: Dif/Sar).

b) pH de la fase móvil:

Para el estudio de la influencia del pH sobre la retención cromatográfica se han determinado los tiempos de retención, t_R , a partir de los tres valores experimentales obtenidos en tres inyecciones diferentes para cada una de las sustancias en estudio y para cada una de las diferentes fases móviles ensayadas, con una concentración de acetonitrilo del 12% v/v y a pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0.

La variación del tiempo muerto con el pH parece ser una variable aleatoria y despreciable, a diferencia de la variación obtenida con la composición, en el que el tiempo muerto disminuye de manera clara al aumentar la composición del modificador

orgánico. De todos modos, para el cálculo de los factores de retención a cada valor de pH se utiliza el valor de t_0 obtenido para ese pH en particular.

Las relaciones entre la resolución y el pH se la mezcla eluyente dan lugar a las representaciones mostradas en la *Figura III.3* para las quinolonas estudiadas. El valor de pH seleccionado fue el de 4.5.

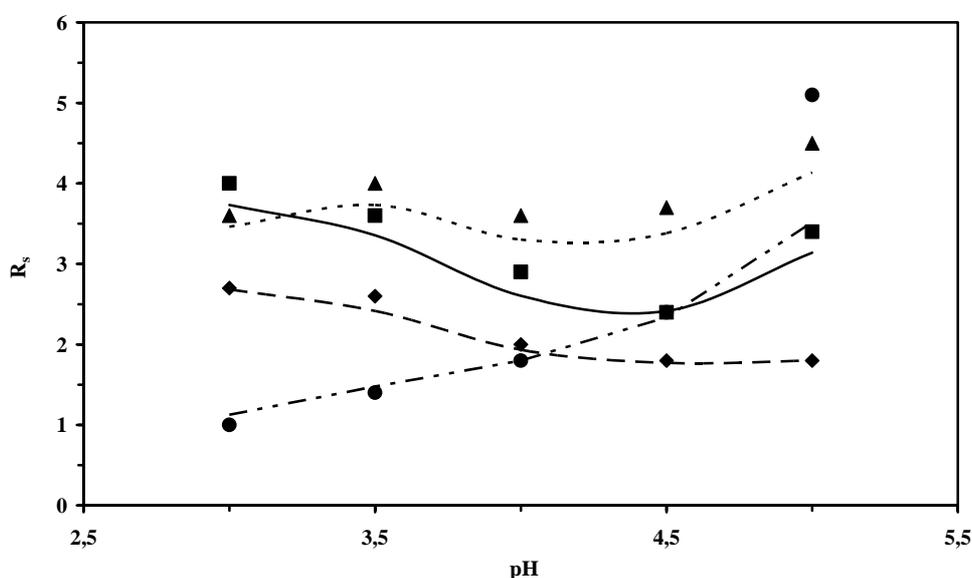


Figura III.3. Influencia del pH sobre la resolución de los picos.
(◆: Nor/Cip; ■: Cip/Dan; ▲: Dan/Enr; ●: Dif/Sar).

c) Elección del gradiente.

Una vez seleccionado tanto la composición como el pH de la fase móvil queda por optimizar el gradiente. El objetivo que perseguimos es poder disponer de un método que sea capaz de separar todas las quinolonas seleccionadas en el mínimo tiempo posible. Por esta razón optamos por la elución con gradiente de composición. El empleo de gradiente tiene la ventaja de reducir el tiempo de análisis ya que disminuye el tiempo de retención de las sustancias, siendo este efecto tanto mayor cuanto más alejadas estén situadas.

Para optimizar el gradiente hacemos uso de los resultados obtenidos al aplicar la metodología LSER. Según estos resultados, el mejor gradiente parece ser el que se muestra en la *Tabla III.2*.

Tabla III.2. Composición del gradiente.

t (min)	Acetonitrilo (%)
0	12
10 - 15	12 - 30
15 - 18	30
18 - 19	30 - 12
19 - 25	12

Se ensayaron diferentes modificaciones del gradiente para intentar reducir el tiempo de análisis. Con estas modificaciones conseguimos disminuir el tiempo de análisis, sin embargo, empeoraba la separación ya que se solapaban parcialmente algunos picos. Por tanto, el gradiente seleccionado es el anteriormente descrito. Los tiempos de retención que presentan las quinolonas en estas condiciones se muestran en la *Tabla III.3*.

Tabla III.3. Tiempo de retención de las quinolonas.

Sustancia	t_r (min)	Sustancia	t_r (min)
Norfloxacin (PI)	6.3	Sarafloxacin	14.2
Ciprofloxacina	7.2	Difloxacina	14.9
Danofloxacina	8.6	Ácido oxolínico	16.1
Enrofloxacina	11.5	Flumequina	20.0

En la *Figura III.4* se muestra el cromatograma de una disolución patrón de las siete quinolonas.

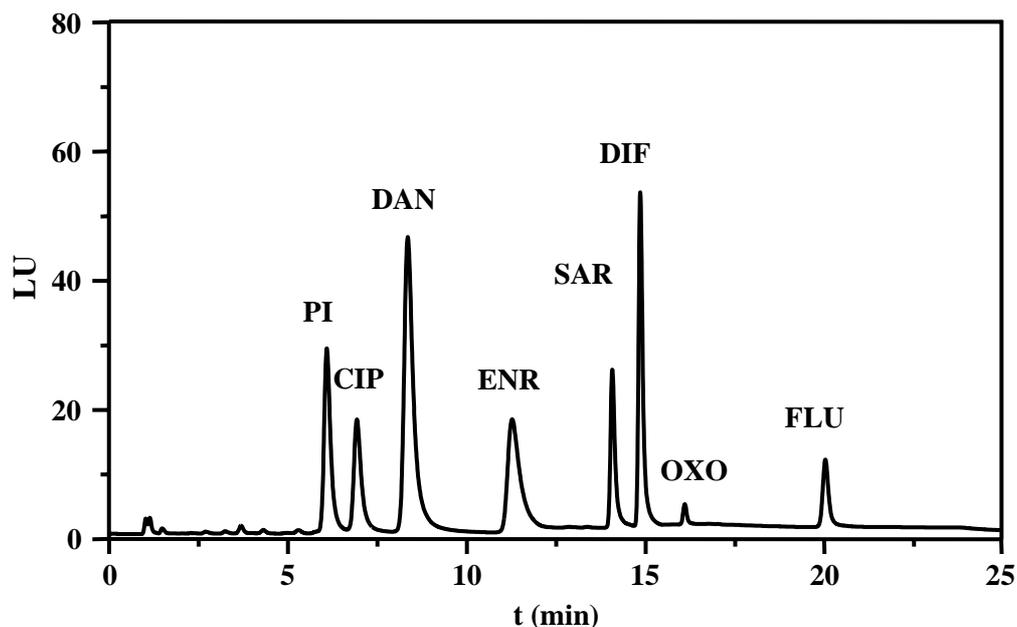


Figura III.4. Cromatograma de las quinolonas estudiadas en las condiciones seleccionadas.

III.2.3.- Parámetros analíticos del método

III.2.3.1.- Establecimiento y verificación del modelo

Con objeto de obtener la función de calibración de cada una de las quinolonas se prepararon disoluciones en matraces de 5 mL en los que se introducen volúmenes crecientes de la disolución patrón que contenía una mezcla de las siete quinolonas en estudio (ciprofloxacina, danofloxacina, sarafloxacina, enrofloxacina, difloxacina, ácido oxolínico y flumequina) de 1 mg/L de concentración para conseguir concentraciones finales de 10 a 200 $\mu\text{g/L}$ para todas las quinolonas salvo para la danofloxacina cuyo intervalo fue de 5 a 100 $\mu\text{g/L}$. A continuación, se adiciona 1 mL de disolución de norfloxacina (patrón interno) de 1 mg/L de concentración y se enrasa con una mezcla de acetonitrilo-agua (12:88; v/v). Se llevaron a cabo dos réplicas experimentales y dos

réplicas instrumentales de cada una de las concentraciones ensayadas para la mezcla de quinolonas. Las condiciones cromatográficas en las que se llevaron a cabo las medidas son las que se muestran a continuación:

- ✚ *Columna Zorbax Eclipse XDB C₈, (150 mm x 4.6 mm, 5 μm).*
- ✚ *Pre-columna Eclipse XDB-C₈ (12.5 mm x 4.6 mm).*
- ✚ *Mezcla acetonitrilo- disolución reguladora de citrato amónico/ácido cítrico 0.010 M de pH 4.5.*
- ✚ *Flujo: 1.5 mL/min.*
- ✚ *Gradiente de composición (Tabla III.2).*
- ✚ *Volumen de inyección: 20 μL.*
- ✚ *Longitud de onda de excitación y de emisión: 280/450 nm, respectivamente, salvo para el ácido oxolínico y la flumequina que fue 325/365 nm.*
- ✚ *Tiempo de análisis: 25 min.*

Para obtener los correspondientes parámetros analíticos se emplearon los cocientes entre las áreas de los picos de las quinolonas dividido por el área del patrón interno correspondiente. Los parámetros del modelo estimados a partir de los resultados experimentales, así como, sus correspondientes desviaciones estándar son los mostrados en la *tabla 4*.

Tabla 4. Parámetros del calibrado de cada una de las quinolonas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
a	0.0112	-0.0263	-0.0293	-0.0009	-0.0044	-0.0015	0.0027
S_a	0.0028	0.0273	0.0153	0.0019	0.0032	0.0008	0.0018
b (L/μg)	0.0053	0.0305	0.0069	0.0025	0.0058	0.0014	0.0013
S_b	0.0001	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
R² (%)	99.9	99.8	99.6	99.9	99.9	99.8	99.9
S_{R,C}	0.006	0.057	0.032	0.004	0.007	0.003	0.004
P (%)	15.6	43.6	19.1	75.3	54.6	13.0	68.5

Los valores del test de fallo de ajuste (*lack-of-fit*), P (%), demuestran la ausencia de curvatura de los datos experimentales, ya que en todos los casos es superior a 5. En las Figuras III.5 y III.6 se representa la función de calibración de cada una de las quinolonas objeto de estudio.

Finalmente, para evaluar el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales. En todos los casos se cumple la condición de homocedasticidad.

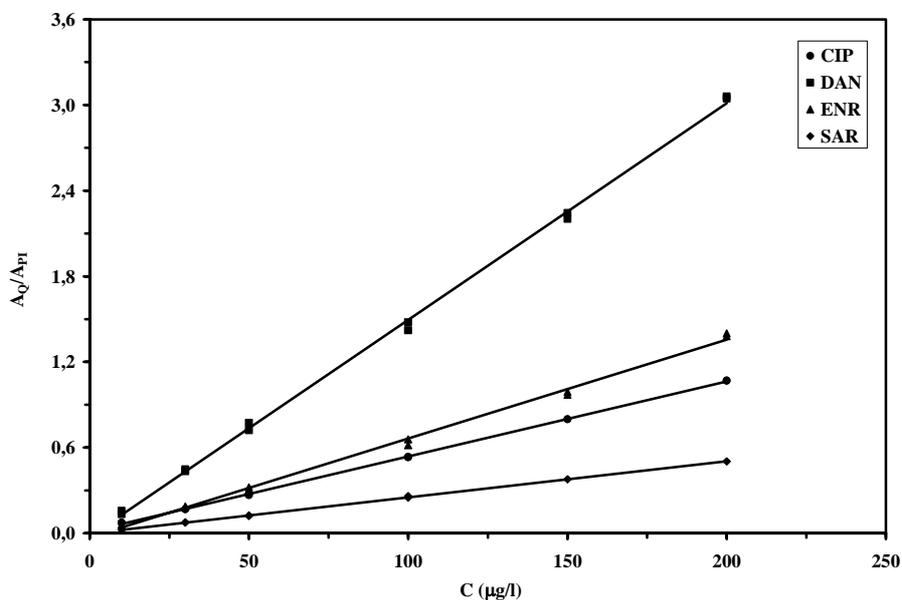


Figura III.5. Rectas de calibrado para ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina y sarafloxacina.

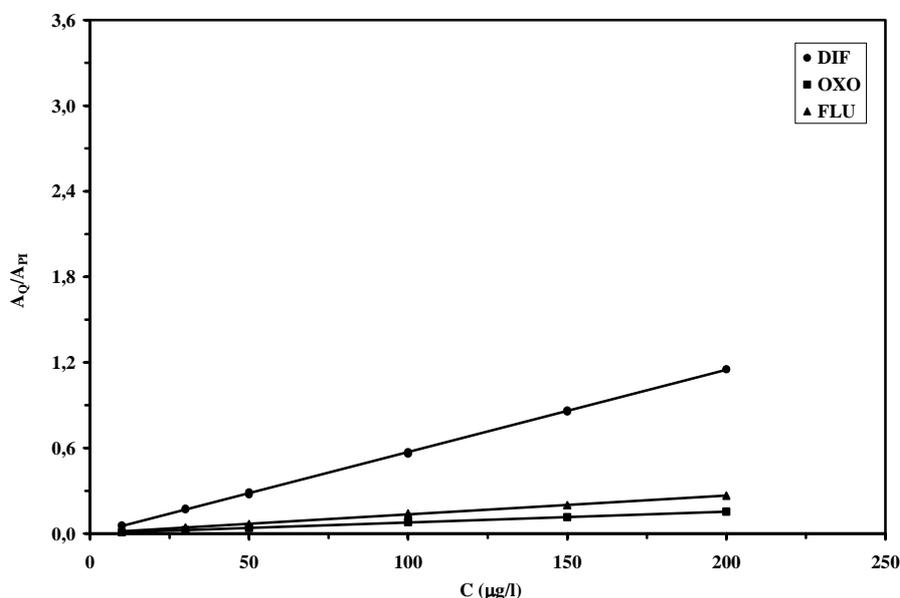


Figura III.6. Rectas de calibrado para difloxacina, ácido oxolínico y flumequina.

III.2.3.2.- Parámetros de calidad del método analítico

Los parámetros de calidad establecidos según las recomendaciones de la IUPAC y desarrollados en el *Capítulo II* de esta Memoria son: *rango dinámico lineal*, *linealidad*, *límite de detección*, *límite de cuantificación*, *precisión* y *sensibilidad*.

La precisión del método se ha evaluado en términos de repetibilidad y de reproducibilidad. Para llevar a cabo el estudio de la repetibilidad se emplearon una serie de disoluciones que contenían las quinolonas estudiadas, de forma individual, con una concentración de 50, 100 y 150 µg/L (25, 50 y 75 para danofloxacina) para los niveles 1, 2 y 3, respectivamente. El procedimiento para la preparación de estas disoluciones, y posterior medida, es igual que la empleada para el establecimiento de la función de calibración. Se llevaron a cabo cinco réplicas instrumentales. En el caso del estudio de la reproducibilidad el procedimiento es el mismo, aunque en este caso, las medidas se llevaron a cabo además, en tres días diferentes y con una fase móvil diferente para cada uno de los días. Los resultados de ambos estudios se recogen en la *Tabla III.5* como desviación estándar relativa.

Tabla III.5. Estudio de la repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad	Desviación estándar relativa (%)							
	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU	
	Nivel 1	0.5	3.6	1.4	1.0	0.7	1.2	1.1
Nivel 2	2.7	2.6	2.5	2.9	5.1	3.1	3.3	
Nivel 3	0.5	1.5	2.4	2.1	1.2	2.7	3.3	

Reproducibilidad	Desviación estándar relativa (%)							
	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU	
	Nivel 1	0.2	2.6	1.6	0.5	0.6	2.8	1.8
Nivel 2	0.4	2.3	0.5	0.4	0.2	0.5	0.9	
Nivel 3	0.5	1.7	0.4	1.1	0.2	3.2	1.1	

Los parámetros de calidad calculados son resumidos en la *Tabla III.6*. Los límites de detección fueron comprobados experimentales.

Tabla III.6. Limite de detección y cuantificación de las quinolonas estudiadas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
Linealidad (%)	99.5	98.4	98.0	99.3	99.5	98.4	98.8
S_{calib}	0.0053	0.0305	0.0069	0.0025	0.0058	0.0014	0.0013
LD ($\mu\text{g/L}$)	1	0.4	1	1	1	3	4
LQ ($\mu\text{g/L}$)	2	1.4	4	3	3	10	12
RDL ($\mu\text{g/L}$)	2 - 200	2 - 100	4 - 200	3 - 200	3 - 200	10 - 200	12 - 200

III.3.- DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN TEJIDO DE POLLO

Como se ha comentado en el *Capítulo I* la UE a través de la EMEA ha establecido unos LMR de diferentes quinolonas en tejido de pollo. Las quinolonas cuyo empleo está regulado en aves son: Danofloxacin, Enrofloxacin (más Ciprofloxacina como residuo marcador), Difloxacina, Flumequina, Ácido Oxolínico y Sarafloxacina. En esta apartado de la memoria se va a comentar el procedimiento de determinación de quinolonas en tejido de pollo empleando el método cromatográfico anteriormente explicado. Las muestras de tejido de pollo han sido obtenidas de diferentes supermercados de Granada. La parte del pollo seleccionado fue la correspondiente a los muslos.

III.3.1.- Tratamiento de la muestra.

La determinación de fármacos y sus metabolitos en muestras de pollo por cromatografía líquida es generalmente bastante compleja debido a la gran cantidad de sustancias presentes en este tipo de matrices. Por esta razón, siempre se requiere algún tipo de pretratamiento de la muestra para eliminar sustancias endógenas de la matriz antes de su introducción en el sistema cromatográfico, y evitar así que interfieran; y para enriquecer la muestra en los compuestos de interés antes del análisis, mejorándose de esta manera los límites de detección. El tipo de tratamiento de la muestra al que debe someterse una muestra depende:

- De la complejidad y composición de la matriz.
- De la concentración de los analitos a determinar.
- De la eficacia y selectividad de la separación cromatográfica, ya que cuanto más eficaz y específica es la separación menor es el tratamiento necesario para obtener buenos resultados.
- Del tipo de detector, puesto que un detector de fluorescencia es más selectivo que uno de absorción ultravioleta-visible, y menos selectivo que un espectrómetro de masas.
- Del objetivo que se persiga: cribado, análisis cualitativo o análisis cuantitativo.

Para la determinación de las quinolonas objeto de estudio en muestras de pollo por cromatografía líquida con detección fluorescente es necesario llevar a cabo dos etapas de

extracción: a) una extracción sólido-líquido para extraer los analitos de las muestras de carne, y b) una extracción líquido-líquido o líquido-sólido para concentrar los compuestos de interés y eliminar las sustancias interferentes presentes en la matriz antes de su introducción en el sistema cromatográfico.

a) Extracción de la carne:

En la bibliografía podemos encontrar diferentes procedimientos para la extracción de quinolonas en tejido de pollo. Se pueden englobar en dos grupos. En el primero de ellos la extracción de los analitos fue realizada utilizando diclorometano en medio ácido o en medio básico. De entre estos métodos cabe destacar el desarrollado por *Barbosa y col.*⁹⁰ en el que la extracción de los analitos fue realizada usando una extracción doble con diclorometano/ácido fosfórico, y posterior doble reextracción con una disolución de hidróxido sódico seguido de una etapa de extracción en fase sólida. La separación y detección se hizo mediante electroforesis capilar con un detector de diodos array. Este procedimiento proporciona buenas recuperaciones para todas las quinolonas, por encima del 70%, aunque es largo y tedioso. En un segundo grupo la extracción se realiza poniendo en contacto las muestras con acetonitrilo que contiene una disolución ácida mediante agitación o en un baño de ultrasonidos^{106,107}. Los ácidos más utilizados son el ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético y ácido o-fosfórico. En un trabajo anterior realizado entre nuestro grupo de investigación y el grupo de investigación dirigido por el Dr. Barbosa se ha desarrollado un tratamiento de muestra consistente en tratar las muestras de pollo con acetonitrilo y ácido m-fosfórico introduciéndolo en un baño de ultrasonidos. A continuación, se separa ambas fases mediante centrifugación y decantación. Se diluye la muestra con agua hasta obtener un contenido en acetonitrilo nunca superior al 8% y se procede a la extracción en fase sólida. El esquema del procedimiento se muestra en la *Figura III.7*. Con este procedimiento se consigue disminuir tanto el tiempo de tratamiento de la muestra como la dificultad del mismo, obteniéndose buenas recuperaciones.

¹⁰⁶ Hernández-Arteseros J.A., Barbosa J., Compañó R., Prat M.D., *J. Chromatogr. A*, 945 (2002) 1.

¹⁰⁷ Horie M., Saito K.S., Nose N., Nakazawa H., *J. Chromatogr. B*, 653 (1994) 69.

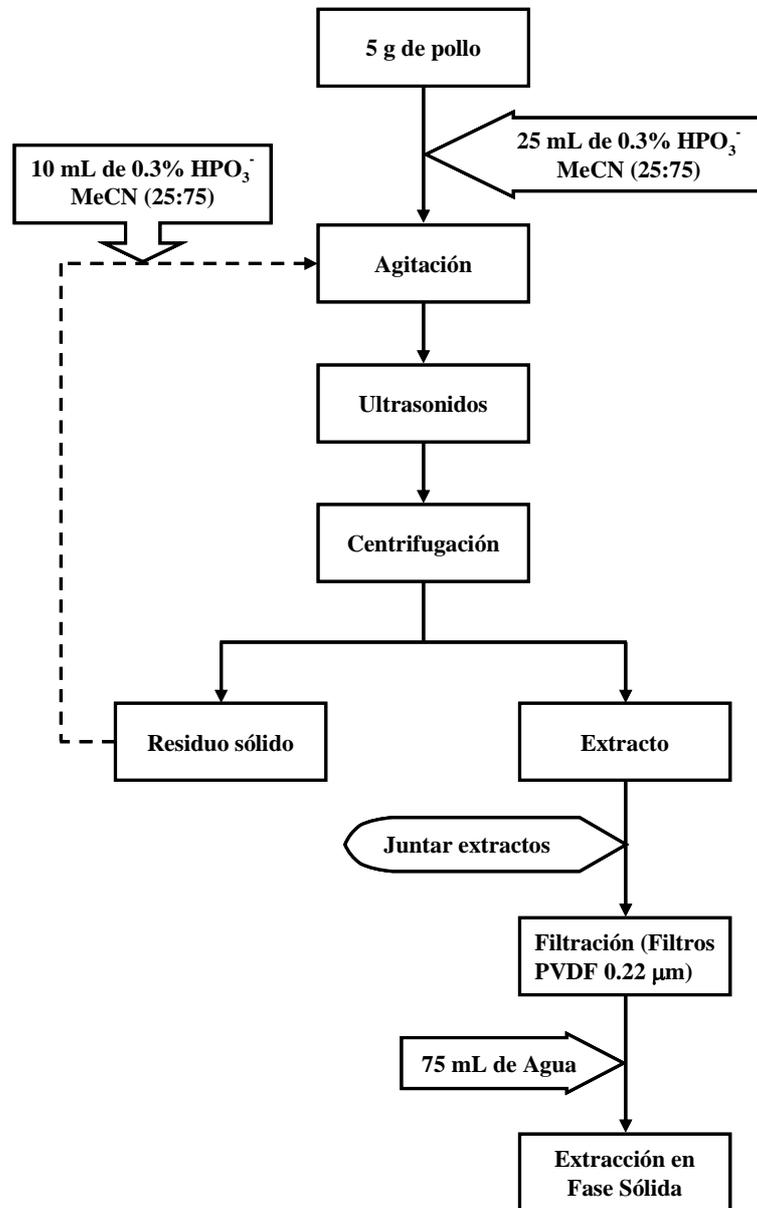


Figura III.7. Esquema del tratamiento de extracción de las quinolonas de las muestras de carne.

b) Extracción en fase sólida:

A la vista de los diferentes procedimientos de extracción descritos en bibliografía, se optó por la extracción en fase sólida debido a las ventajas que presentan frente a la extracción líquido-líquido ya que proporcionan, en general, extractos con menos interferencias y recuperaciones mejores para un amplio grupo de compuestos en una única etapa de extracción, lo que implica menor tiempo de análisis, mejora de la precisión de los resultados y menor consumo de disolvente orgánico.

Al aplicar métodos que implican una extracción en fase sólida, o extracción líquido-sólido, se aíslan los compuestos a determinar reteniéndolos sobre una fase estacionaria similar a las que se utilizan en las separaciones por cromatografía líquida. La muestra líquida se pasa, a un flujo controlado, a través de una fase sólida determinada, que normalmente están empaquetada en una pequeña columna o cartucho, de manera que el analito queda retenido selectivamente en la superficie de esta fase. Posteriormente se lleva a cabo una etapa de lavado para eliminar los compuestos interferentes que hayan podido quedar retenidos en la columna de extracción, y se eluyen los analitos con una disolución adecuada (orgánica o orgánica-acuosa). El extracto se evapora a sequedad y se analiza cromatográficamente una alícuota del residuo redisuelto. Teniendo en cuenta las diferentes etapas implicadas en el proceso de extracción debe seleccionarse la fase estacionaria adecuada y optimizarse las condiciones de retención de los analitos, las condiciones de lavado de la fase sólida y la etapa de elución según las características de los solutos y de la matriz, y según las interacciones de ambos con la fase estacionaria utilizada. En la bibliografía se han encontrado diversos métodos que emplean la extracción en fase sólida como etapa de preconcentración de quinolonas y de eliminación de interferentes y sustancias endógenas. Cabe destacar que en la mayoría de los casos se emplean cartuchos con rellenos de C₁₈, y se aplican a matrices de diferente naturaleza. Se ha empleado para extraer quinolonas de tejidos animales como riñón y músculo de bovino⁸⁴, de pescado¹⁰⁸, de músculo de siluro^{109, 110}, y de músculo de cerdo¹¹¹. También se han utilizado en fluidos biológicos como plasma de cerdo¹¹² y conejo¹¹³, en orina humana

¹⁰⁸ Horie M., Saito K., Nose N., Tera M., Nakazawa H., *J. Liquid Chromatogr.*, 16 (1993) 1463.

¹⁰⁹ Turnipseed S.B., Walker C.C., Roybal J.E., Pfenning A.P., Hurlbut J.A., *J. AOAC Inter.*, 81 (1998) 554.

¹¹⁰ Schilling J.B., Cepa S.P., Menacherry S.D., Bavda L.T., Heard B.M., Stockwell B.L., *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1905.

¹¹¹ Delepine B., Hurtaud-Pessel D., Sanders P., *Analyst*, 123 (1998) 2743.

¹¹² Hernández M., Borrull F., Calull M., *J. Chromatogr. B*, 742 (2000) 255.

¹¹³ Manceau J., Gicquel M., Laurentie M., Sanders P., *J. Chromatogr. B*, 726 (1999) 175.

(previa dilución)¹¹⁴, y en plasma humano¹¹⁵. También se han empleado otros rellenos como SDB para la extracción de quinolonas en hígado, riñón y músculo de ternera y de cerdo¹¹⁶; y rellenos de cambio iónico como SCX y AGMP-1 en muestras de músculo de bovinos y cerdos¹¹⁷, y en músculo de pavo y pollo, huevos, hígado de pollo, miel, músculo de cerdo y de reses¹¹⁸.

En un trabajo publicado en el año 2004 se presenta un estudio comparativo de la eficiencia de la extracción con diferentes rellenos para un grupo de quinolonas y posterior determinación de las mismas mediante electroforesis capilar con DAD¹¹⁹. Tanto las características de los rellenos empleados como las condiciones de trabajo se resumen en las *Tablas III.7* y *III.8*. En la *Figura III.8* se muestran las recuperaciones obtenidas para las quinolonas estudiadas con los diferentes rellenos. Según este estudio los mejores resultados se obtienen utilizando los rellenos ENV+ (Isolute), HLB (OASIS), SDB-RPS (Empore), MPC-SD (Empore) y MAX (OASIS). Sin embargo, cuando se aplica sobre muestras de tejido de pollo se produce un ensanchamiento de los picos cuando se utilizan los rellenos ENV+. Razón por la cual descartaron este tipo de cartuchos en los estudios posteriores. Sin embargo, en pruebas realizadas utilizando la cromatografía líquida como técnica separativa e introduciendo algunas modificaciones en el procedimiento de tratamiento de muestra se ha puesto de manifiesto que se obtienen mejores recuperaciones y cromatogramas cuando se emplean los cartuchos cuyo relleno es de poliestireno-divinilobenceno (ENV+, Isolute)⁸⁸. En la *Figura III.9* se muestra la estructura de este tipo de rellenos. Presentan una superficie hidroxilada que permite el uso de este relleno sin etapa de acondicionamiento. Este tipo de relleno presenta una superficie accesible que retiene los analitos que sean muy polares.

¹¹⁴ Kim D., Lee S.K., Park Y.H., Lee D.W., *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.*, 23 (2000) 1069.

¹¹⁵ Kraemer H., Gehrke R., Breithupt A., Breithupt H., *J. Chromatogr. B*, 700 (1997) 147.

¹¹⁶ Posyniak A., Zmudzki J., Semeniuk S., Niedzielska J., Ellis R., *Biomed. Chromatogr.*, 13 (1999) 279.

¹¹⁷ Tarbin J.A., Tyler D.J., Shearer G. *Food Additives Contaminants*, 9 (1992) 345.

¹¹⁸ Rose M.D., Bygrave J., Stubbings G.W.F., *Analyst*, 123 (1998) 2789.

¹¹⁹ Jiménez-Lozano E., Roy D., Barrón D., Barbosa J., *Electrophoresis*, 25 (2004) 65.

Tabla III.7. Propiedades características de los rellenos usados en la extracción en fase sólidas.

	Bond Elut C18	Zorbax EC C18	ISOLUT ENV+	OASIS HLB	SDB-RPS	MPC-SD	OASIS MAX
Fabricante	Varian	Agilent technologies	Isolute Sorbent Technologies	Waters	Empore	Empore	Waters
Estructura	Silica basada octadecilsilano	Silica basada octadecilsilano y grupo trimetilsilil	Poli(estireno-divinilbenceno)	Poli(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona)	Poli(estireno-divinilbenceno) sulfonado	Silica enlazada con ácidos sulfónicos octil y benceno	Dimetilbutilamina enlazada al polímero HLBr
Masa sorbente (mg)	500	500	200	60	12	4	60
Tamaño de poro (Å)	60	80	850	82	80	60	82
Área superficial específica (m²/g)	-----	226	1000	831	350	-----	789
Diámetro medio de particular (µm)	40	50	76	31.4	15	30	29.6
Capacidad intercambio iónico (meq/g)	-----	-----	-----	-----	-----	0.03	0.32
Volúmen reservorio (mL)	3	6	3	3	3	1	3

Tabla III.8. Condiciones de extracción en fase sólida para los diferentes rellenos.

Relleno	Preacondicionamiento	Muestra	Lavado	Elución	Volumen final
Bond Elut C18 (Fase reversa)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O	20 mL	2 mL H ₂ O	2 mL 1% TFA en MeCN-H ₂ O (75:25) 1 mL MeCN Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL
Zorbax C18 (Fase reversa)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O 2 mL KH ₂ PO ₄ 50 mM pH =7	20 mL	2 mL H ₂ O 0.5 mL MeCN	2 mL 1% TFA en MeCN-H ₂ O (75:25) 1 mL MeCN Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL
Isolut ENV+ (Fase polimérica)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O 2 mL H ₃ PO ₄ 50 mM pH =3	20 mL	2 mL H ₂ O	9 mL 2% TFA en MeCN-H ₂ O (75:25) 1 mL MeCN Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL
Oasis HLB (Fase polimérica)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O	20 mL	2 mL H ₂ O	2 mL 1% TFA en MeCN-H ₂ O (75:25) 1 mL MeCN Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL
SDB-RPS (Fase polimérica + intercambio catiónico)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O 2 mL H ₃ PO ₄ 50 mM pH =3	20 mL	2 mL H ₂ O	3 mL 2% TFA en MeCN-H ₂ O (75:25) 1 mL MeCN Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL
MPC-SD (Fase reversa + intercambio catiónico)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O	20 mL	2 mL H ₂ O	2 mL 2% TFA en MeCN-H ₂ O (75:25) 1 mL MeCN Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL
Oasis MAX (Fase polimérica + intercambio aniónico)	2 mL MeOH 2 mL H ₂ O	20 mL	2 mL AcNa 50 mM pH=7/ MeOH (95:5) 2 mL H ₂ O 1 mL MeOH	3 mL 2% Ácido fórmico en MeOH Evaporación a sequedad Redisolución con MeCN-H ₂ O (50:50)	100 µL

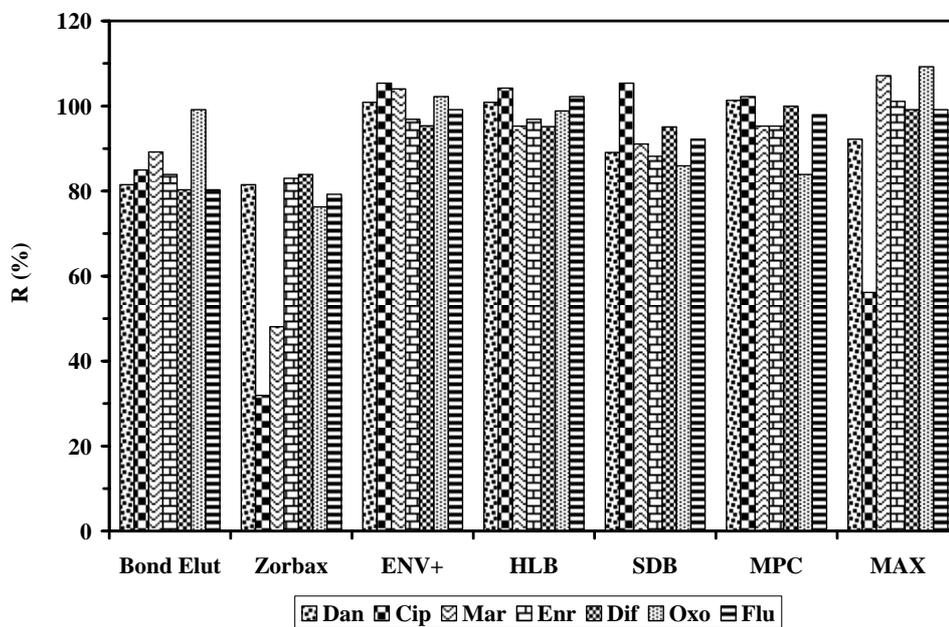


Figura III.8. Estudio preliminar. Recuperaciones obtenidas usando diferentes sorbentes para una disolución estándar de quinolonas.

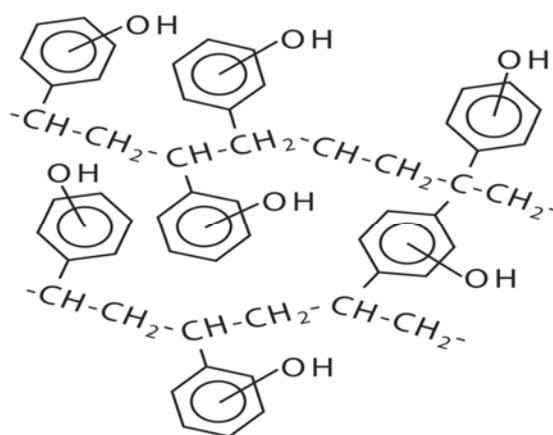


Figura III.9. Estructura química del relleno de las columnas de SPE ENV+.

El procedimiento que se empleó con este tipo de relleno fue el que se describe a continuación: A) *Acondicionamiento*: 2 mL de metanol, 2 mL de agua y 2 mL de una disolución de ácido o-fosfórico 50 mM a pH 3. B) *Carga*: se realiza la carga del extracto líquido previa dilución con agua desionizada para tener un contenido máximo en acetonitrilo del 8%. C) *Lavado*: las columnas fueron lavadas con 2 mL de agua desionizada, 4 mL de una disolución al 1% de ácido fórmico/metanol (60:40; v/v) y 5 mL de hexano. D) *Elución*: La elución de los analitos se llevó a cabo con 5 mL de una disolución al 2% de ácido trifluoroacético en agua y acetonitrilo (25:75; v/v), seguido de 1 mL de acetonitrilo. Los eluatos fueron evaporados hasta sequedad con nitrógeno a una temperatura de 50 °C. Por último, se reconstituyó el extracto con 1 mL de fase móvil (acetonitrilo/disolución reguladora de citrato).

III.3.2.- Parámetros analíticos.

III.3.2.1.- Establecimiento y verificación del modelo.

En estudios previos se comprobó la existencia de efecto matriz para algunas quinolonas por lo que se preparó un calibrado de adición de patrón. Para establecer la función de calibración en muestras de pollo para cada una de las quinolonas seleccionadas se prepararon 6 niveles de concentración añadiendo volúmenes crecientes (15-300 µL) de la disolución mezcla patrón de 1 mg/L de concentración a 5 g de muestra para obtener concentraciones finales dentro del intervalo de 3-60 µg/kg. A cada una de las muestras se les adicionó 200 µL de la disolución patrón de norfloxacin de 1 mg/L de concentración. Se llevaron a cabo dos réplicas experimentales y dos réplicas instrumentales. Las muestras dopadas se almacenaron 24 horas en oscuridad y a una temperatura de 5 °C antes de iniciar el tratamiento. Transcurrido este tiempo se aplicó el procedimiento de tratamiento de muestra descrito anteriormente. En la *Tabla III.9* se resumen los valores de los parámetros analíticos asociados al establecimiento y verificación del modelo. En la tabla también se incluyen el valor de las recuperaciones. El test de *lack-of-fit*, P(%), fue utilizado para comprobar la linealidad de las curvas de calibración. En todos los casos fue superior a 5%.

Finalmente, para evaluar el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales. En todos los casos se cumple la condición de homocedasticidad.

Tabla III.9. Parámetros del calibrado de cada una de las quinolonas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
a	0.0001	0.0492	0.0540	0.0105	- 0.0136	- 0.0076	- 0.0035
S_a	0.0063	0.0237	0.0170	0.0024	0.0087	0.0018	0.0025
b (L/μg)	0.0291	0.2913	0.0657	0.0229	0.0435	0.0076	0.0124
S_b	0.0002	0.0016	0.0006	0.0001	0.0003	0.0001	0.001
R² (%)	99.8	99.9	99.8	99.9	99.9	99.6	99.7
S_{R,C}	0.021	0.053	0.036	0.016	0.026	0.008	0.009
Rec (%)	70.3	69.1	74.1	72.7	71.5	70.8	75.9
P (%)	8.1	72.3	47.6	59.8	71.2	6.9	98.0

III.3.2.2.- Parámetros de calidad del método analítico.

Para establecer los parámetros de calidad del método de determinación de quinolonas en muestras de tejido de pollo se ha seguido el mismo procedimiento descrito anteriormente para el caso del método de determinación de quinolonas. Se ha determinado el *rango dinámico lineal (RDL)*, *linealidad*, *límite de detección*, *límite de cuantificación*, *precisión* y *sensibilidad*. La precisión del método viene establecida por la *desviación estándar relativa (DER)* en el estudio de la repetibilidad y de la reproducibilidad. En la *Tabla III.10* se recogen todos los resultados.

Tabla III.10. Parámetros de calidad de las quinolonas estudiadas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
LD (µg/kg)	2	1	2	2	2	3	2
LQ (µg/kg)	7	2	6	7	6	11	7
RDL (µg/kg)	7 - 50	2 - 25	6 - 50	7 - 50	6 - 50	11 - 50	7 - 50
Lin (%)	99.4	99.5	99.4	99.5	99.5	99.3	99.3
DER_{Reprod} (%)	1 - 5	2 - 4	2 - 5	1 - 3	1 - 3	2 - 4	2 - 4
DER_{Repet} (%)	3	3	3	2	3	4	3

III.3.2.3.- Estudio de recuperación

Para ver la eficacia del método se realizó la evaluación del porcentaje de recuperación de las quinolonas añadidas sobre muestras de pollo. Para ello se fortificaron muestras (5 g) a tres niveles de concentración (20, 30 y 40 µg/kg) para las diferentes quinolonas junto con el patrón interno. Estas muestras fueron tratadas con los procedimientos anteriormente descritos y posteriormente fueron analizadas.

Para evaluar la recuperación se compararon los valores de concentración obtenidos por interpolación de las áreas de las muestras analizadas en los calibrados de las quinolonas con los valores nominales de concentración con los que se habían fortificado las muestras.

En la *Tabla III.11* se muestran las recuperaciones obtenidas para cada una de las quinolonas para cada nivel de concentración ensayadas.

Tabla III.11. Resultados del estudio de recuperación.

	C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R (%)	DER (%)	t_{exp}	P (%)
CIP	20	101.2	2.6	1.2	27.1
	30	98.7	1.7	1.9	12.3
	40	101.1	1.4	2.0	10.7
DAN	20	101.1	2.9	1.0	38.3
	30	98.5	3.6	1.0	36.6
	40	98.2	2.3	1.9	10.9
ENR	20	99.2	3.4	0.6	58.1
	30	99.7	3.8	0.2	84.7
	40	100.5	1.7	0.7	49.9
SAR	20	101.6	2.3	1.7	15.7
	30	101.4	3.4	1.0	35.4
	40	99.5	1.5	0.9	42.9
DIF	20	98.4	2.5	1.6	18.2
	30	101.4	2.8	1.2	27.4
	40	100.4	2.6	0.4	69.6
OXO	20	97.5	4.2	1.5	20.0
	30	99.4	2.9	0.5	64.1
	40	100.0	3.5	0.0	97.4
FLU	20	100.7	4.1	0.4	71.2
	30	98.4	4.2	1.0	38.5
	40	98.0	2.7	1.8	13.1



CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN LECHE Y HUEVO



IV.1.- INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado en los capítulos anteriores, se están empleando masivamente antibióticos de la familia de las quinolonas para el tratamiento y prevención de determinadas enfermedades y/o como aditivos alimenticios para el engorde de los animales, tanto de granja como de piscifactorías. El mal uso de estos productos puede dejar residuos tanto en los diferentes tejidos del animal (piel, riñón, hígado, etc.) como en los alimentos producidos por determinados animales como son la leche o el huevo. Para asegurar la correcta utilización de estos antibióticos y salvaguardar la salud de los consumidores la Unión Europea ha establecido a través de su órgano competente en este campo, la EMEA, los niveles de concentración máximos permitidos para estos compuestos (LMR) que pueden aparecer en los diferentes tejidos del animal y en leche¹. Sin embargo, establece claramente la prohibición de su uso en animales que produzcan huevos destinados al consumo humano.

Numerosos son los estudios publicados que hacen referencia al análisis de multiresiduos de quinolonas tanto en muestras biológicas como en tejidos animal y que han sido recogidos en varios reviews^{2,3}. La mayoría de ellos son métodos que se basan en la

¹ *Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE), Council Regulation No. 2377/90 L224, 991, 2601, 18 August 1990.*

² *Garlucci G., J. Chromatogr. A, 812 (1998) 343.*

³ *Hernández-Arteseros J.A., Barbosa J., Compañó R., Prat M.D., J. Chromatogr. A 945 (2002) 1.*

utilización de la cromatografía líquida para la separación y posterior determinación de estos compuestos empleando detectores de UV, fluorescencia o acoplamientos con un espectrómetro de masas como se ha descrito en *Introducción* de la presente Memoria. Sin embargo, son pocos los que se han centrado en la determinación de los residuos de quinolonas en leche^{4,5,6,7,8} o en huevo^{9,10,11,12,13,14,15,16}.

Por tanto, se ha considerado importante desarrollar metodologías de buenas características analíticas para la extracción y posterior determinación de los residuos marcadores establecidos en el documento de la EMEA en leche y en huevo. El objetivo del presente capítulo es abordar la problemática de la determinación de quinolonas en ambos tipos de muestras.

⁴ Roybal J.E., Pfenning A.P., Turnipseed S.B., Walker C.C., Huribut J.A., *J. AOAC Int.*, 80 (1997) 982.

⁵ Holtzapple C.K., Buckley S.A., Stanker L.H., *J. AOAC Int.*, 82 (1999) 607.

⁶ Cinquina A.L., Roberti P., Giannetti L., Longo F., Draisci R., Fagiolo A., Brizioli N.R., *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 221.

⁷ Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C., *J. Chromatogr. A*, 1034 (2004) 25.

⁸ Idowu O.R., Peggs J.O., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35 (2004) 143.

⁹ Gorla N., Chiostrì E., Ugnia L., Weyers A., Giacomelli N., Davicino R., Ovando H.G., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 8 (1997) 253.

¹⁰ Rose M.D., Bygrave J., Stubbings G.W., *Analyst*, 123 (1998) 2789.

¹¹ Maxwell R.G., Cohen E., Donoghue D.J., *J. Agric. Food Chem.*, 470 (1999) 1563.

¹² Schneider M.J., Donoghue D.J., *J. AOAC Int.*, 83 (2000) 1306.

¹³ Gigosos P.G., Revesado P.R., Cadahia O., Fente C.A., Vázquez B.L., Franco C.M., Cepeda A., *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 31.

¹⁴ Shim J.H., Lee M.H., Kim M.R., Lee C.J., Kim I.S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (2003) 1342.

¹⁵ Schneider M.J., Donoghue D.J., *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 39.

¹⁶ Zeng Z., Dong A., Yang G., Chen Z., Huang X., *J. Chromatogr. B*, 821 (2005) 202.

IV.2.- DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN LECHE

En esta apartado de la Memoria se va a comentar el procedimiento de determinación de fluoroquinolonas en leche empleando el método cromatográfico anteriormente expuesto (*Capítulo III*). Las muestras de leche (cruda, entera, semidesnatada y desnatada) han sido obtenidas de diferentes supermercados de Granada. Nos hemos centrado en el análisis de danofloxacin y de enrofloxacin que se administran a las vacas, difloxacin porque su uso se prohíbe totalmente en animales que producen leche, y ciprofloxacina y sarafloxacin que son los metabolitos principales de enrofloxacin y de difloxacin, respectivamente. El LMR establecido por la EMEA es de 30 µg/kg para danofloxacin, y de 100 µg/kg para la suma de enrofloxacin y ciprofloxacina.

IV.2.1.- Condiciones cromatográficas

El método cromatográfico utilizado para el análisis de estas fluoroquinolonas (CIP, DAN, ENR, SAR, DIF y NOR como patrón interno) ha sido descrito en el *Capítulo III*. Debido a que no se analizan flumequina y ácido oxolínico se ha hecho una pequeña modificación en el gradiente para reducir el tiempo de análisis. Las condiciones cromatográficas en las que se llevaron a cabo las medidas son las que se muestran a continuación:

- ✚ *Columna Zorbax Eclipse XDB C₈, (150 mm x 4.6 mm, 5 µm).*
- ✚ *Pre-columna Eclipse XDB-C₈ (12.5 mm x 4.6 mm).*
- ✚ *Mezcla acetonitrilo-disolución reguladora de citrato amónico/ácido cítrico 0.010 M de pH 4.5.*
- ✚ *Gradiente de composición (Tabla IV.1).*
- ✚ *Flujo: 1.5 mL/min.*
- ✚ *Volumen de inyección: 20 µL.*
- ✚ *Longitud de onda de excitación y de emisión: 280/480 nm, respectivamente.*
- ✚ *Tiempo de análisis: 20 min.*

Tabla IV.1. Composición del gradiente.

t (min)	Acetonitrilo (%)
0	12
11 - 15	12 - 30
15 - 18	30
18 - 20	30 - 12

IV.2.2.- Tratamiento de la muestra

El procedimiento de la extracción fue adoptado después de una extensa investigación de los métodos para la extracción de varias fluoroquinolonas en muestras de leche. En esta investigación, hemos considerado que el método presentado por *Idowu y Peggins*⁸ es el más apropiado para nuestro estudio por su simplicidad y rapidez.

En bibliografía se pueden encontrar diferentes procedimientos para la extracción de quinolonas en leche. El procedimiento propuesto por *Roybal y col.*⁴ consiste en la extracción de CIP, ENR, DIF y SAR de las muestras con etanol acidificado, posterior retención en una columna de intercambio catiónico y finalmente la elución con metanol en medio básico. El método requiere una regeneración periódica de la columna debido a la reacción de las proteínas de la leche con la fase estacionaria. *Holtzapfle y col.*⁵ usan una extracción “on-line” con una columna de inmunoafinidad en la fase del “clean-up” seguida de la separación en una columna cromatográfica en fase reversa para la determinación de CIP, ENR, DIF y SAR. Tras 15-20 inyecciones de la muestra observan una contaminación de la columna. *Cinquina y col.*⁶ determinan ENR y su principal metabolito, CIP, en leche mediante LC-UV previa extracción siguiendo el siguiente procedimiento: 1) se añade ácido tricloroacético en metanol, se agita y se centrifuga; 2) se añade tampón fosfato (pH 7.4) y se centrifuga; 3) el sobrenadante se purifica mediante extracción en fase sólida con cartuchos C18; 4) la elución se realiza con ácido trifluoroacético en acetonitrilo y se evapora; 5) por último, se reconstituye en la fase móvil y se inyecta en el cromatógrafo. El procedimiento resulta largo y tedioso frente a otros procedimientos. *Marazuela y Moreno-Bondi*⁷ desarrollan dos procedimientos diferentes para la extracción en muestras de leche de CIP, ENR, MARB, DAN, SAR y

NOR (patrón interno). El primero de ellos es análogo al descrito anteriormente. En este caso se sustituyen los cartuchos C18 por los cartuchos Strata X o Strata Screen A. La elución se realiza con ácido o-fosfórico en acetonitrilo y se inyecta el eluato. El segundo de los procedimientos consiste en: 1) centrifugar durante 30 min a 10 °C y a una velocidad de 13800xg la muestra para eliminar la grasa; 2) el sobrenadante es introducido en los filtros Centricon Plus-20[®] o Amicon Ultra-4[®] y se lleva a cabo una centrifugación durante 60 min a 10 °C y a una velocidad de 4000xg; 3) finalmente el ultrafiltrado se diluye a un volumen de 5 mL con agua desionizada y se inyecta. En ambos casos se emplea un método de cromatografía líquida con detección fluorescente y con DAD. El método de cromatografía líquida con detección fluorescente por *Idowu y Peggins*⁸ permite la determinación rápida de ENR y CIP en leche usando un tratamiento simple de las muestras. Este método implica una precipitación inicial de las proteínas de la leche (1 mL) con una combinación de ácido o-fosfórico concentrado (50 µL) y acetonitrilo (2 mL) usando una centrífuga (4000 r.p.m. a 4 °C), y posterior extracción del acetonitrilo y de la grasa con diclorometano (3 mL) mediante centrifugación (4000 r.p.m. a 4 °C). Por último, se inyecta una porción de la fase acuosa. El límite de cuantificación fue de 2 ng/mL para cada analito.

Se han probado otros procedimientos para precipitar las proteínas y eliminar la presencia de la grasa de la leche basados en la adición de acetonitrilo seguido de una extracción con n-hexano y posterior evaporación de la fase acuosa, reconstitución con fase móvil e inyección en el sistema cromatográfico. Las recuperaciones con este procedimiento fueron del 50-70% para todas las fluoroquinolonas ensayadas. El procedimiento resulta excesivamente largo. También se ha probado otro procedimiento que consiste en la precipitación de las proteínas con una disolución de acetato de zinc-ácido fosfotungstíco-ácido acético (en un matraz de 100 mL se disuelve 9.1 g de acetato de zinc dihidratado, 5.46 g ácido fosfotungstíco tetrahidratado, 5.8 mL de ácido acético concentrado y se enrasa con agua desionizada). Se toma 1 mL de leche y se le añade 200 µL de la disolución anterior. Se filtra la fase sobrenadante con filtros de nylon y se inyecta directamente, las recuperaciones resultaron ser muy bajas.

Un tratamiento simple de la muestra, basado en el procedimiento propuesto por *Idowu y Peggins*⁸, ha sido aplicado a la determinación de CIP, ENR, DIF, SAR y DAN, utilizando la NOR como patrón interno, en varios tipos de muestras de leche de vaca obtenidas en diferentes supermercados de Granada. Para nuestro propósito, se han reoptimizado las cantidades de ácido o-fosfórico concentrado, acetonitrilo y de diclorometano empleados. En las *Figuras IV.1, IV.2 y IV.3* se muestran las variaciones de la recuperación para cada

una de las fluoroquinolonas con las variaciones del volumen de ácido o-fosfórico (*Figura IV.1*), volumen de acetonitrilo (*Figura IV.2*) y volumen de diclorometano (*Figura IV.3*). Las condiciones iniciales para cada uno de los estudios han sido las siguientes: a) Influencia del volumen de ácido o-fosfórico concentrado: 2 mL de acetonitrilo y 3 mL de diclorometano; b) Influencia del volumen de acetonitrilo: 100 μ L de ácido o-fosfórico concentrado y 3 mL de diclorometano; y c) Influencia del volumen de diclorometano: 100 μ L de ácido o-fosfórico y 2 mL de acetonitrilo. Del análisis de las figuras mencionadas resulta que los valores óptimos para la extracción de las cinco fluoroquinolonas estudiadas fueron: 100 μ L de ácido o-fosfórico concentrado, 2 mL de acetonitrilo y 4 mL de diclorometano.

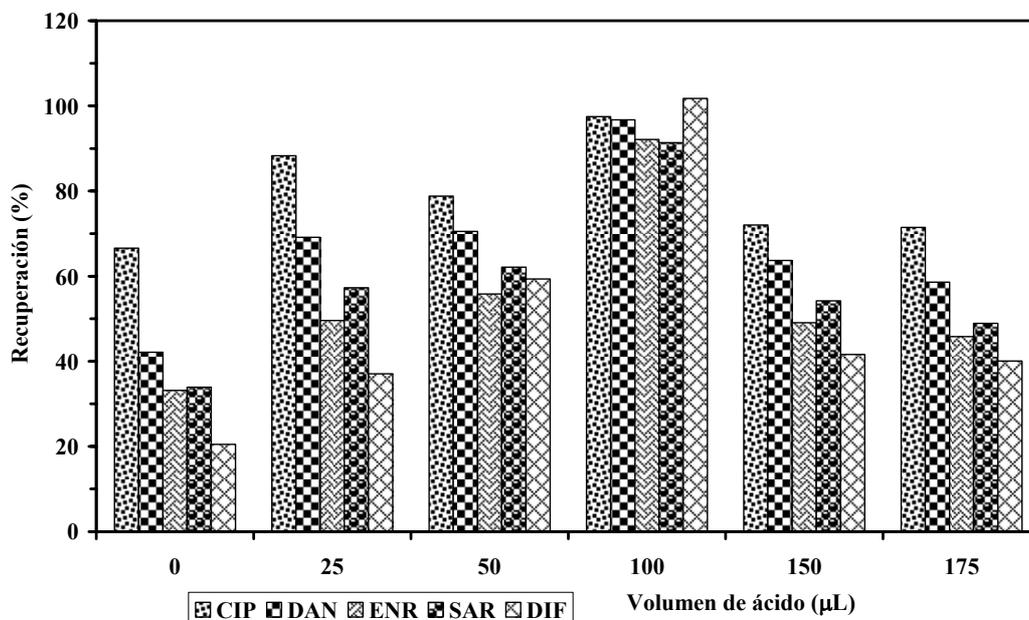


Figura IV.1. Influencia del volumen de ácido o-fosfórico.

El comportamiento que observamos tanto en la *Figura IV.2* como en la *Figura IV.3* se puede justificar teniendo en consideración la polaridad de las diferentes disoluciones empleadas. Cuando el volumen de acetonitrilo está por encima de los 2.5 mL -relación entre fase acuosa y orgánica es de 1:2.5 cambia la polaridad de la mezcla impidiendo que el diclorometano pueda retirar el acetonitrilo de la mezcla. Por otra parte, cuando el volumen de diclorometano es inferior a 3 mL, no hay suficiente fase orgánica para retirar el acetonitrilo y la grasa del medio.

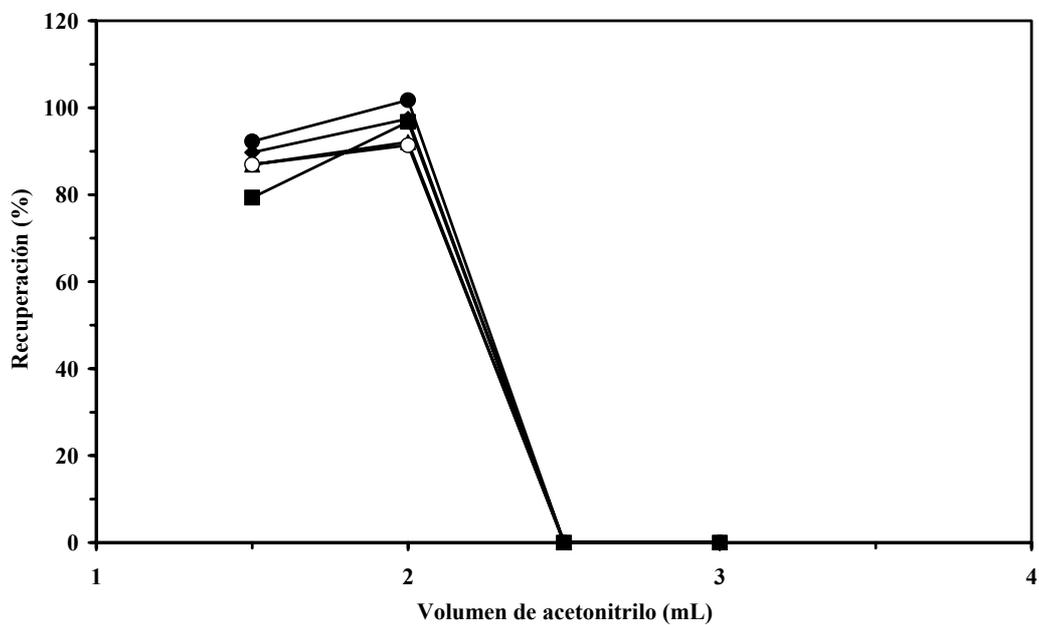


Figura IV.2. Influencia del volumen de acetonitrilo.
 (◆: CIP; ■: DAN; ▲: ENR; ○: SAR; ●: DIF)

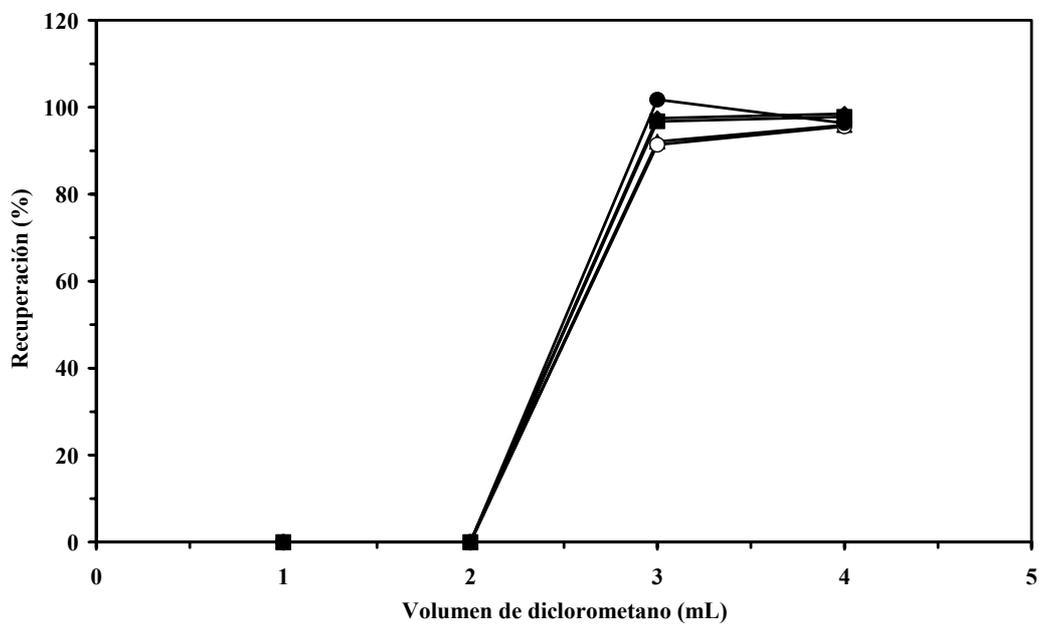


Figura IV.3. Influencia del volumen de diclorometano.
 (◆: CIP; ■: DAN; ▲: ENR; ○: SAR; ●: DIF)

El procedimiento propuesto presenta la ventaja de su simplicidad y rapidez frente a otros procedimientos descritos en la bibliografía ya que no es necesaria una etapa de extracción en fase sólida para limpieza de las muestras y preconcentración de los analitos. La descripción completa del procedimiento es la siguiente: 1) Se toma 1 mL de leche en un tubo de vidrio de centrifuga de 10 mL y se le añade 100 μ L de disolución de 1 mg/L de norfloxacin (patrón interno); 2) Se añade 100 μ L de ácido o-fosfórico concentrado y se agita la mezcla durante 10 s; 3) A continuación, se añaden 2 mL de acetonitrilo para precipitar las proteínas y pasar las fluoroquinolonas a la disolución; 4) La mezcla se agita durante 10 s y se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m.; 5) La fase sobrenadante se decanta en otro tubo de centrifuga de 10 mL, se añade 4 mL de diclorometano y se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 10 min; 6) La fase acuosa (sobrenadante) se transfiere con una pipeta Pasteur a un vial para ser inyectada.

Los cromatogramas correspondientes a una mezcla de fluoroquinolonas, un blanco de leche y una muestra fortificada con fluoroquinolonas se muestran en la *Figura IV.4*.

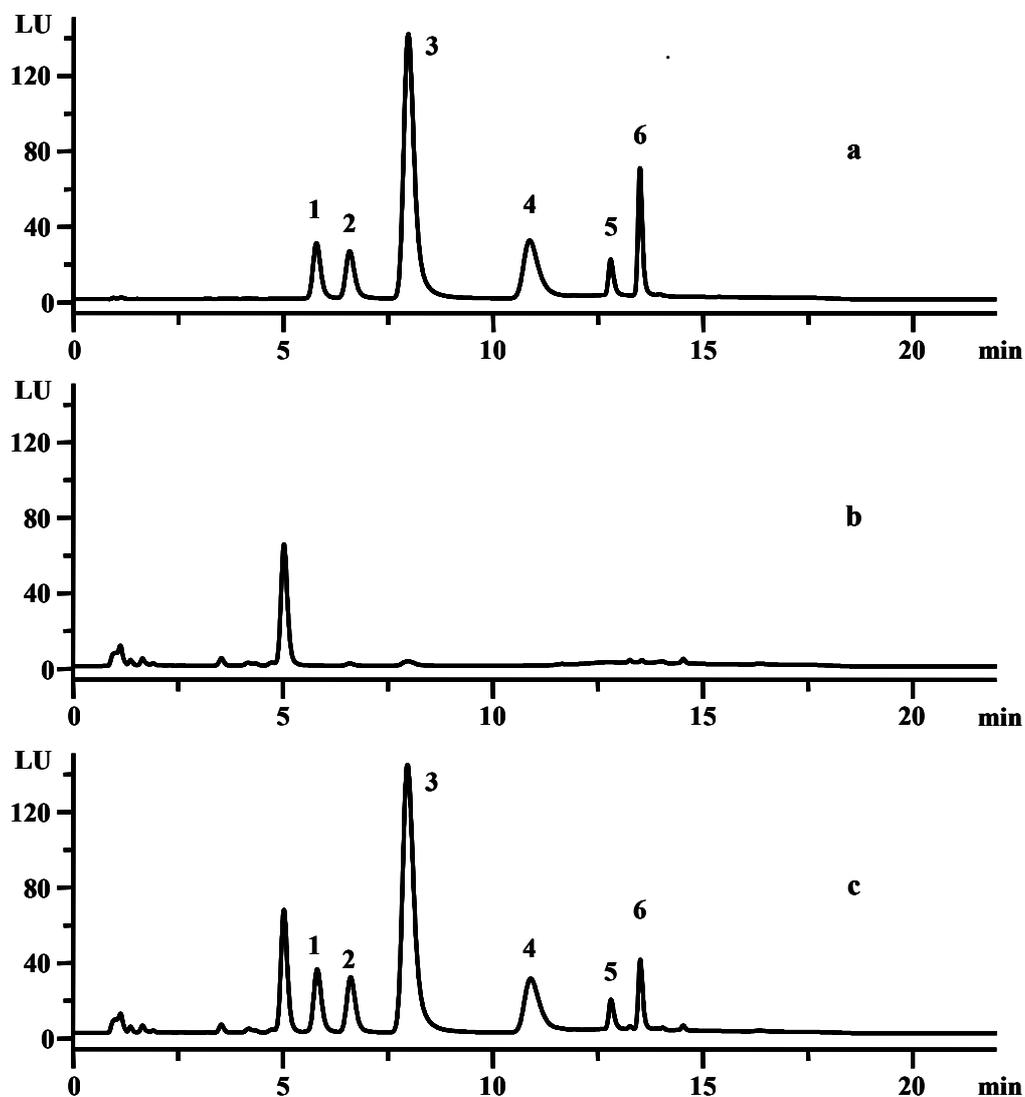


Figura IV.4. Cromatogramas: (a) de una mezcla estándar de fluoroquinolonas; (b) del extracto de un blanco; (c) del extracto de una muestra de leche fortificada. ① NOR, ② CIP, ③ DAN, ④ ENR, ⑤ SAR y ⑥ DIF.

IV.2.3.- Parámetros analíticos

IV.2.3.1.- Establecimiento y verificación del modelo

En estudios previos se comprobó la existencia de efecto matriz para algunas fluoroquinolonas por lo que se preparó un calibrado de adición de patrón. Para establecer las correspondientes curvas de calibración en muestras de leche se prepararon por triplicado una serie de tubos de ensayo que contenían 1 mL de leche y se le adicionaron volúmenes crecientes de una disolución patrón que contenía la mezcla de fluoroquinolonas, con una concentración de 1 µg/mL, preparadas en etanol y un volumen constante de 200 µL de disolución de patrón interno (NOR) con una concentración de 1 µg/mL. Las concentraciones preparadas para CIP, SAR, ENR y DIF fueron de 20 a 100 µg/L, y de 5 a 50 µg/L para DAN. A continuación se aplicó el procedimiento de tratamiento de muestra anteriormente descrito. En la *Tabla IV.2* se presentan los parámetros analíticos para cada uno de los calibrados. El test de *lack-of-fit* fue utilizado para comprobar la linealidad de las curvas de calibración.

Tabla 2. Parámetros del calibrado de cada una de las fluoroquinolonas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF
a	- 0.0098	- 0.0186	- 0.0158	0.0018	- 0.0169
S_a	0.0088	0.0159	0.0039	0.0023	0.0026
b (L/µg)	0.0089	0.0496	0.0146	0.0031	0.0044
S_b	0.0002	0.0006	0.0001	0.0001	0.0001
R² (%)	99.3	99.8	99.9	99.6	99.8
S_{R,C}	0.020	0.037	0.009	0.005	0.006
Rec (%)	98.5	97.8	95.9	95.6	97.8
P (%)	26.3	20.5	34.3	25.1	26.0

Los valores del test de fallo de ajuste (*lack-of-fit*), P (%), demuestran la ausencia de curvatura de los datos experimentales, ya que en todos los casos es superior a 5. Finalmente, para evaluar el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales. En todos los casos se cumple la condición de homocedasticidad.

IV.2.3.2.- Parámetros de calidad del método analítico

Para establecer los parámetros de calidad del método de determinación de fluoroquinolonas en muestras de leche se ha seguido el mismo procedimiento descrito anteriormente en el *Capítulo II*. Se ha determinado el *rango dinámico lineal (RDL)*, *linealidad*, *límite de detección*, *límite de cuantificación*, *precisión* y *sensibilidad*. La precisión del método viene establecida por la *desviación estándar relativa (DER)* en el estudio de la repetibilidad y de la reproducibilidad. En la *Tabla IV.3* se recogen todos los resultados.

Tabla IV.3. Parámetros de calidad de las fluoroquinolonas estudiadas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF
LD ($\mu\text{g/L}$)	3	1	2	6	3
LQ ($\mu\text{g/L}$)	11	3	6	19	9
RDL ($\mu\text{g/L}$)	11 - 100	3 - 50	6 - 100	19 - 100	9 - 100
Lin (%)	98.5	97.9	98.5	97.5	97.8
DER _{Reprod} (%)	2 - 6	3 - 6	1 - 4	2 - 6	1 - 4
DER _{Repet} (%)	4	4	3	4	4

IV.2.3.3.- Estudio de recuperación

Con objeto de comprobar la veracidad del método se realizó la evaluación del porcentaje de recuperación de las fluoroquinolonas estudiadas cuando son añadidas sobre muestras de diversos tipos de leche. Se han utilizado cuatro tipos de leche: cruda, entera, semi-desnatada y desnatada. Las muestras fueron dopadas adicionando volúmenes crecientes de una disolución patrón de 1 µg/mL de concentración de la mezcla de fluoroquinolonas sobre 1 mL de muestra de leche. Los niveles de concentración fueron de 20, 40, 80 y 100 µg/L para CIP, ENR, SAR y DIF, y de 5, 10, 20 y 40 µg/L para DAN. Además, se adiciona a cada una de las muestras dopadas 200 µL de disolución de patrón interno de 1 µg/mL de concentración. Las muestras de leche dopadas se trataron como se ha descrito anteriormente y se inyectan por duplicado.

Para evaluar la recuperación se compararon los valores de concentración obtenidos por interpolación de las áreas de las muestras analizadas en los calibrados de las quinolonas con los valores nominales de concentración con los que se habían fortificado las muestras. A los datos obtenidos se les aplicó el *test de la t de Student* de comparación de una media experimental (concentración encontrada) con un valor conocido (concentración añadida). Los valores de probabilidad *P* (%) calculados fueron mayores del 5%, por tanto, la hipótesis nula fue aceptada en todos los casos, ya que no se encontró diferencias significativas entre la concentración determinada y la añadida en cada caso.

En la *Tabla IV.5* se muestran las recuperaciones obtenidas para cada una de las fluoroquinolonas para cada nivel de concentración ensayado y para cada una de las muestras analizadas.

Tabla IV.5. Recuperaciones de las fluoroquinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student.

FQ	C _{añad} (µg/L)	C (µg/L) / Recuperación (%)			
		t / P (%)			
		Cruda	Entera	Semidesnatada	Desnatada
CIP	20	20.0 ± 0.2 / 100	20.1 ± 0.3 / 101	20.1 ± 0.3 / 101	20.0 ± 0.3 / 100
		0.54 / 61.1	1.04 / 34.6	1.03 / 35.2	0.15 / 88.9
	40	40.1 ± 0.5 / 100	40.1 ± 0.5 / 100	40.1 ± 0.6 / 100	39.9 ± 0.5 / 100
		0.59 / 58.1	0.27 / 79.7	0.29 / 78.1	0.32 / 76.3
	80	79.4 ± 0.8 / 99	80.3 ± 0.7 / 100	79.7 ± 0.8 / 100	80.3 ± 0.8 / 100
		1.01 / 35.8	0.64 / 54.9	0.80 / 45.9	1.04 / 34.6
	100	99.2 ± 1.3 / 99	99.3 ± 1.2 / 99	100.5 ± 0.8 / 101	100.7 ± 1.3 / 101
		1.42 / 21.6	1.35 / 23.6	1.50 / 19.5	1.22 / 27.7
DAN	5	5.1 ± 0.2 / 101	5.1 ± 0.2 / 99	5.0 ± 0.1 / 101	5.0 ± 0.1 / 100
		0.81 / 45.6	0.47 / 66.1	0.67 / 53.0	0.28 / 79.3
	10	10.1 ± 0.2 / 101	9.9 ± 0.2 / 99	9.9 ± 0.2 / 99	10.1 ± 0.2 / 101
		0.73 / 49.7	1.51 / 19.1	0.76 / 48.4	1.05 / 34.1
	20	20.2 ± 0.3 / 101	20.1 ± 0.2 / 101	19.9 ± 0.3 / 99	19.9 ± 0.3 / 99
		1.30 / 25.0	1.23 / 27.2	1.30 / 24.9	1.28 / 25.8
	40	39.8 ± 0.5 / 100	40.3 ± 0.6 / 101	40.4 ± 0.6 / 101	40.5 ± 0.6 / 101
		0.88 / 41.8	1.22 / 27.5	1.39 / 22.3	1.77 / 13.8
ENR	20	19.9 ± 0.2 / 100	19.9 ± 0.3 / 99	20.1 ± 0.2 / 101	20.1 ± 0.1 / 100
		0.73 / 49.7	1.25 / 26.8	1.17 / 29.6	1.39 / 22.4
	40	39.7 ± 0.5 / 99	40.4 ± 0.6 / 101	40.4 ± 0.6 / 101	40.3 ± 0.6 / 101
		1.69 / 15.3	1.46 / 20.4	1.18 / 29.3	0.97 / 37.7

Tabla IV.5. Recuperaciones de las fluoroquinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student. (continuación)

FQ	C _{añad} (µg/L)	C (µg/L) / Recuperación (%)			
		t / P (%)			
		Cruda	Entera	Semidesnatada	Desnatada
ENR	80	80.5 ± 0.9 / 101	79.4 ± 0.8 / 99	80.3 ± 0.8 / 100	79.6 ± 0.8 / 100
		1.45 / 20.7	1.01 / 35.8	0.64 / 54.9	1.33 / 24.2
	100	100.7 ± 1.3 / 101	99.2 ± 1.2 / 99	100.6 ± 1.2 / 101	100.8 ± 1.2 / 101
		1.22 / 27.7	1.69 / 15.2	1.12 / 31.2	1.61 / 19.1
SAR	20	20.0 ± 0.2 / 100	20.1 ± 0.2 / 101	20.1 ± 0.3 / 101	19.9 ± 0.3 / 99
		0.12 / 90.8	1.37 / 22.9	0.94 / 39.1	1.12 / 31.2
	40	40.3 ± 0.5 / 101	39.8 ± 0.6 / 99	40.4 ± 0.6 / 101	39.8 ± 0.5 / 100
		0.87 / 42.2	0.94 / 38.9	1.55 / 18.1	1.16 / 29.9
	80	79.6 ± 0.8 / 100	79.8 ± 0.6 / 100	79.5 ± 0.6 / 99	80.3 ± 0.7 / 100
		1.08 / 33.0	0.90 / 41.1	2.00 / 10.2	1.21 / 28.2
	100	98.8 ± 1.5 / 99	99.3 ± 1.2 / 99	100.7 ± 1.2 / 101	99.4 ± 1.0 / 99
		2.00 / 10.2	1.14 / 30.6	1.41 / 21.7	1.47 / 20.1
DIF	20	19.9 ± 0.2 / 100	19.9 ± 0.2 / 99	20.1 ± 0.2 / 101	20.1 ± 0.2 / 101
		0.73 / 49.7	1.47 / 20.1	1.17 / 29.6	1.37 / 22.9
	40	40.1 ± 0.2 / 100	39.9 ± 0.3 / 100	39.8 ± 0.2 / 100	39.9 ± 0.3 / 100
		1.07 / 33.2	1.26 / 26.2	2.10 / 9.0	1.12 / 31.2
	80	79.6 ± 0.8 / 100	79.5 ± 0.6 / 99	80.1 ± 0.5 / 100	80.4 ± 0.5 / 100
		1.33 / 24.2	2.00 / 10.2	0.71 / 50.9	1.77 / 13.8
	100	100.4 ± 1.2 / 100	100.5 ± 1.5 / 101	100.7 ± 1.2 / 101	99.7 ± 1.2 / 100
		0.88 / 41.8	0.76 / 48.4	1.38 / 22.5	0.63 / 55.9

IV.3.- DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN HUEVO

En esta apartado de la memoria se va a comentar el procedimiento de determinación de quinolonas en muestras de huevo (mezcla de yema y clara) empleando el método cromatográfico anteriormente expuesto (*Capítulo III*). Las muestras de huevo han sido obtenidas de diferentes supermercados de Granada. Nos hemos centrado en el análisis de ciprofloxacina, enrofloxacin, danofloxacina, sarafloxacina, difloxacina, flumequina y ácido oxolínico porque su uso en aves está regulado pero está totalmente prohibido emplearlas en aves cuyos huevos vayan destinados al consumo humano por lo que no hay establecidos valores de LMR. Por tanto, necesitamos metodologías analíticas que sean muy sensibles para poder cuantificar estas quinolonas a valores de concentración muy bajos, del orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

IV.3.1.- Condiciones cromatográficas

El método cromatográfico utilizado para el análisis de CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, FLU y OXO, utilizando la NOR como patrón interno ha sido descrito en el *Capítulo III*. Las condiciones cromatográficas en las que se llevaron a cabo las medidas son las que se muestran a continuación:

- ✚ *Columna Zorbax Eclipse XDB C₈, (150 mm x 4.6 mm, 5 μm).*
- ✚ *Pre-columna Eclipse XDB-C₈ (12.5 mm x 4.6 mm).*
- ✚ *Mezcla acetonitrilo-disolución reguladora de citrato amónico/ácido cítrico 0.010 M de pH 4.5.*
- ✚ *Gradiente de composición (Tabla IV.6).*
- ✚ *Flujo: 1.5 mL/min.*
- ✚ *Volumen de inyección: 20 μL .*
- ✚ *Longitud de onda de excitación y de emisión: 280/450 nm, respectivamente, salvo para el ácido oxolínico y la flumequina que fue 325/365 nm.*
- ✚ *Tiempo de análisis: 25 min.*

Tabla IV.6. Composición del gradiente.

t (min)	Acetonitrilo (%)
0	12
10 - 15	12 - 30
15 - 18	30
18 - 19	30 - 12
19 - 25	12

IV.3.2.- Tratamiento de la muestra

En la bibliografía podemos encontrar diferentes procedimientos para la extracción de quinolonas en huevo. El procedimiento propuesto por **Gorla y col.**⁹ consiste en la extracción de enrofloxacin y de su metabolito, ciprofloxacina, de la yema y la clara de huevo utilizando una doble extracción con acetonitrilo y centrifugación. Las recuperaciones obtenidas fueron bajas: 36-50% para CIP y 49-85% para ENR. Para la separación y detección utilizan la cromatografía líquida con detección UV. **Maxwell y col.**¹¹ desarrollan un método para la determinación del sarafloxacin en huevo, clara mas yema, usando el sistema “Automated sequential trace enrichment of dialysates” (ASTED) para la extracción y la cromatografía líquida con detección fluorescente para la separación y detección. La recuperación del método fue del 87-102% y el límite de cuantificación de 1 µg/kg. Otros autores han utilizado también este sistema para la extracción de quinolonas en muestras de huevo. Así, **Schneider y Donoghue**¹² propusieron un método para la determinación de seis fluoroquinolonas en huevo mediante cromatografía líquida con detección fluorescente, obteniendo una buena sensibilidad y unas recuperaciones satisfactorias (65-110%). Sin embargo, es un sistema que actualmente pocos laboratorios pueden utilizar.

Gigosos y col.¹³ desarrollan un método de cromatografía líquida con detección UV para la determinación simultánea de cuatro fluoroquinolonas (CIP, DIF, ENR y MAR) en riñón y músculo de vaca y en huevos previa extracción mediante extracción en fase sólida. El procedimiento consiste en tratar las muestras con HCl 1 M en un baño de ultrasonidos.

Posteriormente se centrifuga y se hace pasar la fase sobrenadante por cartuchos de Sep-Pak C18 acondicionados previamente. La elución se realiza con la mezcla metanol:tampón fosfato (1:1). Se evapora hasta un volumen y se inyecta.

El método descrito por *Rose y col.*¹⁰ describe un procedimiento para la determinación de ocho fluoroquinolonas (CIP, ENR, DAN, SAR, MARB, FLU, lomefloxacina, NOR y ofloxacina) y de tres quinolonas ácidas (enoxacina, flumequina y oxolínico). Sin embargo, la determinación no es simultánea, si no que requiere múltiples análisis por cromatografía líquida, varios procedimientos de extracción y solamente cuatro compuestos fueron determinados simultáneamente.

*Shim y col.*¹⁴ emplean fluidos supercríticos (CO₂) para la extracción de CIP, ENR, ofloxacina y NOR de las muestras de huevo y posterior separación y determinación mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Las recuperaciones fueron del orden del 83-96%.

En 2003, *Schneider y Donoghue*¹² desarrollaron un método de LC-FD-MSⁿ para la determinación de ocho fluoroquinolonas en la yema y clara de huevo. A las muestras se le añade acetonitrilo y amoníaco concentrado, y se centrifuga. El sobrenadante se transfiere a otros tubos de centrifuga a los que se le añade agua, hexano, éter dietílico y disolución de cloruro sódico. Después de una agitación la fase inferior se trasvasa a un tubo y se evapora. Finalmente se reconstituye y se inyecta. Se obtienen buenas recuperaciones para siete de los ocho compuestos, sin embargo, las recuperaciones para la CIP y NOR fueron relativamente bajas, del orden del 55% y 65%, respectivamente.

Recientemente, *Zeng y col.*¹⁶ han propuesto un método para la determinación de DIF, SAR, ENR, CIP, DAN, lomefloxacina, pefloxacina, NOR y ofloxacina en huevo (yema, clara y mezcla) mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Las muestras son tratadas con etanol:ácido acético (99:1; v/v) en el caso de las claras de huevo o con acetonitrilo y etanol:ácido acético (99:1; v/v) para el caso de las yemas de huevo. Se centrifuga y el sobrenadante es trasvasado a otro tubo de centrifuga donde se procede a la evaporación mediante corriente de nitrógeno a 78 °C. El residuo se redissuelve con acetonitrilo, y a continuación, se tratan con hexano para eliminar la grasa, una vez para la clara y dos veces para la yema. Se transfiere la fase inferior a un tubo y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve con fase móvil. Buenas recuperaciones fueron obtenidas, del orden del 75-90%, para las fluoroquinolonas estudiadas. Los límites de cuantificación obtenidos oscilan entre 5 y 20 µg/kg.

Después de una extensa investigación sobre los procedimientos publicados para la extracción de quinolonas en huevo se ha decidido emplear un procedimiento semejante al propuesto en el apartado para la determinación de fluoroquinolonas en leche que se basa en el presentado por *Idowu y Peggins*⁸. Se ha realizado una modificación al procedimiento anteriormente descrito debido a que en medio ácido las quinolonas ácidas (FLU y OXO) son extraídas por el hexano con la consiguiente disminución de sus recuperaciones. Por esta razón, se optó por sustituir el ácido o-fosfórico por amoníaco. En las Figuras IV.5, IV.6 y IV.7 se muestran la influencia sobre la recuperación para cada una de las quinolonas estudiadas del volumen de amoníaco (Figura IV.5), del volumen de acetonitrilo (Figura IV.6) y del volumen de diclorometano (Figura IV.7). Las condiciones iniciales para cada uno de los estudios han sido las siguientes: a) Influencia del volumen de amoníaco: 2 mL de acetonitrilo y 3 mL de diclorometano; b) Influencia del volumen de acetonitrilo: 250 μ L de amoníaco y 3 mL de diclorometano; y c) Influencia del volumen de diclorometano: 250 μ L de amoníaco y 2 mL de acetonitrilo. Del análisis de las figuras mencionadas resultan los valores óptimos para la extracción de las quinolonas en estudio: 250 μ L de amoníaco, 2 mL de acetonitrilo y 4 mL de diclorometano.

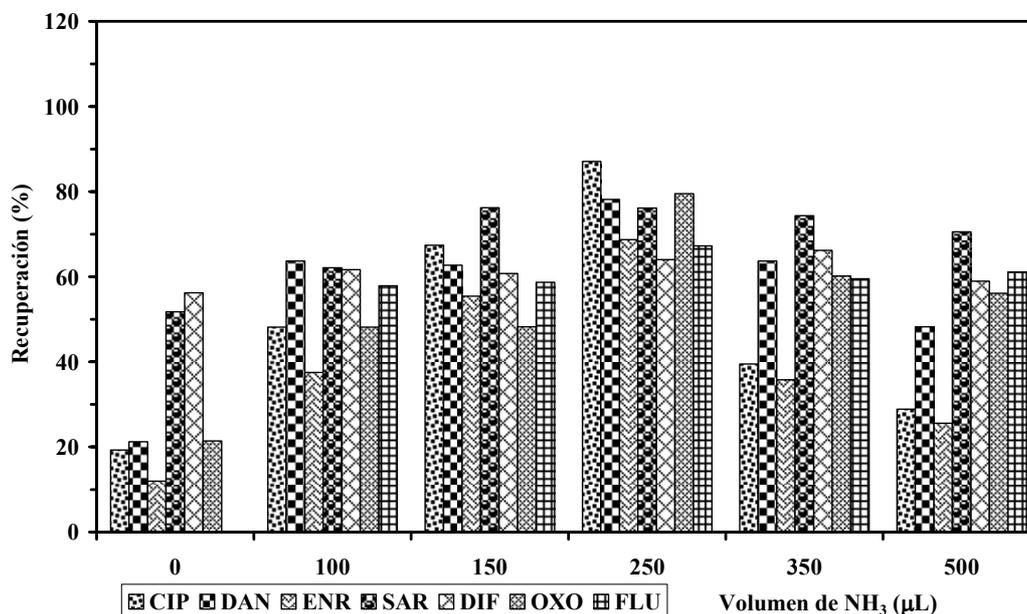


Figura IV.5. Influencia del volumen de amoníaco.

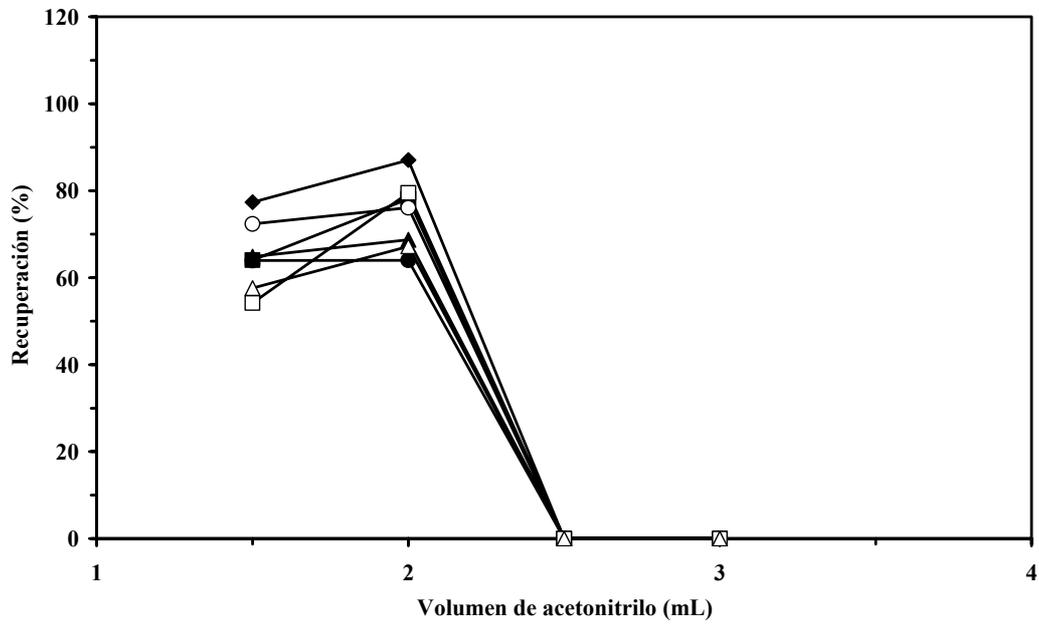


Figura IV.6. Influencia del volumen de acetonitrilo.
 (◆: CIP; ■: DAN; ▲: ENR; ○: SAR; ●: DIF; □: OXO; △: FLU)

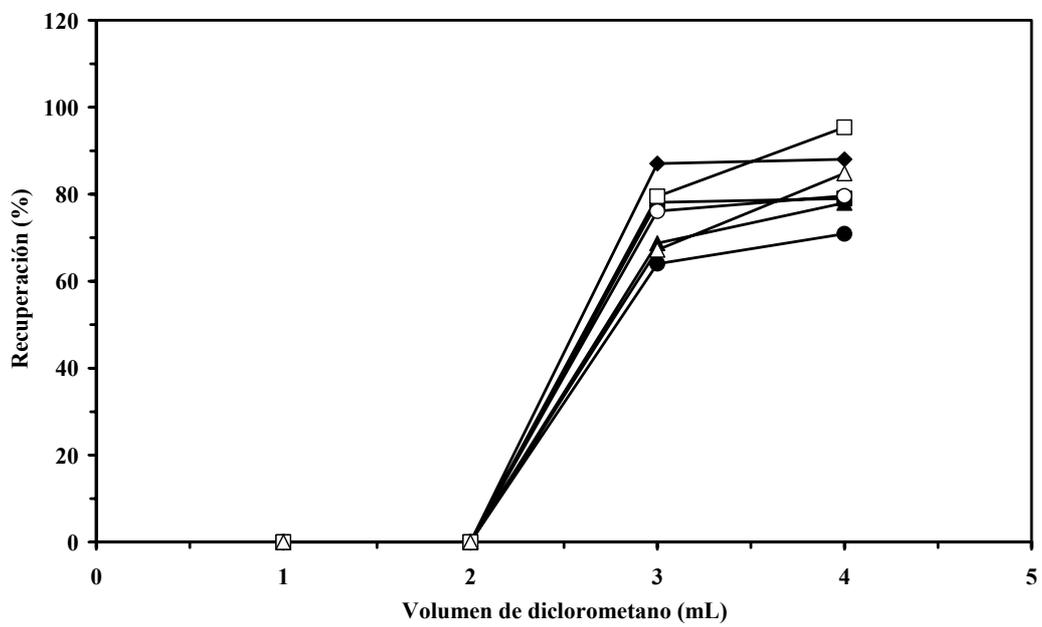


Figura IV.7. Influencia del volumen de diclorometano.
 (◆: CIP; ■: DAN; ▲: ENR; ○: SAR; ●: DIF; □: OXO; △: FLU)

La descripción completa del procedimiento es la siguiente: 1) Se pesa 1 g de muestra de huevo que previamente se ha homogeneizado en un tubo de centrifuga de 10 mL y se añade 100 µL de disolución de 1 mg/L de norfloxacin (patrón interno); 2) Se añade 250 µL de amoniaco y se agita la mezcla durante 10 s; 3) A continuación, se añaden 2 mL de acetonitrilo para precipitar las proteínas; 4) La mezcla se agita durante 10 s y se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m.; 5) La fase sobrenadante se decanta en otro tubo de centrifuga de 10 mL, se añade 4 mL de diclorometano y se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 10 min; 6) La fase acuosa (sobrenadante) se transfiere con una pipeta Pasteur a un vial para ser inyectada.

Los cromatogramas correspondientes a una mezcla de las quinolonas estudiadas, un blanco de huevo y una muestra fortificada con las quinolonas se muestran en la *Figura IV.8*.

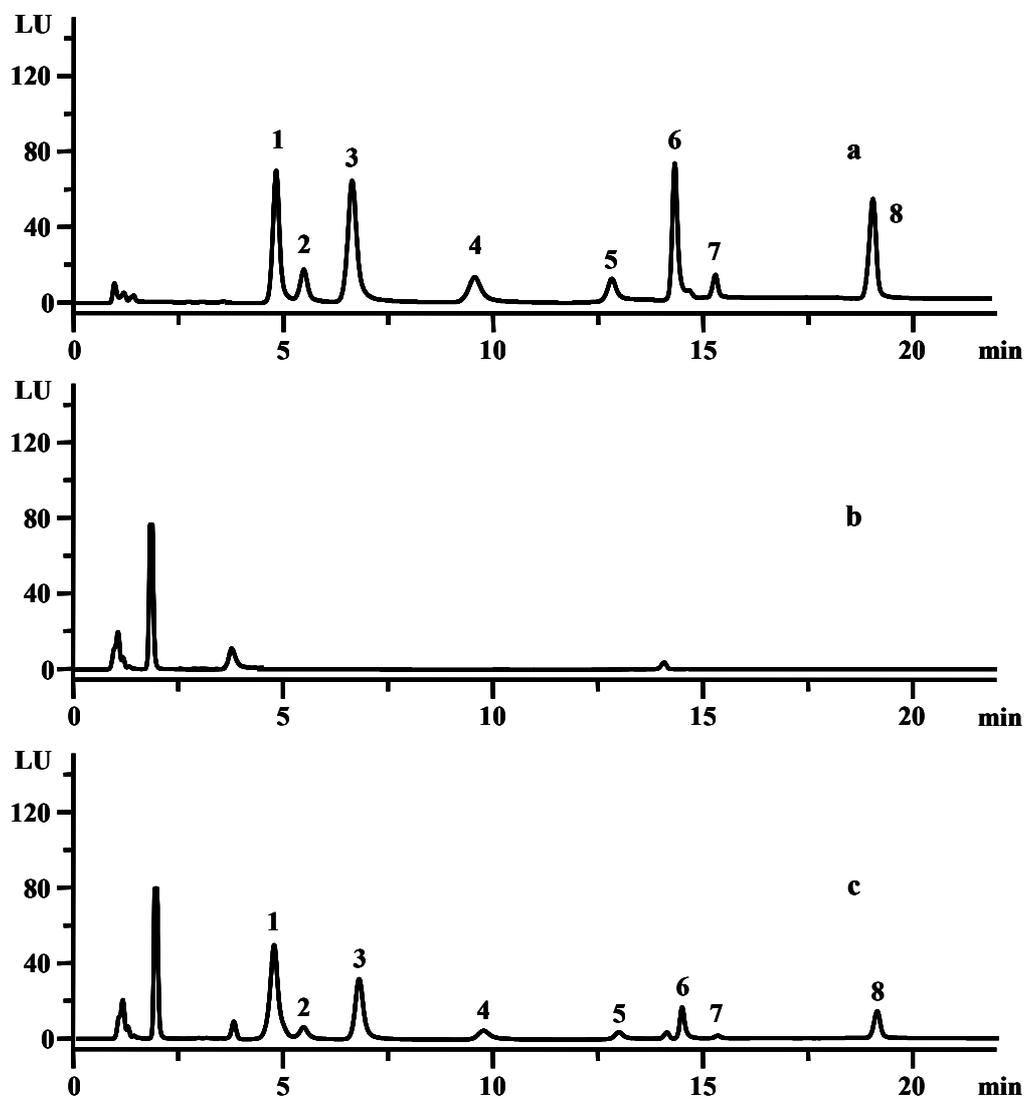


Figura IV.8. Cromatogramas: (a) de una mezcla estándar de quinolonas; (b) de un extracto de huevo; (c) de una muestra de huevo fortificada. ① NOR, ② CIP, ③ DAN, ④ ENR, ⑤ SAR, ⑥ DIF, ⑦ OXO y ⑧ FLU.

IV.3.3.- Parámetros analíticos

IV.3.3.1.- Establecimiento y verificación del modelo

En estudios previos se comprobó la existencia de efecto matriz para algunas fluoroquinolonas por lo que se preparó un calibrado de adición de patrón. Para establecer las correspondientes curvas de calibración en muestras de leche se prepararon por triplicado una serie de tubos de ensayo que contenían 1 g de huevo previamente homogeneizado y se le adicionaron volúmenes crecientes de una disolución patrón que contenía la mezcla de quinolonas, con una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, preparadas en etanol y un volumen constante de 200 μL de disolución de patrón interno (NOR) con una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. Las concentraciones preparadas para CIP, ENR, SAR, DIF, OXO y FLU fueron de 50 a 300 $\mu\text{g/kg}$, y de 25 a 150 $\mu\text{g/kg}$ para DAN. A continuación se aplicó el procedimiento de tratamiento de muestra anteriormente descrito. En la *Tabla IV.7* se presentan los parámetros analíticos para cada uno de los calibrados. El test de *lack-of-fit* fue utilizado para comprobar la linealidad de las curvas de calibración.

Tabla IV.7. Parámetros del calibrado de cada una de las quinolonas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
a	-0.0120	-0.0039	-0.0013	0.0063	-0.0071	-0.0011	-0.0011
S_a	0.0070	0.0050	0.0122	0.0034	0.0051	0.0011	0.0012
b (kg/μg)	0.0040	0.0170	0.0040	0.0010	0.0030	0.0004	0.0009
S_b	0.0001	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
R² (%)	0.9983	0.9989	0.9989	0.9968	0.9979	0.9967	0.9988
S_{R,C}	0.013	0.023	0.009	0.006	0.009	0.002	0.002
Rec (%)	88.0	79.0	78.0	79.6	70.9	95.4	84.8
P (%)	31.8	97.5	61.8	95.5	39.3	79.8	63.2

Finalmente, para evaluar el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales. En todos los casos se cumple la condición de homocedasticidad.

IV.3.3.2.- Parámetros de calidad del método analítico

Para establecer los parámetros de calidad del método de determinación de quinolonas en huevo se ha seguido el mismo procedimiento descrito en el *Capítulo II*. Se ha determinado el *rango dinámico lineal (RDL)*. *Linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y sensibilidad*. La precisión del método viene establecida por la *desviación estándar relativa (DER)* en el estudio de la repetibilidad y de la reproducibilidad. En la *Tabla IV.10* se recogen todos los resultados.

Tabla IV.10. Parámetros de calidad de las quinolonas estudiadas.

	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	9	4	7	12	10	12	7
LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	29	12	23	40	32	41	24
RDL ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	29 - 300	12 - 150	23 - 300	40 - 300	32 - 300	41 - 300	24 - 300
Lin (%)	99.4	97.9	98.3	98.94	99.3	97.5	98.2
DER_{Reprod} (%)	2 - 6	4 - 5	2 - 4	2 - 6	3 - 4	2 - 3	2 - 4
DER_{Repet} (%)	4	5	4	4	3	3	3

IV.3.3.3.- Estudio de recuperación

Con objeto de comprobar la veracidad del método se realizó la evaluación de la recuperación de las quinolonas cuando son añadidas sobre muestras de huevo a diferentes concentraciones. Las muestras fueron dopadas adicionando volúmenes crecientes de una disolución patrón de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración de la mezcla de quinolonas sobre 1 g de muestra de huevo homogeneizado. Los niveles de concentración fueron de 50, 100, 150 y

200 µg/kg para CIP, ENR, SAR, DIF, OXO y FLU, y de 20, 40, 80 y 150 µg/kg para DAN. Además, se adiciona a cada una de las muestras fortificadas 200 µL de disolución de patrón interno de 1 µg/mL de concentración. Las muestras de huevo dopadas se prepararon por triplicado t se trataron como se ha descrito anteriormente, inyectándose posteriormente por duplicado. Para evaluar la recuperación se compararon los valores de concentración obtenidos por interpolación de las áreas de las muestras analizadas en los calibrados de las quinolonas con los valores nominales de concentración con los que se habían fortificado las muestras.

A los datos obtenidos se les aplicó el *test de la t de Student* de comparación de una media experimental (concentración encontrada) con un valor conocido (concentración añadida). Los valores de probabilidad *P* (%) calculados fueron mayores del 5%, por tanto, la hipótesis nula fue aceptada en todos los casos, ya que no se encontró diferencias significativas entre la concentración determinada y la añadida en cada caso. En la *Tabla IV.11* se muestran las recuperaciones obtenidas para cada una de las quinolonas estudiadas para cada nivel de concentración ensayado y para cada una de las muestras analizadas.

Tabla IV.11. Recuperaciones de las fluoroquinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student.

Q	C _{añad} (µg/kg)	C (µg/kg) / Recuperación (%) t / P (%)			
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
CIP	50	50.8 ± 0.4 / 100	50.0 ± 0.8 / 100	49.8 ± 0.6 / 100	49.8 ± 0.7 / 100
		1.4 / 22.4	0.1 / 90.8	0.7 / 50.1	0.7 / 49.5
	100	99.8 ± 1.2 / 100	100.1 ± 1.1 / 100	99.5 ± 1.1 / 99	99.7 ± 0.6 / 100
		0.5 / 63.0	0.3 / 79.7	1.2 / 29.9	1.3 / 26.2
	150	151.8 ± 2.4 / 101	150.6 ± 2.3 / 100	151.0 ± 1.7 / 100	149.2 ± 1.5 / 100
		1.8 / 13.4	0.6 / 54.9	1.5 / 20.7	1.3 / 24.2
	200	201.0 ± 2.1 / 100	200.9 ± 2.4 / 100	198.3 ± 2.5 / 99	201.3 ± 2.6 / 101
		1.2 / 30.0	0.9 / 41.8	1.7 / 15.2	1.2 / 27.7
DAN	20	20.1 ± 0.1 / 100	20.0 ± 0.3 / 100	19.9 ± 0.2 / 100	20.2 ± 0.6 / 101
		1.3 / 26.8	0.1 / 90.8	0.7 / 50.3	0.8 / 45.6
	40	40.1 ± 0.2 / 100	40.4 ± 0.8 / 101	40.3 ± 0.7 / 100	39.8 ± 0.5 / 99
		1.1 / 33.2	1.2 / 29.3	0.9 / 42.2	1.2 / 29.9
	80	80.4 ± 0.5 / 100	79.4 ± 1.4 / 99	80.1 ± 0.6 / 99	79.4 ± 1.2 / 99
		1.7 / 15.4	1.0 / 35.8	1.0 / 35.8	1.3 / 25.8
	150	149.2 ± 1.7 / 99	150.7 ± 0.9 / 100	151.3 ± 2.3 / 101	149.6 ± 1.2 / 100
		1.2 / 29.0	1.8 / 13.7	1.4 / 22.3	0.9 / 41.1
ENR	50	50.2 ± 0.4 / 100	49.6 ± 0.7 / 99	50.1 ± 0.41 / 100	49.7 ± 0.6 / 99
		0.8 / 45.0	1.3 / 26.8	0.9 / 39.5	1.0 / 35.5
	100	99.2 ± 1.2 / 99	100.1 ± 1.0 / 100	100.8 ± 1.3 / 101	99.9 ± 0.9 / 100
		1.7 / 15.3	0.2 / 82.1	1.5 / 19.0	0.3 / 75.9

Tabla IV.11. Recuperaciones de las fluoroquinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student. (continuación)

Q	C _{añad} (µg/kg)	C (µg/kg) / Recuperación (%) t / P (%)			
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
ENR	150	150.7 ± 1.4 / 100	149.6 ± 1.8 / 100	150.7 ± 1.6 / 101	150.5 ± 1.4 / 100
		1.1 / 31.0	0.6 / 57.8	1.1 / 32.6	0.9 / 20.4
	200	199.5 ± 2.6 / 100	201.0 ± 2.1 / 101	201.1 ± 2.4 / 101	201.4 ± 2.4 / 101
		0.5 / 65.8	1.2 / 29.6	1.1 / 31.2	1.4 / 22.5
SAR	50	49.7 ± 0.5 / 99	49.8 ± 0.7 / 100	50.3 ± 0.7 / 101	49.6 ± 0.7 / 99
		1.5 / 20.1	0.8 / 47.4	1.0 / 39.1	1.5 / 19.2
	100	99.4 ± 0.8 / 99	99.8 ± 1.2 / 100	99.6 ± 0.9 / 100	100.6 ± 1.2 / 101
		1.7 / 15.6	0.4 / 73.1	1.0 / 37.6	1.3 / 25.5
	150	149.3 ± 1.6 / 100	150.6 ± 1.5 / 100	149.4 ± 1.3 / 100	149.2 ± 1.2 / 100
		1.1 / 33.0	0.9 / 39.9	1.1 / 32.2	1.6 / 17.7
	200	200.6 ± 1.5 / 100	201.1 ± 2.3 / 101	200.5 ± 1.9 / 100	198.8 ± 1.9 / 99
		0.9 / 40.9	1.2 / 28.7	0.7 / 51.4	1.5 / 20.1
DIF	50	49.8 ± 0.6 / 100	49.7 ± 0.5 / 99	50.1 ± 0.7 / 100	49.9 ± 0.6 / 100
		0.7 / 50.0	1.5 / 20.1	0.4 / 70.6	0.6 / 57.7
	100	100.3 ± 0.9 / 100	99.8 ± 0.8 / 100	99.7 ± 0.9 / 100	99.6 ± 0.8 / 100
		0.7 / 59.6	0.7 / 54.3	0.8 / 46.5	1.1 / 31.2
	150	149.7 ± 0.9 / 100	150.6 ± 1.0 / 100	149.5 ± 1.3 / 100	149.4 ± 1.0 / 100
		0.8 / 44.3	1.1 / 21.9	0.9 / 41.7	1.5 / 18.7
	200	200.9 ± 2.4 / 100	199.4 ± 2.3 / 100	200.9 ± 2.9 / 100	201.4 ± 2.4 / 101
		0.9 / 41.8	0.6 / 55.9	0.8 / 48.4	1.4 / 22.5

Tabla IV.11. Recuperaciones de las fluoroquinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student. (continuación)

Q	C _{añad} (µg/kg)	C (µg/kg) / Recuperación (%) t / P (%)			
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
OXO	50	49.8 ± 0.5 / 100	50.2 ± 0.5 / 100	49.8 ± 0.4 / 100	50.1 ± 0.4 / 100
		1.1 / 34.0	1.0 / 34.6	1.1 / 21.4	0.6 / 60.3
	100	100.6 ± 1.1 / 101	99.7 ± 0.6 / 100	100.5 ± 0.8 / 101	99.7 ± 1.2 / 100
		1.4 / 22.5	1.3 / 26.2	1.5 / 19.5	0.6 / 55.9
	150	150.4 ± 1.6 / 100	150.9 ± 1.5 / 100	150.3 ± 0.9 / 100	149.8 ± 1.0 / 100
		0.7 / 53.8	1.4 / 23.2	0.7 / 52.5	0.4 / 69.0
	200	199.4 ± 2.3 / 100	199.6 ± 2.2 / 100	200.7 ± 2.3 / 100	200.3 ± 1.9 / 100
		0.6 / 55.9	0.5 / 64.9	0.8 / 47.9	0.3 / 74.8
FLU	50	50.2 ± 0.6 / 100	50.0 ± 0.4 / 100	49.9 ± 0.6 / 100	49.9 ± 0.6 / 100
		0.7 / 50.1	0.3 / 79.3	0.6 / 56.2	0.5 / 61.1
	100	100.8 ± 1.2 / 100	99.5 ± 0.8 / 99	99.8 ± 1.2 / 100	100.1 ± 1.1 / 100
		0.3 / 79.7	1.5 / 18.9	0.5 / 63.0	0.3 / 79.7
	150	149.3 ± 1.4 / 99	150.3 ± 1.8 / 100	149.6 ± 1.3 / 100	150.6 ± 1.3 / 100
		1.2 / 30.1	0.4 / 73.3	0.7 / 52.0	1.0 / 34.5
	200	199.5 ± 1.9 / 100	199.3 ± 1.6 / 100	200.9 ± 1.5 / 101	200.8 ± 1.9 / 100
		0.7 / 51.6	1.1 / 33.1	1.5 / 19.5	1.0 / 36.7

CAPÍTULO V

**DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN
MUESTRAS DE CERDO Y DE TERNERA**

V.1.- INTRODUCCIÓN

En este último capítulo de la Memoria se va a abordar la determinación de quinolonas en músculo y riñón de cerdo, y en músculo de ternera mediante cromatografía líquida con detección fluorescente previa extracción de los analitos de las muestras. Las quinolonas objeto de estudio se han seleccionado en base a los datos de LMR establecidos por la EMEA. En la *Tabla V.1* se muestran los valores de los LMR establecidos en músculo y riñón de cerdo y en músculo de ternera. Para la SAR no hay publicados ningún dato de LMR en las muestras objeto de estudio. Sin embargo, se ha introducido en el estudio debido a que es el principal metabolito de la DIF y a que puede ser administrado de forma intencionada aunque su uso no esté permitido para el ganado bovino y porcino.

Los métodos que aparecen en bibliografía para la determinación de quinolonas en muestras de músculo de cerdo y de ternera, y de riñón de cerdo son escasos. Los métodos para la determinación de quinolonas en muestras de músculo de cerdo que aparecen en bibliografía son los establecidos por *Delepine y col.*¹ para la determinación de seis quinolonas mediante LC-MS, y por *Hermo y col.*^{2,3} que determinan las ocho quinolonas

¹ *Delepine B., Hurtaud-Pessel D., Sanders P., Analyst, 123 (1998) 2743.*

² *Hermo M.P., Barrón D., Barbosa J., J. Chromatogr. A, 1104 (2006) 132.*

³ *Hermo M.P., Barrón D., Barbosa J., Anal. Chim. Acta, 539 (2005) 77.*

reguladas por la Unión Europea para este tipo de muestras mediante LC-DAD, LC-MS y LC-MS/MS.

En el caso de los métodos para la determinación de quinolonas en muestras de riñón que aparecen en la bibliografía tenemos los establecidos por **Toussaint y col.**^{4,5,6,7} para la determinación de once quinolonas mediante LC-MS/MS y el propuesto por **Verdou y col.**⁸ mediante LC-FD para la determinación de diez quinolonas. Además, existen otros métodos propuestos para este tipo de muestras mediante GC-MS⁹ y CE-DAD¹⁰ para la determinación de cuatro y siete quinolonas, respectivamente.

Con respecto al músculo de bovino solo se han encontrado dos métodos, que son los establecidos por **van Hoof y col.**¹¹ para la determinación de ocho quinolonas mediante LC-MS/MS, y por **Nagata y col.**¹² para la determinación de trece quinolonas mediante LC-DAD y LC-FD.

⁴ van Vyncht G., Janosi A., Bordin G., Toussaint B., Maghuin-Rogister G., De Pauw E. Rodriguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 952 (2002) 121.

⁵ Toussaint B., Bordin G., Janosi A., Rodriguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 195.

⁶ Toussaint B., Chedin M., Bordin G., Rodriguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 32.

⁷ Toussaint B., Chedin M., Vincent U., Bordin G., Rodriguez A.R., *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 40.

⁸ Verdon E., Couedor P., Roudaut B., Sanders P., *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1179.

⁹ Asami S., Hatsugai K., Osawa K., Nakabayashi Y., Nakajima T., *Nippon Juishikai Zasshi*, 53 (2000) 225.

¹⁰ Hernández M., Borrull F., Calull M., *Electrophoresis*, 23 (2002) 506.

¹¹ Van Hoof, N., De Wasch, K., Okerman, L., Reybroeck, W., Poelmans, S., Noppe, H., De Brabander, H., *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 265.

¹² Nagata T., Hasegawa Y., Ashizawa, E., Hashimoto H., *Chiba-ken Eisei Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, 28 (2005) 1.

Tabla V.1. Límite Máximo de Residuos (LMR) establecidos por la EMEA para las quinolonas en ganado porcino y bovino.

	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	Músculo de cerdo	Riñón de cerdo	Músculo de ternera
MAR	150	150	150
CIP + ENR	100	300	100
DAN	100	200	200
SAR	-----	-----	-----
DIF	400	800	400
OXO	100	150	100
FLU	200	1500	200

V.2.- DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN MUESTRAS DE CERDO Y DE TERNERA

V.2.1.- Condiciones cromatográficas

El método cromatográfico utilizado para el análisis de estas quinolonas (MAR, CIP, DAN, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU y NOR como patrón interno) ha sido descrito en el *Capítulo III*. Aunque se analiza una quinolona más, la marbofloxacina (MAR), no ha sido necesario introducir ningún cambio en la composición y pH de la fase móvil, ni en el gradiente. El único cambio ha sido en el sistema de detección al introducir las longitudes de onda de excitación y de emisión de la marbofloxacina. Las condiciones cromatográficas en las que se llevaron a cabo las medidas son las que se muestran a continuación:

- ✚ *Columna Zorbax Eclipse XDB C₈, (150 mm x 4.6 mm, 5 μm).*
- ✚ *Pre-columna Eclipse XDB-C₈ (12.5 mm x 4.6 mm).*
- ✚ *Mezcla acetonitrilo-disolución reguladora de citrato amónico/ácido cítrico 0.010 M de pH 4.5.*
- ✚ *Gradiente de composición (Tabla V.2).*
- ✚ *Flujo: 1.5 mL/min.*
- ✚ *Volumen de inyección: 20 μL.*
- ✚ *Longitud de onda de excitación y de emisión: 280/450 nm, respectivamente, salvo para el ácido oxolínico y la flumequina que fue 325/365 nm, y para marbofloxacina 290/495 nm.*
- ✚ *Tiempo de análisis: 25 min.*

Tabla V.2. Composición del gradiente.

t (min)	Acetonitrilo (%)
0	12
10 - 15	12 - 30
15 - 18	30
18 - 19	30 - 12
19 - 25	12

V.2.2.- Tratamiento de la muestra

El procedimiento aplicado para el tratamiento de las diferentes muestras objeto de estudio se ha descrito anteriormente en el *Capítulo III*. Consta de dos etapas: a) Extracción de las quinolonas de las muestras de carne; y b) Extracción en fase sólida. A continuación se describen ambas etapas.

a) Extracción de la carne:

Se introducen 5 g de músculo de cerdo o de ternera, o 1 g de riñón de cerdo en tubos de centrífuga de plástico de 50 mL de capacidad y se les añade 25 mL de una mezcla de acetonitrilo y ácido m-fosfórico al 0.3% en agua (25:75; v/v). A continuación se agitan y se introduce los tubos en un baño de ultrasonidos para favorecer la disgregación de las muestras y el paso de las quinolonas a la fase líquida. Para separar perfectamente las dos fases se utiliza una centrífuga a 4000 r.p.m. durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se procede a la separación de ambas fases mediante decantación. El residuo sólido se trata nuevamente con 10 mL de la mezcla de acetonitrilo y ácido m-fosfórico siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Los dos extractos (fase líquida) se unen y se filtran a través de filtros de PVDF de 0.22 μm . Por último, se diluye el filtrado con agua desionizada hasta obtener una disolución con un contenido en acetonitrilo igual o inferior al 8% y se procede a la extracción en fase sólida. Un porcentaje superior al 8% provocaría la pérdida de las quinolonas en la etapa de la carga en el procedimiento de la extracción en fase sólida. El esquema del procedimiento se muestra en la *Figura V.1*.

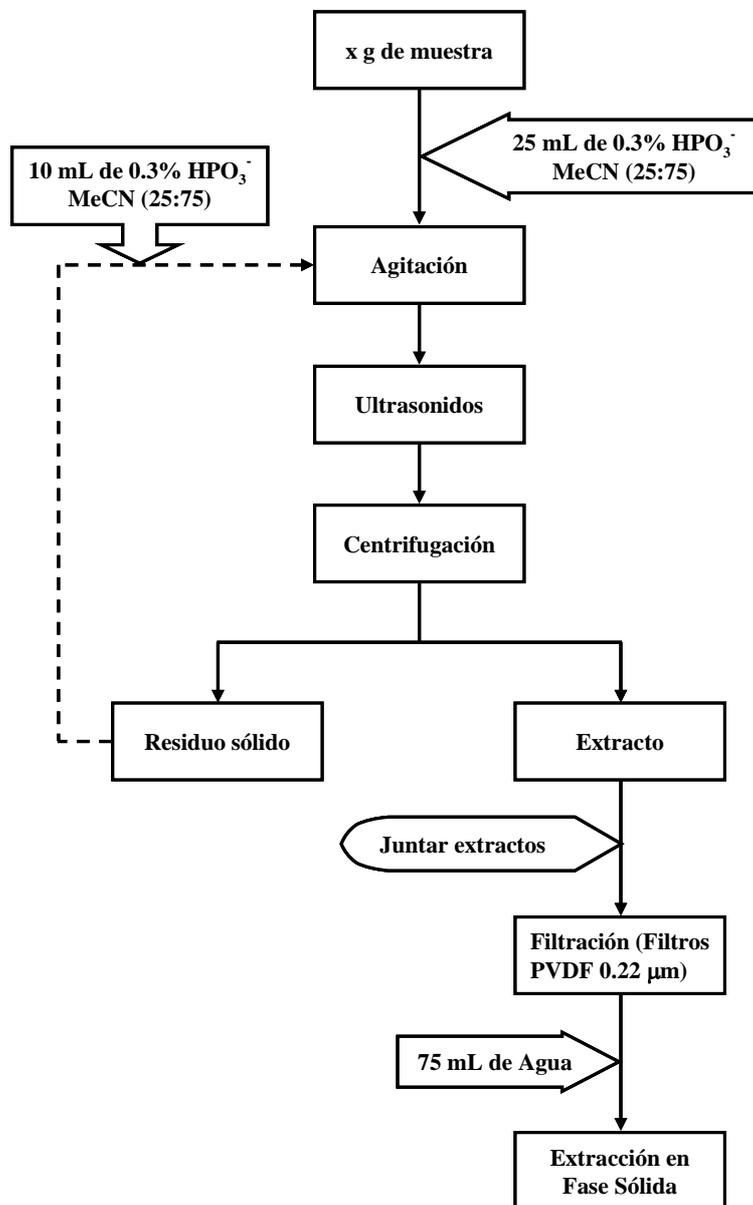


Figura V.1. Esquema del tratamiento de extracción de las quinolonas de las muestras de cerdo y de ternera. ($x = 5$ g de músculo de cerdo o de ternera; $x = 1$ g de riñón de cerdo)

b) Extracción en fase sólida:

El procedimiento de extracción en fase sólida que se empleó fue el siguiente: A) Acondicionamiento: 2 mL de metanol, 2 mL de agua y 2 mL de una disolución de ácido *o*-fosfórico 50 mM a pH 3. B) Carga: se realiza la carga de la disolución obtenida en la etapa de extracción descrito anteriormente. C) Lavado: las columnas fueron lavadas con 2 mL de agua desionizada, 4 mL de una disolución al 1% de ácido fórmico/metanol (60:40; v/v) y 5 mL de hexano. D) Elución: La elución de los analitos se llevó a cabo con 5 mL de una disolución al 2% de ácido trifluoroacético en agua y acetonitrilo (25:75; v/v), seguido de 1 mL de acetonitrilo. Los eluatos fueron evaporados hasta sequedad con nitrógeno a una temperatura de 50 °C. Por último, se reconstituyó el extracto con 1 mL de fase móvil (acetonitrilo/disolución reguladora de citrato).

Los cromatogramas correspondientes a una mezcla estándar de quinolonas, un extracto de muestra y un extracto de muestra fortificada con quinolonas se muestran en las *Figura V.2 (músculo de cerdo)*, *Figura V.3 (músculo de ternera)* y *Figura V.4 (riñón de cerdo)*.

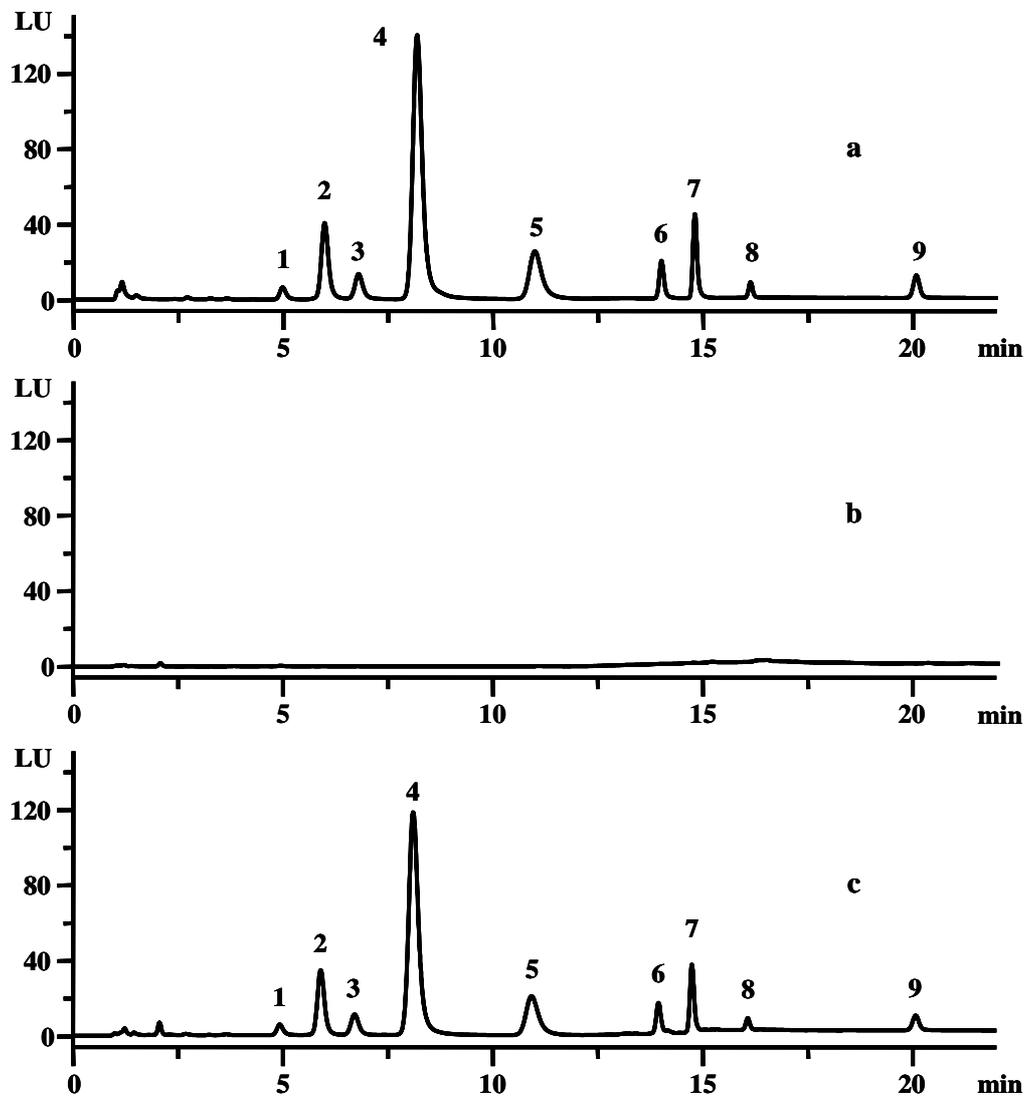


Figura V.2. Cromatogramas: (a) de una mezcla estándar de quinolonas; (b) extracto de una muestra de músculo de cerdo; (c) muestra de músculo de cerdo fortificada.
① MAR, ② NOR, ③ CIP, ④ DAN, ⑤ ENR, ⑥ SAR, ⑦ DIF, ⑧ OXO y ⑨ FLU.

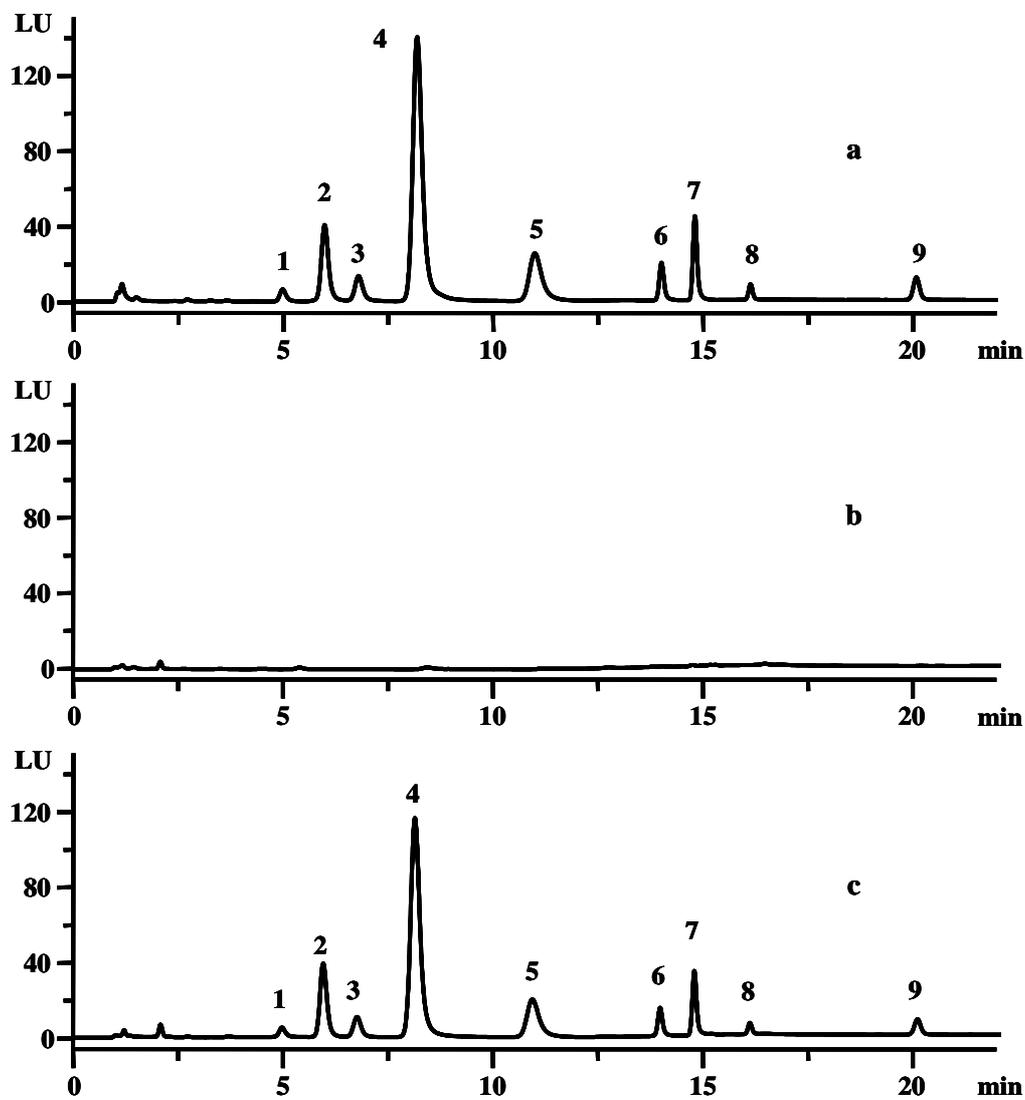


Figura V.3. Cromatogramas: (a) de una mezcla estándar de quinolonas; (b) extracto de una muestra de músculo de ternera; (c) muestra de músculo de ternera fortificada.

① MAR, ② NOR, ③ CIP, ④ DAN, ⑤ ENR, ⑥ SAR, ⑦ DIF, ⑧ OXO y ⑨ FLU

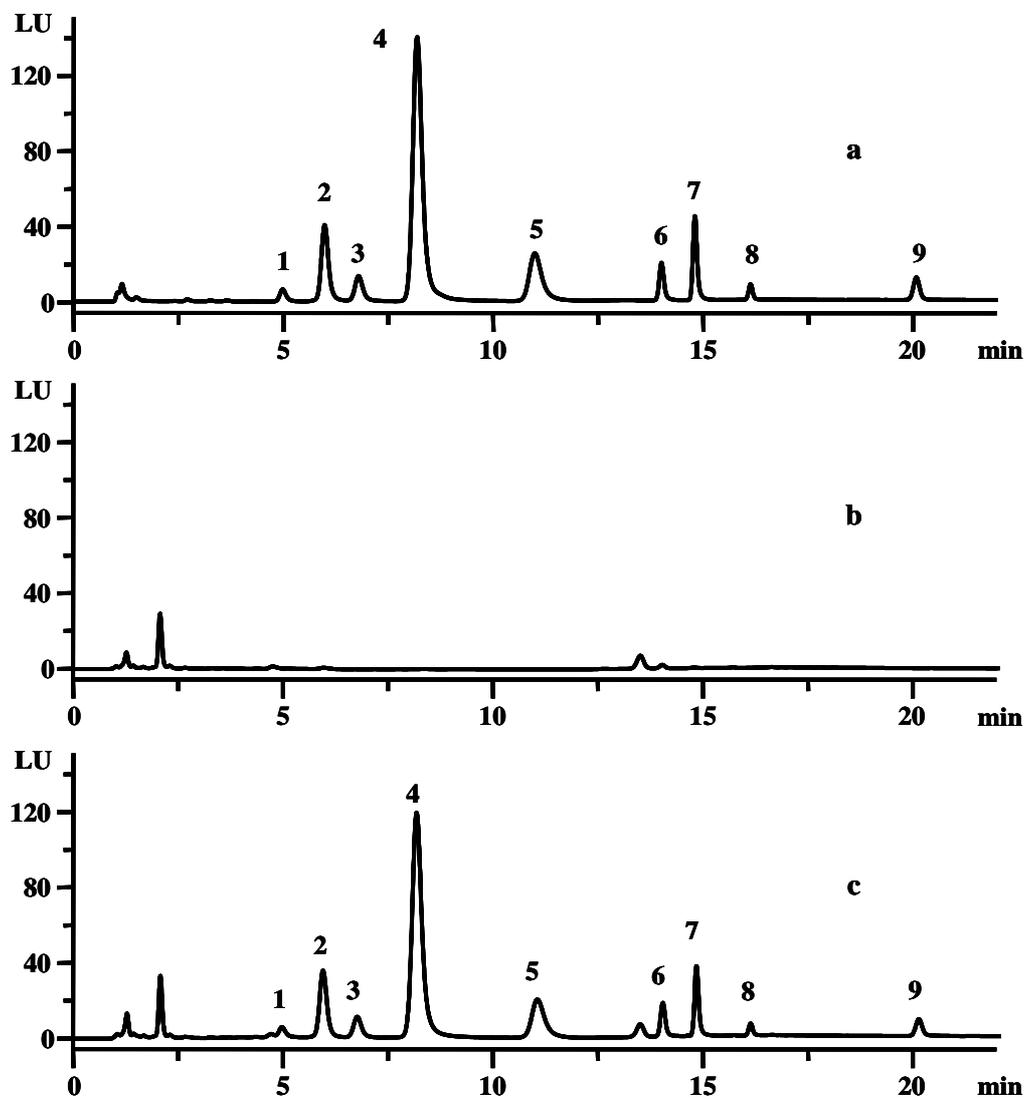


Figura V.4. Cromatogramas: (a) de una mezcla estándar de quinolonas; (b) extracto de una muestra de riñón de cerdo; (c) muestra de riñón de cerdo fortificado.
① MAR, ② NOR, ③ CIP, ④ DAN, ⑤ ENR, ⑥ SAR, ⑦ DIF, ⑧ OXO y ⑨ FLU.

V.2.3.- Parámetros analíticos**V.2.3.1.- Establecimiento y verificación del modelo**

Al igual que ocurre con las otras muestras analizadas, en las muestras de músculo de cerdo, músculo de ternera y riñón de cerdo se observó la existencia de efecto matriz por lo que se preparó un calibrado de adición de patrón. Para establecer la función de calibración en las diferentes muestras para cada una de las quinolonas seleccionadas se prepararon 6 niveles de concentración añadiendo volúmenes crecientes de una disolución mezcla patrón de 1 mg/L de concentración (0.5 mg/L para DAN) a 5 g de muestra de músculo de cerdo o de ternera, o a 1 g de muestra de riñón de cerdo, para obtener concentraciones finales dentro del intervalo de 10-50 µg/kg para todas las quinolonas salvo para danofloxacin que fue de 5-25 µg/kg en muestras de músculo de cerdo y de ternera. En el caso de las muestras de riñón de cerdo las concentraciones finales fueron de 30-250 µg/kg para todas las quinolonas salvo para danofloxacin que fue de 15-125 µg/kg. A cada una de las muestras se les adicionó 100 µL de la disolución patrón de norfloxacin de 1 mg/L de concentración. Se llevaron a cabo dos réplicas experimentales y tres réplicas instrumentales. Las muestras dopadas se almacenaron durante 24 horas en oscuridad y a una temperatura de 5 °C. Transcurrido este tiempo se aplicó el procedimiento de tratamiento de muestra descrito anteriormente. En las *Tablas V.3, V.4 y V.5* se resumen los valores de los parámetros analíticos asociados al establecimiento y verificación del modelo para los tres calibrados, músculo de cerdo, músculo de ternera y riñón de cerdo, respectivamente. En las tablas también se incluyen el valor de las recuperaciones del proceso de tratamiento de la muestra. El test de *lack-of-fit*, P(%), fue utilizado para comprobar la linealidad de las curvas de calibración. En todos los casos fue superior a 5%.

Finalmente, para evaluar el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales. En todos los casos se cumple la condición de homocedasticidad.

Tabla V.3. Parámetros de calibración para cada una de las quinolonas estudiadas en músculo de cerdo.

	MAR	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
a	0.0032	- 0.0031	- 0.1009	0.0023	0.0027	- 0.0141	- 0.0056	- 0.0083
S_a	0.0011	0.0035	0.0049	0.0107	0.0051	0.0029	0.0019	0.0035
b (L/μg)	0.0085	0.0332	0.3104	0.0618	0.0223	0.0467	0.0083	0.0120
S_b	0.0001	0.0001	0.0004	0.0004	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
R² (%)	99.97	99.98	99.99	99.96	99.94	99.99	99.95	99.91
S_{R,C}	0.0026	0.0086	0.0119	0.0257	0.0121	0.0070	0.0045	0.0085
Rec (%)	71.7	78.9	79.6	71.3	72.1	77.3	76.9	72.2
P (%)	32.8	28.1	14.7	36.5	42.3	19.0	38.8	52.7

Tabla V.4. Parámetros de calibración para cada una de las quinolonas estudiadas en muestras de ternera.

	MAR	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
a	0.0170	0.0216	0.3887	0.0327	0.0057	0.0161	- 0.0102	0.0032
S_a	0.0020	0.0037	0.0085	0.0102	0.0021	0.0063	0.0022	0.0022
b (L/μg)	0.0092	0.0302	0.3066	0.0646	0.0227	0.0473	0.0079	0.0130
S_b	0.0001	0.0001	0.0006	0.0004	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001
R² (%)	99.89	99.97	99.99	99.94	99.98	99.96	99.85	99.93
S_{R,C}	0.0047	0.0088	0.0205	0.0246	0.0051	0.0152	0.0052	0.0053
Rec (%)	77.6	72.3	74.6	74.1	71.7	78.1	72.1	78.9
P (%)	63.5	36.8	17.5	44.0	23.1	38.7	72.7	51.4

Tabla V.5. Parámetros de calibración para cada una de las quinolonas estudiadas en riñón de cerdo.

	MAR	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
a	0.0186	- 0.0240	- 0.4019	- 0.0538	0.0108	0.0093	0.0056	0.0096
S_a	0.0025	0.0029	0.0152	0.0060	0.0081	0.0025	0.0012	0.0023
b (L/μg)	0.0020	0.0070	0.0615	0.0153	0.0058	0.0105	0.0020	0.0030
S_b	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
R² (%)	99.90	99.99	99.99	99.99	99.81	99.99	99.97	99.95
S_{R,C}	0.0049	0.0057	0.0303	0.0119	0.0162	0.0050	0.0023	0.0046
Rec (%)	85.4	83.5	75.9	85.7	87.0	83.6	89.3	88.5
P (%)	45.7	15.3	21.4	10.8	67.8	25.8	36.0	40.2

V.2.3.2.- Parámetros de calidad del método analítico

Para establecer los parámetros de calidad de los métodos de determinación de quinolonas en muestras de músculo de cerdo y de ternera, y en riñón de cerdo se ha seguido el mismo procedimiento descrito anteriormente en el *Capítulo II*. Se ha determinado el *rango dinámico lineal (RDL)*, *linealidad*, *límite de detección*, *límite de cuantificación*, *precisión* y *sensibilidad*. La precisión de los métodos viene establecida por la *desviación estándar relativa (DER)* en el estudio de la repetibilidad y de la reproducibilidad. En la *Tabla V.6*, *V.7* y *V.8* se recogen los resultados para los tres tipos de muestras.

Tabla V.6. Parámetros de calidad de las quinolonas estudiadas en músculo de cerdo.

	MAR	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
LD (µg/kg)	0.9	0.8	0.1	1.2	1.6	0.4	1.6	2.1
LQ (µg/kg)	3.1	2.5	0.4	4.1	5.4	1.5	5.3	7.0
RDL (µg/kg)	3 - 50	3 - 50	1 - 25	4 - 50	5 - 50	2 - 50	5 - 50	7 - 50
Lin (%)	99.5	99.6	99.9	99.4	99.2	99.8	99.2	98.9
DER_{Reprod} (%)	3	2 - 3	2 - 4	1 - 4	4 - 5	2 - 5	2	3 - 4
DER_{Repet} (%)	3	3	3	3	4	3	2	3

Tabla V.7. Parámetros de calidad de las quinolonas estudiadas en muestras de ternera.

	MAR	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
LD (µg/kg)	1.6	0.8	0.2	1.2	0.7	1.0	1.9	1.3
LQ (µg/kg)	5.4	2.6	0.7	3.9	2.3	3.2	6.2	4.4
RDL (µg/kg)	5 - 50	3 - 50	1 - 25	4 - 50	2 - 50	3 - 50	6 - 50	4 - 50
Lin (%)	99.2	99.6	99.8	99.4	99.7	99.5	99.0	99.4
DER_{Reprod} (%)	2	2 - 4	1 - 3	2 - 4	2	1 - 3	2 - 4	2 - 4
DER_{Repet} (%)	2	3	2	3	2	2	3	3

Tabla V.8. Parámetros de calidad de las quinolonas estudiadas en riñón de cerdo.

	MAR	CIP	DAN	ENR	SAR	DIF	OXO	FLU
LD (µg/kg)	7.2	2.4	1.5	2.3	8.2	1.4	3.5	4.5
LQ (µg/kg)	23.9	8.0	4.9	7.6	27.3	4.7	11.6	15.0
RDL (µg/kg)	24 - 250	8 - 250	5 - 125	8 - 250	27 - 250	5 - 250	12 - 250	15 - 250
Lin (%)	99.2	99.7	99.7	99.7	99.0	99.8	99.6	99.5
DER_{Reprod} (%)	3	1 - 3	2 - 4	1 - 4	4 - 5	2 - 5	2	3 - 4
DER_{Repet} (%)	3	2	3	3	4	3	2	3

V.2.3.3.- Estudio de recuperación

Para evaluar la eficacia de los métodos se realizó un estudio de recuperación de las quinolonas cuando son añadidas sobre muestras de cerdo y de ternera. Estas muestras no contienen los analitos o éstos se encuentran en concentraciones inferiores a los límites de detección de los métodos. La cantidad de muestra pesada fue de 5 g en el caso del músculo de cerdo y de ternera, y 1 g para las muestras de riñón de cerdo. Para ello, se fortificaron las muestras a tres niveles de concentración para las diferentes quinolonas junto con el patrón interno. Las concentraciones en las muestras de músculo de cerdo y de ternera fueron de 10, 20 y 40 µg/kg para todas las quinolonas salvo para la danofloxacin que fue 5, 10 y 20 µg/kg. En el caso de las muestras de riñón de cerdo las concentraciones fueron 25, 50 y 100 µg/kg para danofloxacin y 50, 100 y 200 µg/kg para el resto de las quinolonas. Estas muestras fueron tratadas mediante el procedimiento anteriormente descrito y posteriormente fueron analizadas.

Para evaluar la recuperación se compararon los valores de concentración obtenidos por interpolación de las áreas de las muestras analizadas en los calibrados de las quinolonas con los valores nominales de concentración con los que se habían fortificado las muestras. A los datos obtenidos se les aplicó el *test de la t de student* de comparación de una media experimental (concentración encontrada) con un valor conocido (concentración añadida). Los valores de probabilidad *P* (%) calculados fueron mayores del 5%, por tanto, la hipótesis nula fue aceptada en todos los casos, ya que no se encontró diferencias significativas entre la concentración determinada y la añadida en cada caso.

En las *Tablas V.9, V.10 y V.11* se muestran las recuperaciones obtenidas para cada una de las quinolonas para cada nivel de concentración ensayadas y para cada uno de los tipos de muestra.

Tabla V.9. Recuperaciones de las quinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student para las muestras de músculo de cerdo.

	C (µg/kg)	R (%)	DER (%)	t_{exp}	P (%)
MAR	10	99.2	1.7	1.2	29.7
	20	100.9	1.9	1.1	31.1
	40	99.0	1.8	1.3	24.0
CIP	10	99.1	2.3	1.0	38.2
	20	101.1	1.9	1.5	20.6
	40	101.0	1.9	1.3	25.5
DAN	5	99.3	1.6	1.0	36.5
	15	98.9	2.2	1.2	27.0
	20	100.0	2.1	0.1	97.5
ENR	10	99.3	1.8	1.0	34.8
	20	99.2	1.6	1.3	26.0
	40	101.1	1.4	1.7	15.1
SAR	10	98.7	1.7	1.9	11.7
	20	100.8	3.2	0.6	59.2
	40	103.1	4.7	1.5	18.4
DIF	10	99.6	3.3	0.3	79.4
	20	99.2	3.6	0.5	62.4
	40	101.4	2.6	1.3	24.8
OXO	10	99.9	5.2	0.1	96.6
	20	98.7	2.8	1.2	29.2
	40	98.4	3.5	1.1	31.2
FLU	10	99.5	1.7	0.7	54.3
	20	99.8	2.9	0.1	88.9
	40	98.9	1.8	1.5	19.1

Tabla V.10. Recuperaciones de las quinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student para las muestras de ternera.

	C (µg/kg)	R (%)	DER (%)	t _{exp}	P (%)
MAR	10	100.4	1.6	0.6	60.4
	20	99.7	2.4	0.3	75.7
	40	100.8	1.7	1.1	32.1
CIP	10	99.9	2.6	0.1	91.1
	20	98.8	4.1	0.7	50.8
	40	99.3	1.9	0.9	38.7
DAN	5	99.2	2.9	0.7	53.2
	15	100.4	0.7	1.5	20.5
	20	99.8	1.1	0.5	64.0
ENR	10	101.1	3.4	0.8	48.2
	20	100.5	1.6	0.7	49.5
	40	101.4	3.7	0.9	39.1
SAR	10	101.6	2.1	1.8	12.8
	20	100.3	1.9	0.4	71.7
	40	100.0	1.9	0.1	99.3
DIF	10	100.7	2.8	0.6	58.3
	20	99.6	1.0	1.0	37.3
	40	99.1	2.9	0.7	49.5
OXO	10	98.5	3.4	1.1	33.8
	20	100.9	1.9	1.2	28.8
	40	99.0	4.0	0.6	58.2
FLU	10	99.9	3.4	0.1	94.4
	20	101.8	2.3	1.9	12.3
	40	100.2	4.4	0.1	89.9

Tabla V.11. Recuperaciones de las quinolonas y valores de P y t obtenidos usando el test de la t de Student para las muestras de riñón de cerdo.

	C (µg/kg)	R (%)	DER (%)	t_{exp}	P (%)
MAR	50	100.8	3.2	0.6	59.2
	100	101.1	3.4	0.8	48.2
	200	99.6	3.3	0.3	79.4
CIP	50	100.4	2.1	0.5	64.2
	100	99.4	1.5	1.0	38.6
	200	99.9	3.1	0.1	94.6
DAN	25	101.2	2.1	1.4	22.5
	50	98.3	3.2	1.3	23.8
	100	98.4	3.5	1.1	30.4
ENR	50	100.0	1.4	0.1	97.1
	100	98.9	3.7	0.7	50.1
	200	102.0	3.1	1.5	18.6
SAR	50	98.3	3.6	1.2	28.6
	100	98.7	4.0	0.8	45.8
	200	101.0	5.1	0.5	64.3
DIF	50	99.1	2.7	0.8	43.9
	100	101.3	4.7	0.7	52.3
	200	98.7	1.6	2.0	9.8
OXO	50	99.4	1.7	0.8	45.5
	100	101.4	2.0	1.7	15.2
	200	100.7	1.7	1.0	36.7
FLU	50	100.9	3.5	0.6	55.6
	100	99.0	3.9	0.6	54.7
	200	101.4	2.8	1.2	27.6

CONCLUSIONES

Conclusiones

La investigación desarrollada a lo largo de esta Memoria ha conducido a las siguientes conclusiones:

- ✚ Se ha optimizado un método de cromatografía líquida con detección fluorescente para la separación y determinación de siete quinolonas (Ciprofloxacina, Danofloxacina, Enrofloxacina, Sarafloxacina, Difloxacina, Ácido Oxolínico y Flumequina) utilizando la Norfloxacina como patrón interno. Se ha optimizado el porcentaje de disolvente y el pH de la fase móvil mediante la metodología LSER. También se ha optimizado el gradiente de composición. Los valores de resolución en todos los casos han sido óptimos.

- ✚ Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de las siete quinolonas reguladas por la Unión Europea en músculo de pollo (Ciprofloxacina, Danofloxacina, Enrofloxacina, Sarafloxacina, Difloxacina, Ácido oxolínico y Flumequina).

El método propuesto conlleva un primer tratamiento de las muestras con acetonitrilo y ácido *m*-fosfórico. A continuación, los extractos obtenidos son sometidos a una etapa de limpieza y preconcentración de los analitos mediante extracción en fase sólida. Por último, los compuestos estudiados son separados y determinados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Los límites de detección del método propuesto son inferiores a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la EMEA.

- ✚ Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de cinco fluoroquinolonas reguladas por la Unión Europea en muestras de leche de vaca (Ciprofloxacina, Danofloxacina, Enrofloxacina, Sarafloxacina y Difloxacina). La validación se ha realizado empleando cuatro tipos de muestras de leche: cruda, entera, semidesnatada y desnatada.

El método propuesto se basa en la separación y determinación de los analitos mediante cromatografía líquida con detección fluorescente previo tratamiento de las muestras de leche con ácido *o*-fosfórico, acetonitrilo y diclorometano. Los límites de detección del método propuesto son inferiores a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la EMEA para estas fluoroquinolonas en este tipo de muestras.

- ✚ Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea en huevo de siete quinolonas reguladas por la Unión Europea para aves (Ciprofloxacina, Danofloxacina, Enrofloxacina, Sarafloxacina, Difloxacina, Ácido oxolínico y Flumequina), aunque su empleo está prohibido en animales productores de huevo que vayan destinados al consumo humano.

El método propuesto consiste en la separación y determinación de los analitos mediante cromatografía líquida con detección fluorescente previo tratamiento de las muestras de huevo con amoníaco, acetonitrilo y diclorometano. Los límites de detección obtenidos son bastante bajos por lo que el método se puede emplear como

método de rutina para la detección y determinación de estos analitos en muestras de huevo.

- ✚ Se han desarrollado y validado métodos analíticos para la determinación simultánea de las ocho quinolonas reguladas por la Unión Europea en muestras de músculo de cerdo y de ternera, y en riñón de cerdo (Marbofloxacina, Ciprofloxacina, Danofloxacina, Enrofloxacina, Sarafloxacina, Difloxacina, Ácido oxolínico y Flumequina).

Los métodos propuestos conllevan un primer tratamiento de las muestras con acetonitrilo y ácido *m*-fosfórico. A continuación, los extractos obtenidos son sometidos a una etapa de limpieza y preconcentración de los analitos mediante extracción en fase sólida. Por último, los compuestos estudiados son separados y determinados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Los límites de detección de los métodos propuestos son inferiores a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la EMEA para este tipo de muestras.

