

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS
EN LECHE MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN
FLUORESCENTE**

MÁSTER EN QUÍMICA

ANA ISABEL VIEDMA LÓPEZ

GRANADA, 2011

ÍNDICE

- 1. Línea de investigación**
- 2. Objeto de la memoria**
- 3. Introducción**
 - 3.1. Sulfonamidas: aspectos generales**
 - 3.1.1. Estructura química y propiedades físico-químicas de las sulfonamidas**
 - 3.1.2. Mecanismos de acción**
 - 3.1.3. Mecanismos de resistencia**
 - 3.1.4. Características farmacocinéticas**
 - 3.2. Métodos analíticos para la determinación de sulfonamidas en alimentos**
 - 3.2.1. Determinación de sulfonamidas mediante cromatografía líquida**
 - 3.2.2. Métodos de extracción de sulfonamidas: tratamiento de muestra**
 - 3.2.3. Método QuEChERS**
- 4. Reactivos y material**
- 5. Instrumentación y software**
- 6. Procedimiento cromatográfico propuesto**
- 7. Tratamiento de muestra**

8. Resultados y discusión

8.1. Optimización de la separación cromatográfica

8.1.1. Optimización del caudal

8.1.2. Optimización de la naturaleza y el gradiente de la fase móvil

8.1.3. Optimización del volumen de inyección

8.1.4. Optimización de la ganancia del detector

8.1.5. Selección de la columna cromatográfica

8.2. Optimización del tratamiento de muestra

8.3. Validación del método propuesto

8.3.1. Establecimiento de las rectas de calibrado y de los parámetros de calidad

8.3.2. Estudio de la precisión del método

8.3.3. Estudio de la veracidad del método

9. Conclusiones

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

1. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

El trabajo ha sido desarrollado dentro del Grupo de Investigación “*Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica (FQM-302)*”, cuya responsable es la Dra. Ana M^a García Campaña y ha sido realizado bajo la dirección de las Dras. Laura Gámiz Gracia y Ana M^a García Campaña. Está enmarcado dentro de la Línea de Investigación “*Desarrollo de metodología analítica para el tratamiento de muestra*”.

OBJETO DE LA MEMORIA

2. OBJETO DE LA MEMORIA

Las sulfonamidas se encuentran entre los fármacos más utilizados en veterinaria debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana, a su eficacia como promotores del crecimiento de la ganadería y a sus bajos precios. La posible presencia de residuos de estos medicamentos en los productos comestibles de origen animal es de gran preocupación, ya que pueden causar serios problemas de salud en los seres humanos, tales como reacciones alérgicas o tóxicas. Debido a esto, la Unión Europea ha establecido un límite máximo de residuos (LMR) en alimentos procedentes de animales destinados al consumo humano, igual a 100 µg/kg para el total de las sulfonamidas.

Por lo tanto, el análisis de sulfonamidas es muy importante en la actualidad para asegurar que estos alimentos objeto del análisis no contengan residuos en cantidades que pudieran implicar un riesgo para la salud de los consumidores.

Considerando lo anteriormente expuesto, para la determinación de sulfonamidas serán necesarios métodos de tratamiento de muestra eficaces, que presenten una adecuada selectividad, que permitan efectuar el análisis sin que interfieran los componentes de la matriz, y sistemas de análisis que muestren una alta sensibilidad, de manera que, en aquellos casos en los que el sistema de detección no sea muy sensible, se requerirá para su consecución el empleo de técnicas de preconcentración.

En esta Tesis de Máster se presenta el trabajo de investigación que ha sido realizado durante el curso 2010-2011 y que lleva por título: “Validación de un método para la determinación de sulfonamidas en leche mediante cromatografía líquida con detección fluorescente”. Este trabajo tiene por objeto principal la optimización y validación de un método analítico sensible y selectivo para la cuantificación de sulfonamidas en muestras de leche. Para ello se ha empleado como técnica de separación la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorescente empleando una metodología denominada QuEChERS (*Quick, Efficient, Cheap, Easy, Robust, Safe*) en el tratamiento de muestra para el análisis simultáneo de 9 sulfonamidas en muestras de leche.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

En el análisis de alimentos de origen animal es necesario el control de residuos procedentes del uso de fármacos aplicados en veterinaria para el tratamiento y control de enfermedades en animales destinados a consumo humano, existiendo límites máximos de residuos (LMRs) establecidos en distintos tejidos animales y productos derivados. Estos fármacos son fundamentalmente antibióticos. La antigua clasificación, que aún no ha sido abandonada, reserva el término “antibiótico” a compuestos naturales o semisintéticos que actúan sobre los organismos patógenos por muy distintos mecanismos, mientras que denomina “antibacterianos” a aquellos otros compuestos de origen sintético. La terminología aquí empleada, será la de llamar “antibiótico” a cualquier compuesto farmacéutico que actúe contra las bacterias [1].

Los antibióticos comenzaron a emplearse en veterinaria en la década de los cincuenta, con el empleo de la oxitetraciclina y la clortetraciclina como aditivos en piensos. En la actualidad una gran variedad de antibióticos se emplean en la prevención y el tratamiento de distintas enfermedades. En los años ochenta, se estimó que al menos el 60% de todos los animales usados en alimentación, habían sido tratados con antibióticos en algún momento de su vida. Con la actual práctica de la ganadería intensiva, esta cifra puede ser bastante mayor. Este uso inadecuado ha dado lugar a un elevado número de problemas que van desde el fracaso terapéutico por una elección inadecuada a una posología mal instaurada, lo que provoca la aparición de resistencias, cada vez más extendidas, o de reacciones secundarias iatrogénicas [2]

Además, es un hecho demostrado que los residuos de antibióticos en los alimentos procedentes de animales, ya sea por la administración de estos compuestos al animal o por su adición a los piensos que comen, constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, ya que residuos de antibióticos en los alimentos pueden causar reacciones alérgicas a aquellos individuos que sean hipersensibles a los mismos. Por otro lado, concentraciones de residuo de antibióticos bajas en los animales, durante tiempo prolongado, pueden hacer que ciertas bacterias se transformen en especies

[1] A. Di Corcia, M. Nazzari, J. Chromatogr. A 974 (2002) 53.

[2] USP.Sulfonamides. Veterinary-Systemic. Pharmacopea Veterinary Monographs (2000).

resistentes y que pasen a los humanos a través de los alimentos con el lógico perjuicio [3].

Los niveles de riesgo de residuos de antibióticos en los alimentos están causados fundamentalmente por dos factores:

- a) Por no respetar las recomendaciones de tiempo de la eliminación del antibiótico por el animal.
- b) Por contaminación de los piensos durante su manejo por errores humanos.

La normativa Europea establece los requisitos necesarios para garantizar la seguridad, eficacia y calidad de los medicamentos veterinarios en todo el proceso de su autorización, elaboración, comercio, almacenamiento, suministro y utilización, en relación con los animales de destino, así como de su seguridad, habida cuenta las repercusiones sobre la salud pública y el medio ambiente. En el R.D. 1132/2010 (que modifica al anterior R.D. 109/1995) [4] se exponen los requisitos de calidad, eficacia, seguridad y pureza que ha de cumplir un medicamento veterinario para poder ser registrado y autorizado. En este sentido, no podrá autorizarse la puesta en el mercado de un medicamento veterinario, con excepción de los inmunológicos, para ser administrado a animales cuya carne o productos sean destinados al consumo humano si no tiene establecido el correspondiente LMR tal y como está previsto en el Reglamento de la Unión Europea Reglamento (CE) N° 2377/90 [5].

Se define el LMR como "la máxima concentración de una sustancia química determinada que puede admitirse en un alimento sin que signifique riesgo para la salud" y más específicamente es "la concentración o nivel máximo permitido de un medicamento o sustancia química en un pienso o alimento desde el momento del sacrificio, recolección, procesado, almacenamiento o venta y consumo por animales o el hombre. Se calcula para cada tejido (matriz) en particular, dividiendo el producto de la IDA (Ingesta Diaria Admisible) y el peso corporal promedio humano (60 kg) por la ingesta diaria estimada para ese tejido en particular y se expresa en mg/Kg o

[3] H.C. Wegener, F.M. Aarestrup, P. Gerner-Smidt, F. Bager, Acta Vet. Scand. Suppl. 92 (1999) 51.

[4] Real Decreto 1132/2010, de 10 de septiembre, por el que se modifica el Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. BOE. 53, de 25 de septiembre de 2010.

[5] Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 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. DOCE L 224 de 18 de agosto de 1990. Modificado por el Reglamento 1338/2000/CE de la Comisión, de 20 de octubre de 2000. DOCE L 269 de 21 de octubre de 2000.

microgramos/Kg del compuesto por kilo de alimento fresco. Una vez que se establecen los LMRs, es necesario establecer en qué momento a partir de la aplicación de un producto veterinario, tanto el principio activo como sus metabolitos se hayan eliminado hasta encontrarse en un valor inferior al LMR. Este es el fundamento del establecimiento del "*periodo de restricción o periodo de retirada*". El periodo de retirada de un producto veterinario es el tiempo que debe transcurrir entre la última administración del mismo y el sacrificio o recolección de los productos que se derivan de esos animales tratados destinados al consumo humano.

Asimismo, en el R.D. 1749/1998, [6] se establecen las medidas de control que deben aplicarse para la detección de determinadas sustancias y sus residuos, potencialmente tóxicos para el consumidor, en animales vivos o productos de origen animal destinados al consumo humano. Según los estudios realizados sobre el efecto de ciertas sustancias en la salud humana, los residuos se han clasificado en dos grupos: el grupo A, que engloba sustancias con efecto anabolizante y otras sustancias no autorizadas, y el grupo B, que son medicamentos veterinarios y otros contaminantes para los que se fija un LMR.

El Reglamento (CE) 1181/2002 de la Comisión [7] que modifica el anexo I del Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, sobre los LMR de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, incorpora nuevas sustancias. Los grupos incluidos cuyos LMRs están legislados en diferentes tejidos animales comestibles y productos (grasa, hígado, riñón, leche, músculo, etc.) se aplican a diversas especies productoras de alimentos (bovinos, porcinos, caprinos, equinos, aves, conejos, salmónidos, etc.). Dentro de los agentes antiinfecciosos se encuentran los quimioterapéuticos (sulfonamidas y derivados de la diaminopirimidina), antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, macrólidos, flurofenicol y compuestos asociados, tetraciclinas, ansamicina, pleuromutilinas, lincosamidas, aminoglucósidos, etc.) y agentes antiparasitarios (salicilanidas, benzimidazoles, derivados fenólicos, etc.).

[6] Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. BOE. 188, de 7 de agosto de 1998.

[7] Reglamento 1181/2002 de la Comisión, de 1 de julio de 2002, por el que se modifica el anexo I del Reglamento CEE 2377/90 del Consejo 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. DOCE L 172 de 2 de Julio de 2002

Recientemente se dispone de un nuevo documento que sustituye al Reglamento (CE) N° 2377/90 sobre LMR. Este Reglamento (UE) N° 37/2010 [8] indica que por razones de simplificación, es necesario incorporar las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los LMRs a un Reglamento de la Comisión. Dado que esta clasificación sigue el sistema previsto en el Reglamento (CE) N° 470/2009 [9], donde se derogaba el Reglamento (CEE) N° 2377/90, debe ser también tenida en cuenta en relación con la posibilidad de administrar estas sustancias farmacológicamente activas a animales destinados a la producción de alimentos. Así, se incorpora la información existente sobre la clasificación terapéutica de las sustancias farmacológicamente activas contenidas en los anexos del Reglamento (CEE) N° 2377/90 en una columna específica y para una mayor comodidad de uso, las sustancias farmacológicamente activas se enumeran en un anexo por orden alfabético, estableciéndose dos cuadros distintos: uno para las *sustancias autorizadas*, que figuran en los Anexos I, II y III del Reglamento (CEE) N° 2377/90, y otro para las *sustancias prohibidas*, enumeradas en el Anexo IV del anterior reglamento.

3.1. SULFONAMIDAS: CONCEPTOS GENERALES

Las sulfonamidas fueron los primeros fármacos eficaces como antimicrobianos y la evolución en su investigación facilitó el camino para la revolución de los antibióticos tanto en la medicina humana (siendo su principal uso en el tratamiento de infecciones del tracto urinario) como en veterinaria [10], con fines profilácticos y terapéuticos. Además, las sulfonamidas actúan como sustancias promotoras del crecimiento aunque a partir del 1 de Enero de 2006 se prohibió el uso de antibióticos con esta finalidad [11].

[8] Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DOUE, 20-1-2010, L15/1.

[9] Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n o 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n o 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. DOUE, 16-6-2009, L152/11.

[10] Goodman, Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics, (1996) 44.

[11] Reglamento (CE) No 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. DOCE L268/29 de 18-10-2003.

La primera sulfonamida de importancia clínica fue el prontosil (sulfamidocrisoidina), que es un colorante azoico que contiene un grupo sulfonamídico [12] y se sintetizó en Alemania en 1935. Se trata del primer medicamento descubierto que podía tratar una amplia gama de infecciones bacterianas, ya que presentaba una fuerte acción de protección contra las infecciones causadas por estreptococos, incluidas las infecciones de la sangre, fiebre puerperal, y la erisipela, y poseía un menor efecto sobre las infecciones causadas por otros cocos. Posteriormente se descubrió que el fármaco se metaboliza en dos porciones dentro del cuerpo, liberando del tinte, que era la parte inactiva y un compuesto más pequeño, incoloro y activo llamado sulfanilamida. Después se han sintetizado muchas sulfonamidas, las cuales difieren poco en sus actividades antimicrobianas, pero bastante en sus propiedades farmacocinéticas [13]

La sulfanilamida, por tanto, se trató del primer antibiótico y el único efectivo disponible en los años previos a la penicilina, debiendo destacar la importancia médica del descubrimiento de estos agentes. Debido a la aparición de resistencia bacteriana y al descubrimiento de fármacos más activos y menos tóxicos, las sulfonamidas fueron dejadas de lado por un tiempo. Sin embargo actualmente, con la recuperación de la sensibilidad de algunas bacterias y la aparición del trimetoprim que se puede combinar con las sulfonamidas y actuar sinérgicamente con ellas, las sulfonamidas han recuperado algunas aplicaciones importantes en quimioterapia antimicrobiana. Se han sintetizado muchos compuestos aunque sólo algunos tienen valor terapéutico, presentando el mismo mecanismo de acción.

A día de hoy se utilizan mucho para afecciones como el acné e infecciones del tracto urinario, y están recibiendo un renovado interés para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a otros antibióticos [14]

La presencia de residuos de estos compuestos en alimentos supone un problema para la salud, debido al potencial carcinogénico y la posibilidad del desarrollo de resistencia a los antibióticos humanos, así como la posible aparición de severas reacciones alérgicas, como ya se ha comentado anteriormente. Por ello, la UE establece

[12] A. Korolkovas, J. H. Burckhalter (1979) 587

[13] C. Bruguera, M. Morejón García, Rev. Cubana Med. Gen. Integr. 15 (1999) 156.

[14] Katzung, G. Bertram, Basic & Clinical Pharmacology 9 (2007) 46

en diversas matrices, entre ellas la leche, un LMR de $100 \mu\text{g}/\text{kg}^1$ para la suma total de sulfonamidas presentes [5-8].

3.1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS SULFONAMIDAS.

Todas las sulfonamidas son compuestos sintéticos derivados de la sulfanilamida (4-amino bencenosulfonamida) que fue la primera a la que se descubrió la actividad antimicrobiana (Figura 1). Son derivados del ácido sulfanílico (amida del ácido sulfanílico) con una estructura similar a la del ácido *para*-aminobenzoico (PABA), requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. Poseen dos átomos de nitrógeno (N), el N4 o amínico y el N1 o amídico, y las distintas sulfonamidas se diferencian entre sí en el radical (R) unido al grupo amido en N1 (-2NHR) y a veces en el sustituyente del grupo amino en N4 (NH₂) [15]. Las sustituciones en el grupo amino en posición 4 dan compuestos de menor absorción intestinal.

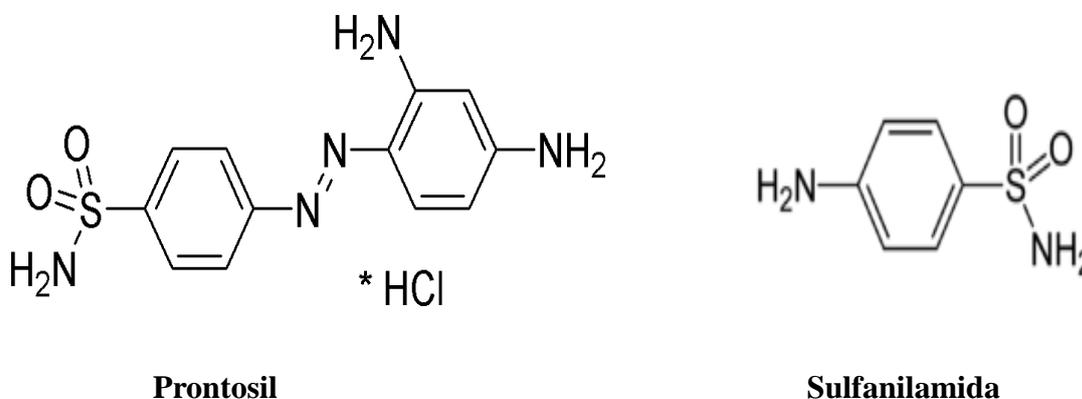


Figura 1: Estructura química del Prontosil y Sulfanilamida

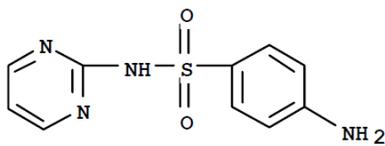
Las sustituciones en el grupo amido originan efectos variables en la actividad antibacteriana de la molécula. El grupo amido no es esencial en sí, lo importante es que el azufre esté unido directamente al anillo benceno. El grupo amino es esencial, y puede sustituirse solamente por radicales que se transformen *in vivo* en un grupo amino libre.

[15] J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker, *Inter-médica* (2002) 256.

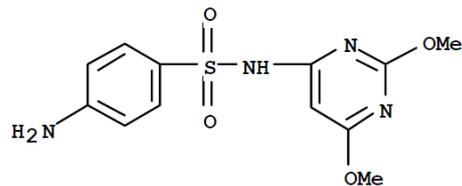
Si bien las diversas sustituciones químicas originan sulfonamidas con características físicas, químicas y farmacocinéticas particulares, en general las propiedades antibacterianas son similares para todos los compuestos del grupo [16]

En la Figura 2 se muestran las estructuras químicas de las sulfonamidas empleadas en el desarrollo de este trabajo.

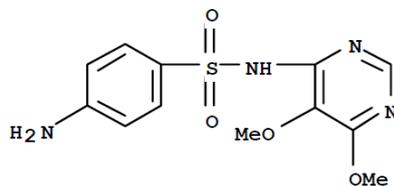
Sulfadiazina (SDZ)



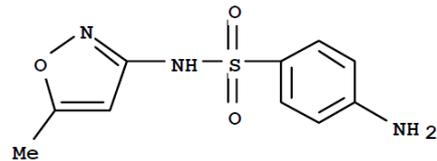
Sulfadimetoxina (SDM)



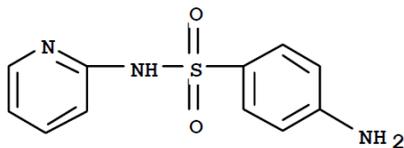
Sulfadoxin (SDX)



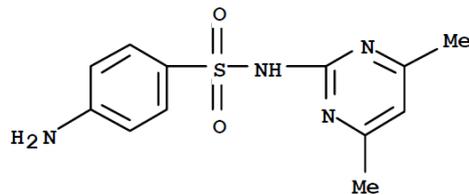
Sulfametoxazol (SMX)



Sulfapiridina (SPD)



Sulfametazina (SMZ)



[16] P. Costa -Batllori, Med. Vet. 1311 (1996) 585.

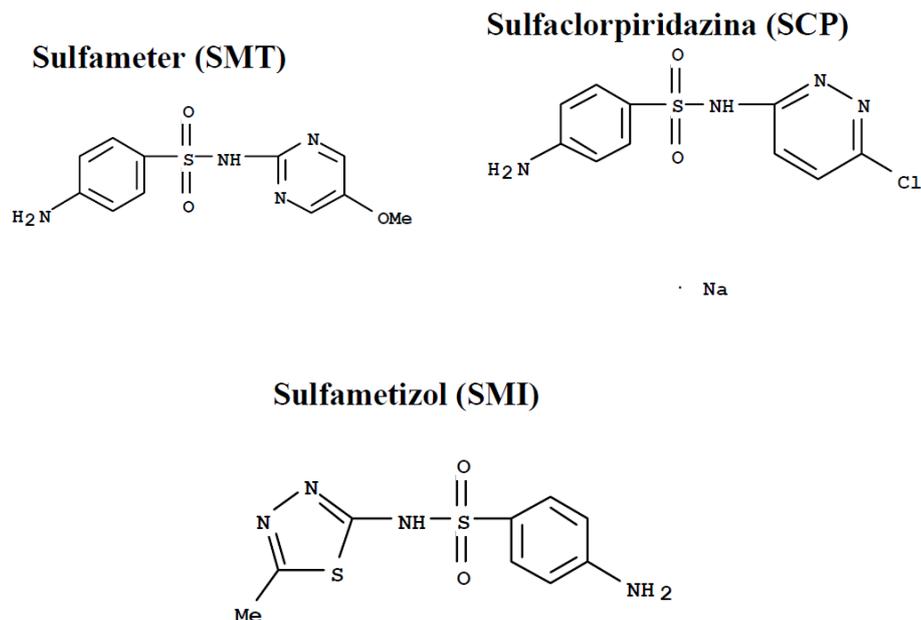


Figura 2: Estructura de las sulfonamidas analizadas en este trabajo.

La mayoría de las sulfonamidas se presentan bajo la forma de polvos blancos o amarillentos, cristalinos, de sabor amargo, con un amplio rango de valores de pKa, poco solubles en agua y algo más en alcohol etílico, acetona y N,N'-dimetilformamida e insolubles en cloroformo y éter sulfúrico. Su solubilidad es mayor en medios alcalinos que a pH neutros y ácidos. Las sulfonamidas de empleo parenteral se utilizan bajo la forma de sales sódicas que son algo más hidrosolubles. En los líquidos biológicos con pH menor que su pKa predomina la forma no ionizada, siendo esta fracción la que difunde a través de las membranas celulares y penetra las barreras biológicas.

Las sulfonamidas son sustancias de naturaleza anfótera, pues mientras el grupo amino les confiere carácter básico, el grupo sulfonamido (SO_2NH_2) les otorga características ácidas. Forman sales en soluciones de ácidos fuertes o en soluciones básicas [17]. Son estables en disolución, pudiendo ser hervidas sin que se produzcan pérdidas significativas de actividad [18].

[17] M.J.B. Mengelers, P.E. Hougee, L.H.M. Janssen, A.A.J.P.A. Van Miert, J. Vet. Pharmacol. Therap. 20 (1997) 276.

[18] Dámaso, Marketing Pharm, (1990) 23.

La sulfanilamida es más activa en la forma protonada y presenta una solubilidad muy baja pudiendo, en ocasiones, cristalizarse en los riñones, debido a su primer pKa de alrededor de 10. Esta es una situación muy dolorosa para los pacientes, por lo que se les indica tomar el medicamento con abundante cantidad de agua. Los compuestos más nuevos tienen un pKa de alrededor de 5-6, para evitar así el problema renal [12].

En la Tabla 1 se muestran algunas de las propiedades de estos compuestos

Tabla 1. Propiedades de las sulfonamidas objeto de estudio.

Compuesto	Siglas	Pm	log P	pKa ₁	pKa ₂
Sulfapiridina	SPD	249.29	0.034±0.318	2.90±0.19	8.54±0.30
Sulfadoxin	SDX	310.33	0.342±0.433	3.15±0.49	6.16±0.50
Sulfametazina	SMZ	278.33	0.803±0.259	2.79±0.24	7.45±0.50
Sulfadimetoxina	SDM	310.33	1.455±0.441	2.44±0.48	6.21±0.50
Sulfameter	SMT	280.33	0.422±0.279	1.48±0.10	6.69±0.30
Sulfaclorpiridazina	SCP	287.73	----	----	----
Sulfadiazina	SDZ	250.28	-0.117±0.255	1.57±0.10	6.50±0.30
Sulfametoxazol	SMX	253.28	0.887±0.419	1.39±0.10	5.81±0.50
Sulfametizol	SMI	270.33	0.369±0.259	1.19±0.10	5.51±0.50

3.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas del PABA, su mecanismo de acción es de tipo bacteriostático cuando se utilizan solas e implica interferencia metabólica en los microorganismos susceptibles, comportándose como inhibidores metabólicos o antimetabolitos, al impedir la síntesis de ácido fólico, esencial para el crecimiento y multiplicación bacteriana, siendo los microorganismos sensibles

aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico o son impermeables al ácido fólico de los líquidos circundantes, y los microorganismos resistentes, aquellos que son permeables al ácido fólico o al igual que las células del hombre requieren ácido fólico preformado para un normal desarrollo ya que no pueden sintetizarlo y por lo tanto no son atacadas. De esta manera, al inhibirse su formación, se altera la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y los mecanismos de replicación microbiana [19]. El ácido fólico a su vez actúa en la síntesis de timina y purina. Esta acción se ejerce compitiendo por la acción de una enzima bacteriana responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropterico, precursor del ácido fólico. Así, inhiben las enzimas responsables de la condensación del pirofosfato de la 2-amino-4-oxo-6-hidroxi-metildihidropteridina con el PABA. El efecto sinérgico de las sulfonamidas asociadas a trimetoprim se debe a la inhibición secuencial de esta vía metabólica.

Por su mecanismo de acción, las sulfonamidas son bacteriostáticas, y no bactericidas, haciendo necesaria la presencia de mecanismos inmunológicos normales, para completar la acción de las sulfonamidas [20].

Las células que producen excesivas cantidades de PABA o que lo tienen en su medio, tal como el tejido necrótico, son resistentes a las sulfonamidas por competición con el mismo [21].

En cuanto a su actividad antimicrobiana, su espectro de acción es amplio, abarca la mayoría de los microorganismos gram positivos y muchos gram negativos, especialmente estos últimos, pero su uso se ha limitado debido al desarrollo de resistencia. La mayoría se absorbe bien por vía oral, siendo el intestino delgado su lugar principal de absorción. La administración parenteral es difícil, ya que las sales solubles son altamente alcalinas e irritantes para los tejidos. Se distribuyen ampliamente en todos los tejidos y alcanzan niveles altos en los líquidos pleural, peritoneal, sinovial y ocular. Los niveles en el líquido cefalorraquídeo son eficaces en las infecciones meníngeas, pero raras veces se usan para esta indicación [13].

[19] O. Sköld, Vet. Res. 32 (2001) 261.

[20] M. Blum, D.J. Graham, C.A. Mc Closkey, Clinical Infectious diseases 18 (1994) 946.

[21] <http://www.usp.org/pdf/veterinary/sulfonamides.pdf>.

3.1.3. MECANISMO DE RESISTENCIA

Con frecuencia gérmenes originariamente sensibles a las sulfonamidas desarrollan resistencia tanto in vivo, como in vitro. La resistencia a las sulfonamidas es consecuencia de una alteración de la constitución enzimática de la célula bacteriana, caracterizada por:

- 1) Alteración de la enzima que utiliza PABA
- 2) Mayor capacidad para inactivar o destruir el fármaco
- 3) Una vía metabólica alternativa para la síntesis de un metabolito esencial o
- 4) Una mayor producción del metabolito esencial o de antagonista a los fármacos.

La resistencia unas veces es debida a mutaciones y otras, más frecuentemente, a la adquisición de plásmidos u otros elementos genéticos móviles que además de la resistencia a las sulfonamidas portan genes de resistencia a otros antibióticos [22]. Dicha resistencia a las sulfonamidas está muy extendida, tanto para gérmenes comunitarios como nosocomiales. Los microorganismos desarrollan resistencia por mecanismos que pueden ser de naturaleza cromosómica o extracromosómica:

- Cromosómica: A través de mutaciones que producen un cambio en las enzimas de lo que resulta una disminución de afinidad por las sulfonamidas, o aumentando la producción de PABA lo que neutraliza la competencia de éstas.

- Extracromosómica: La producción de una enzima dihidripteroato sintetasa alterada, que es 1.000 veces menos sensible a la droga, es el principal mecanismo de resistencia a sulfonamidas.

Medidas para evitar la aparición de resistencia:

- a) Comenzar la terapéutica lo más pronto posible

[22] M.C. Roberts, Mol Biotechnol, 20 (2002) 261.

- b) Usar sulfonamidas sólo en cepas sensibles
- c) Administrar las dosis adecuadas, ya que las dosis insuficientes producen resistencia, más fácilmente
- d) Combinarlas con otros quimioterápicos cuando sea aconsejable.

3.1.4. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS

Las sulfonamidas pueden ser agrupadas atendiendo a diferentes criterios: aquellas que son administradas por vía oral y son absorbibles, las de administración oral pero que no son absorbibles y las de aplicación tópica. Las sales de sulfonamidas son administradas por vía intravenosa. Estas se distribuyen ampliamente por los tejidos, incluyendo el líquido cefalorraquídeo, placenta y el feto. Se unen a proteínas entre un 20-90%. Las concentraciones terapéuticas alcanzan entre 40-100 g/mL y pueden alcanzar concentraciones máximas entre 2-6 horas seguida su administración oral. Las sulfonamidas y sus metabolitos son eliminados por vía renal [14].

Las sulfonamidas orales absorbibles se clasifican en acción corta, media o larga, dependiendo de su vida media:

- a) Absorbibles de acción corta o intermedia: sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol, sulfametizol.
- b) Absorbibles de acción prolongada. De larga vida media. Su uso fue limitado por el potencial riesgo de producir reacciones de hipersensibilidad. Como ejemplo se menciona la sulfametoxipiridazina
- c) No absorbibles. Tienen acción tópica a nivel de la luz intestinal o cutánea. Entre ellas se encuentran: sulfadiazina argéntica, ftalilsulfatiazol y sulfasalazina.

3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS

A partir de la década de los 80, diversas agencias de calidad de los alimentos comienzan a abordar la determinación de residuos de antibióticos en productos alimenticios. El análisis de estos residuos suele presentar dos tipos de problemas: el primero deriva de la complejidad y diversidad de las matrices en las que suelen determinarse, y el segundo problema surge como consecuencia de la baja concentración en la que generalmente se encuentran estos productos. Esta problemática obliga a utilizar métodos de análisis que presenten al menos las siguientes características: una adecuada selectividad que permita efectuar el análisis sin que interfieran los numerosos contaminantes presentes en la matriz y una alta sensibilidad para poder determinar cantidades de analito a nivel de trazas. La selectividad se puede conseguir mediante etapas previas de extracción y separación de los analitos, mientras que la sensibilidad se suele conseguir mediante una etapa previa de preconcentración y el empleo de técnicas de detección sensibles como la fluorescencia.

Se han utilizado una gran variedad de métodos para determinar residuos de sulfonamidas en muestra biológicas y alimentos de origen animal, como indican algunos artículos de revisión [²³⁻²⁴] tales como cromatografía en capa fina (TLC) [²⁵], HPLC con detección ultravioleta (UV), empleando baterías de diodos (DAD) [²⁶⁻²⁷], detección por fluorescencia [²⁸], quimioluminiscencia [²⁹] o acoplada a espectrometría de masas (MS) [³⁰]. También se ha usado la electroforesis capilar (CE) con detección

[²³] S. Wang, H. Y. Zhang, L. Wang, Z. J. Duan, I. Kennedy, *Food Add. Contam.*, 23 (2006) 362.

[²⁴] A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, F.J. Lara, M. del Olmo-Iruela, C. Cruces-Blanco, *Anal Bioanal. Chem.* 395 (2009) 967.

[²⁵] S. Babić, D. Asperger, D. Mutavdžić, A.J.M. Horvat, M. Kastelan-Macan, *JPC – J Planar Chromatogr Modern TLC*. 18 (2005) 423.

[²⁶] N. Furusawa, K. Kishida, *J. Anal. Chem.* 371(2001) 1031.

[²⁷] M. Gratacós-Cubarsí, M. Castellari, A. Valero, J.A. García-Regueiro, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1218.

[²⁸] T.A. Gehring, B. Griffin, R. Williams, C. Geiseker, L.G. Rushing, P.H. Siitonen, *J Chromatogr B*. 840 (2006)132.

[²⁹] J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, L. E. García-Ayuso, K. Imai, *J. Chromatogr. A*, 1095 (2005) 60

[³⁰] K. Kishida, *Food Control* 18 (2007) 301.

UV [31] o con MS [32,33], cromatografía electrocinética micelar con detección fluorescente [34]. Se ha empleado menos la cromatografía de gases (GC) debido a la necesidad de formar derivados volátiles [35,36,37].

En general se trata de métodos de gran potencialidad, útiles para analizar un elevado número de compuestos en matrices muy diferentes y que presentan gran fiabilidad en los resultados obtenidos ya que permiten la detección, cuantificación y, en el caso de la MS, la confirmación de los mismos. Estos métodos requieren normalmente la extracción previa de las sulfonamidas con disolventes orgánicos o su purificación mediante técnicas de extracción en fase sólida (SPE).

3.2.1. DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS MEDIANTE HPLC

Las técnicas analíticas más utilizadas en la actualidad para la determinación de sulfonamidas en diferentes alimentos son las técnicas cromatográficas, fundamentalmente HPLC. La detección UV ha sido la más empleada, y se ha aplicado tanto al análisis de sulfonamidas en leche [38-39-40-41], en huevos y en carne [42-43-44] y en miel [45] aunque presenta el problema de la falta de selectividad, siendo necesaria la aplicación de procedimientos de limpieza muy eficaces.

El acoplamiento HPLC-MS presenta una gran potencialidad, debido a que permite no sólo la detección, sino también la identificación de los analitos, siendo

[31] J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, C. Cruces-Blanco, *Electrophoresis* 27 (2006) 4060.

[32] J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, *Electrophoresis* 28 (2007) 4164.

[33] L. Vera- Candioti, A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea, *Talanta*, 82 (2010) 231

[34] S. Lamba, S.K. Sanghi, A. Asthana, M. Shelke, *Anal Chim Acta* 552 (2005) 110.

[35] V.B. Reeves, *J. Chromatogr. B*, 723 (1999), 127.

[36] J.A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 127.

[37] I. Schwaiger, R. Schuch, *Dtsch. Lebensm. -Rundsch* 96 (2000) 93.

[38] W. Xu, S. Su, P. Jiang, H. Wang, X. Dong, M.J. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1217(2010) 7198.

[39] M.A. García-Mayor, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 76.

[40] W. Zhang, C. Duan, M. Wang, *Food Chemistry* 126 (2010) 779.

[41] I. Pecorelli, R. Bibi, L. Fiorni, R. Galarini, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 23.

[42] C.L. Chitescu, A.I. Nicolau, A. Csuma, C. Moisoiu, *Food Additives and Contaminants*, 28 (2011) 1013.

[43] G.Z. Fang, J.X. He, S. Wang, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 12.

[44] K. Kishida, N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 49.

[45] Maudens, K. E. Zhang, G.-F. Lambert, W. E. J. *Chromatogr. A* 1047 (1) (2004) 85.

numerosas las aportaciones en este campo [⁴⁶⁻⁴⁷⁻⁴⁸⁻⁴⁹] o MS/MS [⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵²]. La necesidad de que los métodos sean cada vez más rápidos y más eficaces ha llevado al desarrollo de métodos multiresiduos. Recientemente se han realizado análisis cuantitativos de residuos múltiples utilizando un analizador de tiempo de vuelo (TOF) acoplado a HPLC para la determinación de sulfonamidas en el músculo de bovino y porcino [⁵³], aunque dicho método requiere varias inyecciones para controlar todos los compuestos.

Más recientemente, la cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC) combinada con espectrometría de masas (MS) ha sido propuesta como técnica para la determinación multiresiduo de medicamentos veterinarios tales como (nitroimidazoles, sulfonamidas, fluoroquinolonas, quinolonas, ionóforos y dinitrocarbanilida) en tejidos animales [⁵⁴⁻⁵⁵]. Esta técnica es aplicable también a los antibióticos macrólidos y lincosamidas, bencimidazoles, levamisol, avermectinas y tranquilizantes [⁵⁶]. Mediante el empleo de columnas de menor tamaño de partícula y utilizando bombas de más altas presiones UHPLC presenta un enfoque muy potente para mejorar drásticamente la sensibilidad y la velocidad de análisis, además, se puede reducir el consumo de disolventes, con el consiguiente ahorro de costes y contribuir a la protección del medio ambiente [⁵⁷].

Además de los métodos de detección mencionados anteriormente, existen diversas aplicaciones sobre la determinación de sulfonamidas en alimentos mediante HPLC con detección fluorescente. El detector de fluorescencia es una buena alternativa al detector de MS, sobre todo debido a la sensibilidad inherente que presenta, pero los compuestos de interés deben ser previamente modificados con un reactivo apropiado, ya que las sulfonamidas no presentan fluorescencia nativa. Por este motivo, se ha llevado a cabo la derivación de las sulfonamidas ya sea en modo pre-columna o en modo post-columna, como un medio para la mejora de la sensibilidad y la selectividad del método.

[⁴⁶] W. Ben, Z. Qiang, C. Adams, H. Zhang, L. Chen, J. Chromatogr. A 1202(2008) 173.

[⁴⁷] A. Gentilí, D. Perret, S. Marchese, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 704.

[⁴⁸] B. Shao, D. Dong, Y. Wu, J. Hu, J. Meng, X. Tu, S. Xu, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 174.

[⁴⁹] W.M.A. Niessen, J. Chromatogr. A 812 (1998) 53.

[⁵⁰] Z. Cai, Y. Zhang, H. Pan, X. Tie, Y. Ren, J. Chromatogr., A, 1200 (2008)144.

[⁵¹] C. Nebot, P. Regal, B. Martínez, J. Miranda, A. Cepeda, C. Fente, J. Food Drug Anal. 18 (2010) 191.

[⁵²]M. McDonald, C. Mannion, P.A. Rafter, J. Chromatogr., A 1216 (2009) 8110.

[⁵³] K. Granelli, C. Elgerud, A. Lundstrom, A. Ohisson, P. Sjoberg. Anal. Chim. Acta,637 (2008) 87 .

[⁵⁴] M.Y. Haller, S.R. Müller, C.S. McArdeall, A.C. Alder, M.J. Suter, J. Chromatogr. A 952 (2002) 111.

[⁵⁵] L. Rongyuan, H. Pingli, L. Zhen, L. Ruiguo, J. Cromatograh. A 49 (2011) 640

[⁵⁶] L. Cun, H.Y. Jiang, S.J. Zhao, S.X. Zhang, S.Y. Ding, J.C. Li, X.W. Li, J.Z. Shen, Chromatographia 68 (2008)127.

[⁵⁷] J. Shen, L. Guo, F. Xu, Q. Rao, X. Xia, X. Li, S. Ding, Cromatographia 71 (2010) 383.

De esta manera, se ha realizado una derivatización pre-columna en extractos de músculo de pollo con cloroformato 9-fluorenilmetilo [58], utilizando detección UV, y con fluoescamina [59-60], utilizando detección fluorimétrica. Otros estudios realizados en extractos de huevo se llevaron a cabo mediante una derivatización post-columna con dimetilaminobenzaldehído y detección UV, o con o-ftaldialdehído en combinación con b-mercaptoetanol, usando la detección fluorimétrica [61].

También se ha desarrollado y validado un nuevo método recientemente para determinar sulfonamidas en muestras de miel mediante el uso de metanol en la etapa de tratamiento muestra, lo que proporciona una mejora significativa en las recuperaciones de las sulfonamidas, y que ha consistido en el empleo de un detector de fluorescencia como alternativa a los detectores de espectrometría de masas [62].

Al ser la fluoescamina el agente derivatizante más empleado y el utilizado en este trabajo de máster, comentaremos brevemente su correspondiente reacción selectiva con aminas primarias [63]. Reacciona casi instantáneamente formando 5-(2-carboxifenil)-5-hidroxi-3-fenil-2-pirrolina-4-ona, mientras que el exceso se hidroliza a un producto no fluorescente, no siendo el reactivo por sí mismo un producto fluorescente. La Figura 3 ilustra la reacción. La conversión se lleva a cabo en una mezcla agua-acetona con agitación, y los derivados producidos pueden ser directamente separados mediante cromatografía en fase inversa. También tiene la ventaja de que al ser una reacción tan rápida, se puede acoplar post-columna y producir el marcado de los compuestos después de su separación. La excitación de los productos fluorescentes ocurre normalmente a 390 nm con una emisión fluorescente a 475 nm. En cuanto al mecanismo de la reacción de derivatización de las sulfonamidas, una posible vía se muestra en la Figura 4.

[58] Q. H. Zou, M. X. Xie, X. F. Wang, Y. Liu, J. Wang, J., Song, H. Gao, J. Han, J. Sep. Sci.30 (2007) 2647.

[59] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr., 1087 (2005) 259.

[60] E. J.Simeonidou, N. A. Botsoglou, I. E. Psomas, D. J. Fletouris, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 19 (2006) 2349.

[61] P. Vinas, C. López Erroz, N. Campillo, M. Hernández- Córdoba, J. Chromatogr. A 726 (1996) 125.

[62] J. Bernal, M. J. Nozal, J. J. Jiménez, M. T. Martín, E. Sanz, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 7275.

[63] R.W. Frei, J.F. Lawrence (Ed.), Chemical derivatization in analytical chemistry Vol. 2, Plenum Press, New York (1982), pp 210-211.

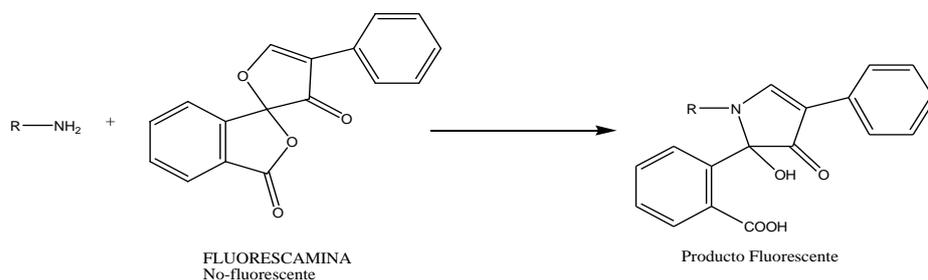


Figura 3. Reacción de la FR con aminas primarias

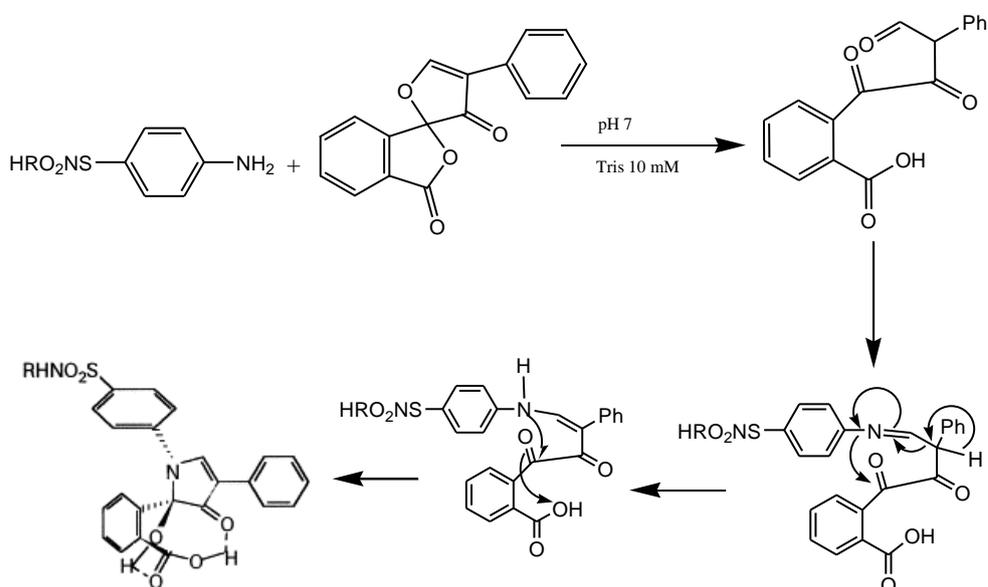


Figura 4. Mecanismo de la reacción de derivatización FR-Sulfonamida.

Así, con HPLC con detección por fluorescencia se han realizado estudios que determinan la presencia de sulfonamidas en aves de corral [64], en miel y huevos [65] y en tejidos musculares de origen animal, como carne de cerdo, cordero y ternera [66].

Se han determinado ocho [67] y trece [62] sulfonamidas en miel, derivatizando los analitos con fluorescamina (4-fenilspiro[*furan-2(3H)*, 1'-*ftalan*]-3,3'-diona) para su

[64] A. Zotou, C. J. Vasiliadou, J. Sep. Sci. 33 (2010) 11.

[65] V. Bonta, L.A. Marguitas, D. Diezmirean, O. Bobis, A. Science Bio. 66 (2009) 1

[66] E. M. Costi, M. D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6250.

detección fluorescente obteniendo unas recuperaciones entre el 56-96 % [67] y el 80.9-99.6% [62], respectivamente. La fluorescamina también ha sido empleada como agente derivatizante para la determinación mediante HPLC con detección por fluorescencia de 10 sulfonamidas en alimentos de origen animal (carne y riñón) [68] y de 8 sulfonamidas en diversas muestras de carne y tejidos animales (músculo, hígado y riñón) [69].

3.2.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS: TRATAMIENTO DE MUESTRA

La mayoría de los procedimientos de tratamiento de muestra implican el uso de extracciones repetidas seguido de etapas de limpieza, con objeto de eliminar las interferencias de la matriz y preconcentración con objeto de llegar a la determinación por debajo de los límites legales, aumentando la sensibilidad del método. Debido a la ausencia de disolventes adecuados para extraer cuantitativamente los analitos que presentan una amplia gama de polaridad, la extracción debe realizarse con grandes volúmenes de disolvente (por lo general entre 15 y 140 ml por muestra) [50-70 -71 -69-27-41], asistido por procedimientos auxiliares tales como ultrasonidos [72], microondas [73] o presión [74]. El disolvente más empleado es el acetonitrilo, solo o en presencia de sales. También se han descrito disolventes alternativos como pueden ser los fluidos supercríticos [75].

En cuanto a la etapa de limpieza, se realiza normalmente mediante extracción líquido-líquido (LLE) [73-74-68] y/o extracción en fase sólida (SPE) [74-66], mientras que la preconcentración se consigue generalmente por evaporación del disolvente.

[67] W. H. Tsai, H. Y. Chuan, H. H. Chen, Y. W. Wu, S.H. Cheng, T. C. Huang, J. Chromatogr A. 1217(2010)7812.

[68] G. Stoev, A. Michailova, J. Chromatogr. A 871 (2000) 37.

[69] C.D. Salisbury, J.C. Sweet, R. Munro, J. AOAC Int. 87 (2004) 1264.

[70] W. Hela, M. Brandtner, R. Widek, R. Schuh, Food Chem. 83 (2003) 601.

[71] B. Shao, D. Dong, Y. Wu, J. Hu, J. Meng, X. Tu, S. Xu, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 174.

[72] T. Li, Z.-G. Shi, M.-M. Zheng, Y.-Q. Feng, J. Chromatogr. A 1205 (2008) 163.

[73] M.H. Akhtar, M. Wong, S.R.H. Crooks, A. Sauve, Food Addit. Contam. 15 (1998) 542.

[74] G. Font, A. J. García, Y. Pico, J. Chromatogr. A 1159 (2007) 233.

[75] V. Arancibia, M. Valderrama, P. Rodríguez, F. Hurtado, R. Segura, J. Sep. Sci. 26 (2003) 1710.

Se pueden simplificar los procesos de tratamiento de muestra mediante procesos tales como extracción de la matriz en fase sólida dispersiva (MSPDE) [44], SPE dispersiva [59] o microextracción en fase líquida (LPME) [75] que pueden reducir los tiempo de análisis y de consumo de disolventes.

Recientemente se han evaluado distintos disolventes supramoleculares (Supras) para la extracción de residuos de sulfonamidas en tejidos animales con el fin de desarrollar un procedimiento de tratamiento de muestra rápido, sencillo y eficaz que, junto con una técnica sencilla, como es el caso de LC-fluorescencia, proporcione un método de bajo coste capaz de cumplir con los requisitos de la Decisión 2002/657/CE [76].

3.2.3. QuEChERS

La preparación de la muestra siempre es el mayor cuello de botella en el procedimiento analítico completo para la determinación de sulfonamidas en muestras de alimentos [77]. Así, la mayoría de los métodos citados son bastante complicados ya que consumen un gran volumen de disolvente, requieren un trabajo intensivo y son muy costosos, debido principalmente a la complejidad de los analitos y las matrices involucradas.

Anastassiades y col. publicaron en 2003 un método que proporcionaba resultados satisfactorios reduciendo notablemente los pasos en el desarrollo de la extracción y el consumo de materiales y disolventes, siendo aplicado al análisis de residuos de plaguicidas en vegetales [78]. Se denominó al método con el nombre QuEChERS, un acrónimo que reflejaba sus principales ventajas (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). El procedimiento multiresiduo QuEChERS omite o sustituye muchos pasos analíticos complicados utilizados normalmente en los métodos tradicionales, por otros más fáciles. En la Figura 5 se pueden observar las distintas etapas de esta metodología para el tratamiento de muestra.

[76] F. J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

[77] S. Mitra, "Sample preparation techniques in analytical chemistry". Wiley. (2003).

[78] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.



Figura 5: Representación gráfica de los pasos QuEChERS. 1° Pesada de la muestra, 2° Adición del disolvente de extracción, 3° Agitación, 4° Adición de sales de extracción, 5° Fortificación, 6° Centrifugación, 7° Separación de fases, 8° Etapa de limpieza, 9° Centrifugación, 10° Separación de fases, 11° Medida

La primera etapa de la técnica QuEChERS es de suma importancia, ya que se trata de la homogeneización de la muestra, con objeto de maximizar el área de la superficie y garantizar una mejor eficiencia de extracción, mediante agitación manual o

con el vórtex. A continuación tiene lugar la etapa de extracción, que se puede realizar con disolventes no halogenados como acetona y acetato de etilo, pero el acetonitrilo es el disolvente recomendado ya que se separa más fácilmente del agua que la acetona, mediante la adición de una mezcla de sales apropiadas (sulfato de magnesio anhidro, MgSO_4 , y cloruro sódico, NaCl) que proporcionan una adecuada separación de fases sin necesidad de diluir el extracto con disolventes no polares tóxicos al mismo tiempo que recupera grandes cantidades de analito, incluyendo los polares [79].

Después de la centrifugación, que proporciona una buena separación física de las fases (Figura 6), se produce la limpieza del extracto mediante SPE dispersiva. En esta etapa se toma una alícuota del extracto de la muestra y se añade a un frasco que contiene una pequeña cantidad de adsorbente (amina primaria y secundaria, PSA), que retiene los componentes de la matriz sin retener los componentes de interés, y la mezcla se agita o se mezcla en un vórtex para distribuir uniformemente el material adsorbente y facilitar el proceso de limpieza. El adsorbente se separa por centrifugación y una alícuota del sobrenadante se somete a análisis.



Figura 6: Disposición de fases de un extracto vegetal obtenido con el método *QuEChERS* tras centrifugar. El material vegetal queda en medio separando la fase orgánica, de la fase acuosa y las sales que permanecen en el fondo.

A menudo, la alícuota de la muestra puede ser inyectada directamente en un sistema de GC o HPLC, sin otro tipo de tratamiento. Por otro lado, para un análisis mediante LC-MS o GC-MS podría ser necesario añadir ácido fórmico para proporcionar

[79] K. Mastovska, S.J. Lehotay. J. Chromatogr. A. 1040 (2004) 259.

una mejor sensibilidad, y si el instrumento no está equipado con un vaporizador de temperatura programable, la evaporación del sobrenadante podría ser necesaria.

La técnica ha demostrado ser exitosa para la extracción de plaguicidas en una amplia variedad de frutas y verduras y ha sido adoptado como método normalizado europeo para la determinación de plaguicidas [⁸⁰⁻⁸¹]. El método QuEChERS se encuentra actualmente comercializado por diversas empresas, siendo posible encontrar diferentes kits de extracción y limpieza en función del tipo de muestra. Actualmente este método está siendo evaluado por multitud de laboratorios, debido a su gran aceptación, y se ha obtenido la validación para un gran número de analitos, siendo aún muy escasas las aplicaciones en la extracción de antibióticos en alimentos de origen animal [⁸²⁻⁸³].

Ventajas del método QuEChERS:

- Un solo analista puede preparar un lote entre 6 y 12 extractos en 30-40 min con un coste por muestra de aproximadamente 1 ó 2 € en materiales desechables y generar menos de 12 mL de disolventes de desecho.
- En la mayoría de las matrices se pueden conseguir altas recuperaciones consistentes (la mayoría del 60-110% con DERs < 5%) en un amplio rango de muestras cromatografiables por GC y LC.
- Se trata de una técnica de preparación de muestras altamente eficaz y de bajo coste que puede usarse en la mayoría de las matrices de alimentos para el análisis de un amplio rango de muestras.

[⁸⁰] Norm EN 15662:2008. "Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method", 01-02-2009.

[⁸¹] S. J. Lehotay, J. AOAC International, 90 (2007) 485.

[⁸²] J.-Y. Park, J.-H. Choi, A.M. Abd El-Aty, B. M. Kim, J.-H. Oh, J.-A. D. K. Sung Kwon, K.-H. Shim, O.-J. Choi, S. C. Shin, J.-H. Shim, Food Chemistry 128 (2011) 241.

[⁸³] G. Stubbings, T. Bigwood, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 68.

Ventajas de la SPE dispersiva empleada en el método QuEChERS frente a la SPE estándar:

Método SPE Estándar	Método QuEChERS
Procesamiento de muestra: 120 min.	30 min. 25% del tiempo
Gasto de solvente: 60-90 mL	Gasto de solvente: 10-15 mL
Solventes clorados: 20-30 mL	Solventes clorados: Ninguno

La metodología QuEChERS parece tener un futuro brillante en el análisis de fármacos en muestras de leche y carne y en productos agrícolas [84]. La metodología QuEChERS ha sido empleada para determinar antibióticos beta-lactámicos en el tejido de riñón de bovino y para determinar la ivermectina en el salmón y la presencia de antioxidantes en alimentos para mascotas [85]. Recientemente, se ha desarrollado un método para determinar 18 medicamentos veterinarios, que incluyen quinolonas, sulfonamidas, macrólidos, tetraciclinas y antihelmínticos en la leche por UPLC-MS/MS empleando como procedimiento de extracción la metodología QuEChERS. Para ello, la extracción tiene lugar con acetonitrilo y el procedimiento no requiere etapa clean up. Se optimizaron varios parámetros cromatográficos con el fin de obtener una separación rápida (menos de 10 minutos). El método desarrollado se ha validado en términos de linealidad, exactitud, precisión, límites de detección (LD) y cuantificación. La media de recuperación osciló entre 70% a 110% y la precisión interdiaria fue inferior al 21%. Por último, el método fue aplicado a muestras reales y sólo se detectaron trazas de tilosina y fenbendazol en dos muestras [86]. En nuestro grupo de investigación se ha empleado como tratamiento de muestra previo al análisis de las 8 quinolonas de uso veterinario en leche mediante HPLC capilar con detección por fluorescencia inducida por láser [87], así

[84] C. F. Fagerquist, A. R. Lightfield, S. Lehotay, J. Anal.Chem. 77 (2005)1473.

[85] E. Roland, Major, LCGC North America, 1 (2007).

[86] M. M. Aguilera-Luiz, J. L. Vidal, R. Romero-González, A. Frenich. J Chromatogr A. 1205(2008)10.

[87] M. Lombardo-Agüí, L. Gámiz Gracia, C. Cruces Blanco, A.M. García Campaña. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 4966.

como en su determinación en muestras de miel y productos derivados de las abejas, obteniéndose resultados satisfactorios [⁸⁸].

A pesar de que tenemos que ajustar la metodología en función del analito y de la matriz, la técnica puede ser adaptada a otras matrices sólidas, tales como residuos sólidos y otras muestras ambientales, materiales poliméricos, cualquier sólido que pueda ser homogeneizado finamente y humedecido con agua, etc. Todavía están por desarrollarse multitud de aplicaciones que es capaz de proporcionarnos esta sencilla, eficaz, rápida y económica técnica de preparación de muestras.

[⁸⁸] M. Lombardo-Agüí, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, C. Cruces Blanco, Talanta (en revisión) (2011).

REACTIVOS Y MATERIAL

4. REACTIVOS Y MATERIAL.

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico y los disolventes de grado HPLC. El metanol (MeOH), el acetonitrilo (AcN), la fluorescamina (FR) y las sulfonamidas fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU); el ácido acético fue suministrado por VWR International (West Chester, Pensilvania, EEUU); el tris (hidroximetil)aminometano y la acetona por Merck (Darmstadt, Alemania) y finalmente, el isopropanol que fue suministrado por Panreac-Química (Madrid, España).

El agua empleada en todo el trabajo fue agua ultrapura ($18.2 \text{ m}\Omega\text{cm}^{-1}$) obtenida mediante el sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

En el proceso del tratamiento de muestra hemos usado tubos Falcon de 15 y 45 ml suministrados por VWR International (West Chester, Pensilvania, EEUU) y los kits de extracción SampliQ tamponados (4 g MgSO_4 , 1 g NaCl, 1 g citrato sódico, 0,5 g citrato disodio sesquihidrato) por Agilent Technologies (Santa Clara, EEUU).

Se utilizaron filtros de nylon de $0,2 \mu\text{m}$ suministrados por Pall Corporation (Minnesota, EEUU) para la filtración de las muestras y jeringas de 1 mL por BD Discardit, (EEUU)

Se prepararon disoluciones estándar individuales de cada sulfonamida (Sulfadiazina (SDZ), Sulfametoxazol (SMX), Sulfametizol (SMI), Sulfameter (SMT), Sulfadimetoxina (SDM), Sulfapiridina (SPD), Sulfametazina (SMZ), Sulfaclopiridazina (SCP), Sulfadoxin (SDX)) a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$. Se disolvió cada sulfonamida suministrada en forma cristalina (Sigma-Aldrich) en MeOH y se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en un frasco de vidrio topacio, preservándolas de la luz. Estas disoluciones permanecen estables durante dos meses conservándolas en estas condiciones. A partir de estas disoluciones estándar se preparó una disolución intermedia que contenía una mezcla de las 9 sulfonamidas a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$. Para preparar esta disolución se tomaron alícuotas de $10 \mu\text{L}$ de cada una de las sulfonamidas y se enrasaron hasta 10 mL de MeOH. Finalmente, las disoluciones de trabajo que contienen la mezcla de las 9 sulfonamidas fueron preparadas diariamente añadiendo a las disoluciones intermedias tampón tris (hidroximetil)aminometano 10

REACTIVOS Y MATERIAL

mM, a pH 7. Dicho tampón se preparó disolviendo 121 mg tampón tris (hidroximetil)aminometano en 100 mL de agua milli-Q y ajustando el pH a 7 con disolución HCl 1 M. Por otra parte, se preparó la disolución de FR a una concentración de 4 g/L añadiendo 20 mg de la misma a 5 ml de acetona.

INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

5. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Para la realización de todas las medidas se empleó un equipo de cromatografía líquida modular (Figura 7) consistente en una bomba cuaternaria de alta presión (Jasco Pu-2089) acoplado a un detector UV/ Vis multicanal (Jasco UV-2077) seguido de un detector de fluorescencia (Jasco-FP 2025, Tokio, Japan). La columna empleada en la separación fue una Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 cm, 3µm) de Supelco (Bellefonte, PA, EEUU). Para la introducción de las muestras se empleó un sistema de inyección automático (Jasco AS-2055).

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España). Para la preparación de las disoluciones estándar, intermedias, de trabajo y muestras se utilizó un agitador Vórtex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia, NY, EEUU). Además, en el tratamiento de las muestras se empleó un sistema de evaporación de nitrógeno Evaporators EVA EC-S/EVA LS-S (VLM GmbH, Bielefeld, Alemania) y una centrífuga Model Universal 320R (Hettich, Tuttlingen, Alemania).



Figura 7: Equipo de cromatografía líquida modular con detección fluorescente

Los cromatogramas obtenidos se registraron y procesaron con el programa CromNav Asimismo, se utilizaron los programas Excel (Microsoft), versión 2007 y StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, EEUU) para el posterior tratamiento de datos.

PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO PROPUESTO

6. PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO PROPUESTO

La separación cromatográfica de las 9 sulfonamidas (SDZ, SMX, SMI, SMT, SDM, SPD, SMZ, SCP, SDX) se llevó a cabo utilizando una fase móvil en modo gradiente. Dicha fase móvil consistió en agua mili-Q/ ácido acético (98:2, v/v) con pH = 2.5 (A) y acetonitrilo (B). Ambos fueron introducidos en el equipo mediante una bomba de alta presión y mediante un programa de gradiente se controló el funcionamiento del sistema variando la composición de la fase móvil con el tiempo, de manera que se acorten los tiempos de análisis y se mejore la resolución de los picos. Para llevar a cabo la separación de las sulfonamidas se aplicó un caudal de 1,1 mL/min, y se utilizó una columna Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 cm, 3µm). Las sulfonamidas en muestras de leche fueron cuantificadas, una vez realizada la reacción de derivatización off-line, por medidas de fluorescencia realizadas a unas longitudes de onda de emisión y excitación de $\lambda_{em}=405$ nm y $\lambda_{exc}=495$ nm, siendo las condiciones óptimas de esta reacción para 1mL de la disolución de las 9 sulfonamidas:

- Agente derivatizante: 50 µL de FR (4g/L) disuelta en acetona
- Disolvente de la muestra: Tampón Tris 10 mM, pH 7.
- Tiempo de reacción: 15 minutos en el ultrasonidos

El programa de gradiente de elución de la fase móvil que empleamos fue el siguiente:

- A los 2 min 65 % A; 35 % B
- A los 15 min 50 % A; 50 % B
- A los 20 min 50 % A; 50% B
- A los 22 min 65 % A; 35% B
- A los 30 min 65 % A; 35% B.

TRATAMIENTO DE MUESTRA

7. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El procedimiento aplicado estaba basado en el descrito por Agilent Technologies para la determinación de sulfonamidas en hígado bovino [⁸⁹]. A lo largo del presente trabajo se ha evaluado la metodología QuEChERS para la determinación de las nueve sulfonamidas anteriormente descritas en leche, hasta ahora sólo aplicado en muestras de carne y miel [⁶⁷⁻⁹⁰].

A continuación se describe el tratamiento de muestra propuesto, recogido asimismo en la figura 8

- Se toman 2 mL de leche en un tubo falcon de 50 mL
- Se añaden 8 mL de agua mili-Q
- Se añaden 10 mL de acetonitrilo con 5% de ácido acético
- Se agita vigorosamente durante 30 segundos.
- Se añade el kit de extracción SampliQ EN QuEChERS tamponado (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g citrato sódico, 0,5 g citrato disodio sesquihidrato)
- Se agita vigorosamente durante 1 minuto
- Se centrifuga durante 5 min a 4000 rpm
- Se recoge 1,5 mL del sobrenadante que ponemos en un vial de 4 ml y se lleva a sequedad mediante corriente de nitrógeno
- Se recompone en 1,5 mL tampón TRIS pH 7.0
- Se agita durante 2 minutos en el vórtex
- Se filtra (con un filtro de 0,2 µm) y se pasa de nuevo a un vial de 4 ml
- Se toma 1 ml, se pone en un vial de 2 mL y se añade 50 µL de fluorescamina
- Se somete a sonicación durante 15 minutos
- Y finalmente se analiza mediante HPLC-FL

[⁸⁹] L. Zhao, J. Stevens Agilent Technologies, Inc. 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808

[⁹⁰] W.H. Tsai, H.Y. Chuang, H.H. Chen, Y.W. Wu, S.H. Cheng, T.C. Huang, J. Chromatogr., A 1217 (2010) 7812.

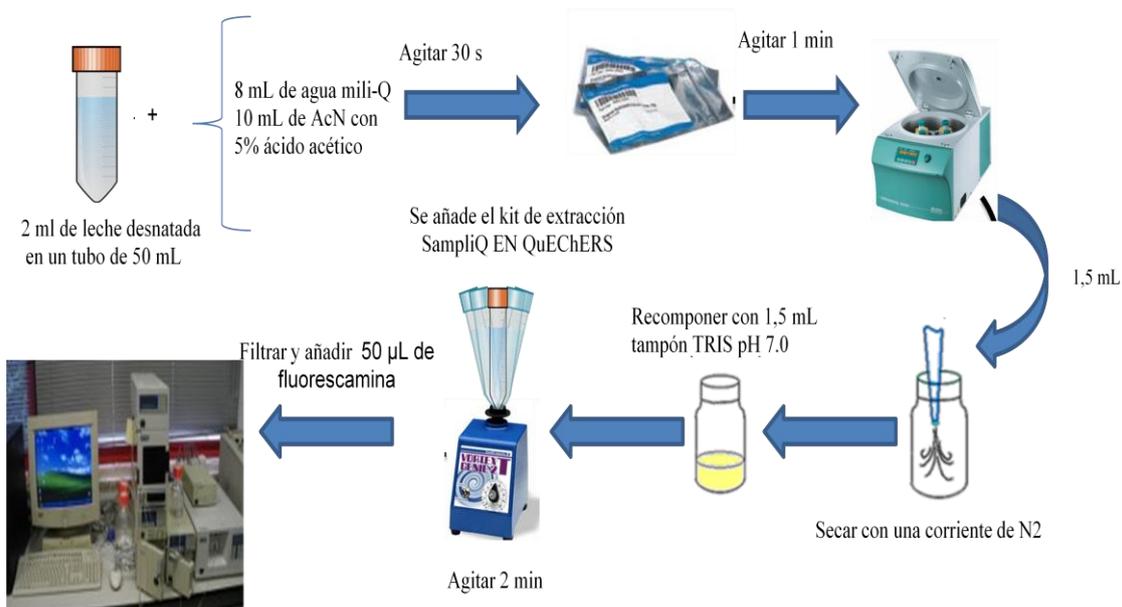


Figura 8: Esquema del tratamiento de muestra para la determinación de sulfonamidas en leche por el método propuesto.

La Figura 9 presenta los cromatogramas obtenidos para una muestra de leche sin fortificar y el obtenido para una muestra de la misma leche que se ha fortificado con la mezcla de 9 sulfonamidas.

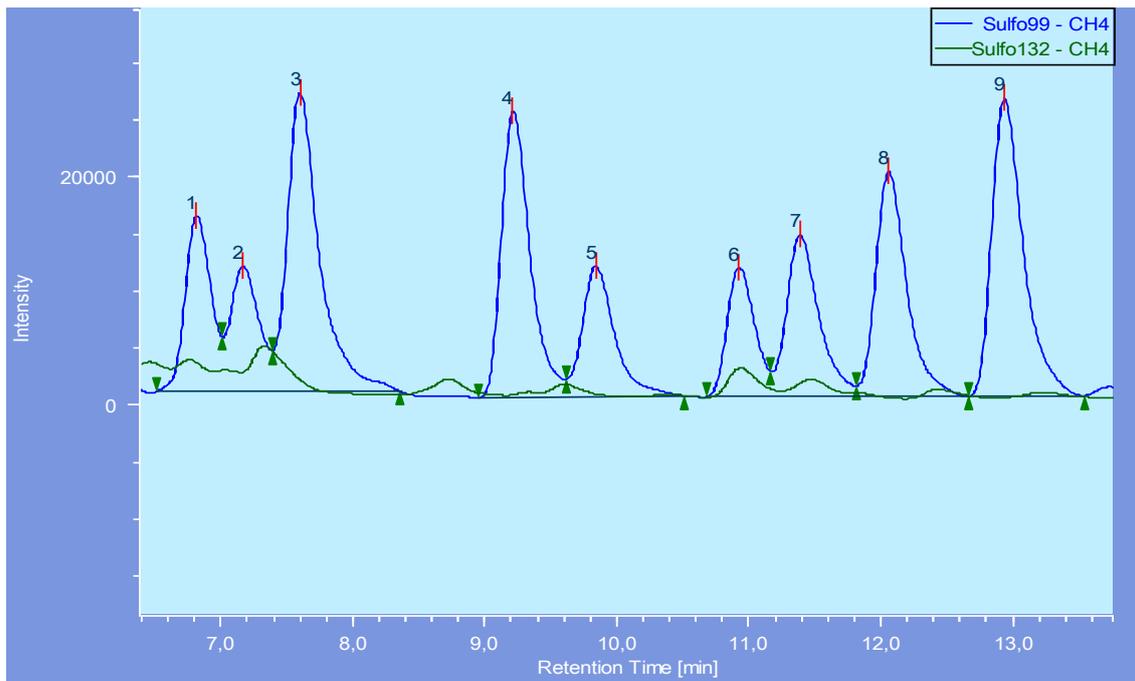


Figura 9: Comparativa de cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas para una muestra de leche sin fortificar y una muestra de leche fortificada con una mezcla de 9 sulfonamidas a 10 µg/L. (1. SPD, 2. SZD, 3. SMR, 4. SMZ, 5. SMI, 6. SMT, 7. SDX, 8. SMX, 9. SDM)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Basándonos en trabajos previos [62-69] de determinación de sulfonamidas mediante HPLC con detección por fluorescencia y aplicando como procedimiento de tratamiento de muestra la metodología QuEChERS, en este trabajo se realizó una optimización de las variables que influyen en la separación cromatográfica, previamente a la optimización del tratamiento de muestra.

Esta optimización se llevó a cabo en modo univariante, estudiando por separado cada una de las variables implicadas en el proceso con objeto de obtener unos valores óptimos que proporcionen la mejor separación cromatográfica en términos tanto de intensidad de la señal analítica (área y altura de pico) para cada uno de los analitos, como de resolución de los picos, todo ello en el menor tiempo de análisis posible.

Las condiciones de partida empleadas para la optimización fueron las siguientes: la columna empleada en la separación fue una Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 mm, 3µm), se trabajó con un caudal de 0,7 mL/min, con un volumen de inyección de muestra de 20 µL y con una ganancia del detector de 10.

A continuación se comentan cada uno de los parámetros estudiados.

6.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL.

Es necesaria la utilización de un gradiente de elución para abordar la separación de las 9 sulfonamidas en un tiempo de análisis que no sea muy elevado. El cambio controlado en la composición de la fase móvil durante el proceso cromatográfico amplía enormemente las posibilidades de la HPLC, al obtenerse discriminaciones más efectivas y posibilitar separaciones complejas, además de reducir ampliamente el tiempo de análisis.

En todo momento se trabajó con cromatografía en fase inversa en modo gradiente con una columna Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 mm, 3µm), y considerando los resultados en base a la resolución de los picos y la intensidad de la señal fluorescente como área y altura del pico. De esta manera, y con objeto de separar las 9 sulfonamidas seleccionadas en el menor tiempo posible, se probaron distintas fases móviles consistentes en mezclas binarias de los siguientes disolventes: (i) AcN y agua con 2% de ácido acético; (ii) metanol y agua con 2% de ácido acético, seleccionándose la primera de ellas. Posteriormente se optimizó el pH de la fase acuosa; para ello se ensayaron los siguientes valores de pH: 2,5; 3,5; 4,0 y 4,5. Para ajustar el pH de la fase móvil hemos empleado NaOH 1M, ya que la disolución de agua con 2% de ácido acético presenta un pH de 2,5. A medida que aumentamos el pH disminuyeron los tiempos de retención, pero también disminuyeron la sensibilidad y la resolución, por lo que los mejores resultados en cuanto a resolución se obtuvieron con pH 2,5, por esta razón se decidió fijar éste como óptimo. Por último se probó a incluir un 5% de isopropanol como modificador orgánico en la fase orgánica, con el fin de aumentar la resolución entre los picos; sin embargo no obteníamos mejoras en dicha resolución, por lo que la fase móvil elegida como óptima fue la siguiente: A= agua con 2% de ácido acético a pH 2.5 y B= AcN. Dichos disolventes fueron introducidos con una bomba a presión y mediante un programa de gradiente se controló el funcionamiento del sistema variando la composición de la fase móvil con el tiempo.

El siguiente paso fue optimizar el programa de gradiente. Así, con objeto de separar las 9 sulfonamidas seleccionadas en el menor tiempo posible, se probaron distintos gradientes, modificando el intervalo de tiempo en el que se aumenta el porcentaje de B. Con esto conseguimos acortar el tiempo de análisis y mejorar la resolución de los picos. Como resultado se observó que empezando con un alto porcentaje de A (65%) y aumentando progresivamente el porcentaje de B, hasta los 15 minutos, donde alcanzábamos un 50%, se conseguían eluir todos los analitos, obteniendo picos que presentan una buena resolución. El tiempo de análisis estuvo próximo a los 22 minutos. El cromatograma que se muestra en la Figura 10 fue obtenido para otro de los gradientes de la fase móvil ensayados que se muestra en la Tabla 2.

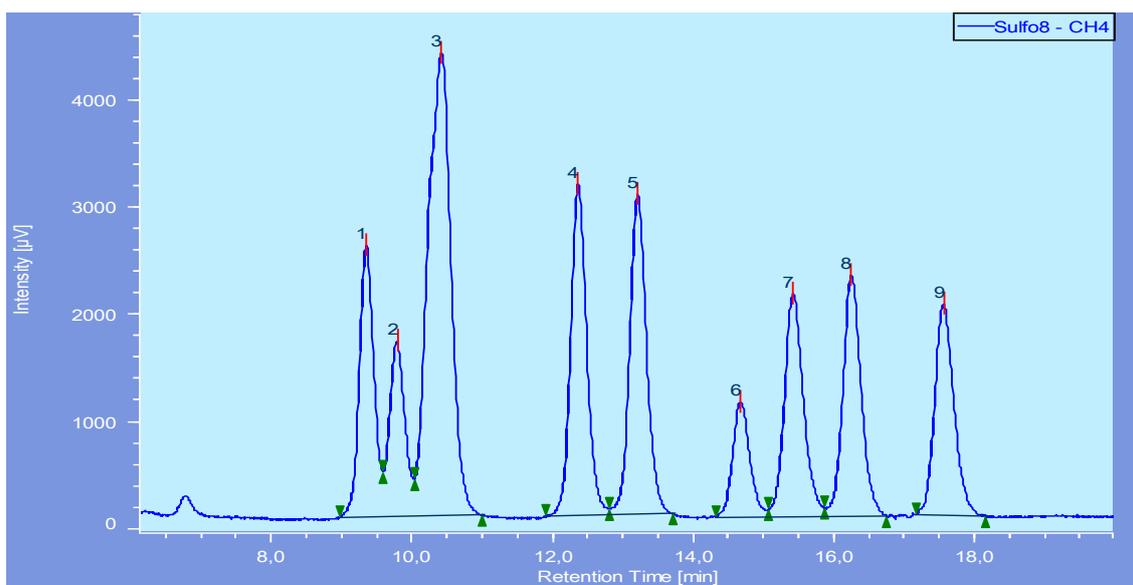


Figura 10: Cromatograma obtenido al aplicar un gradiente distinto al seleccionado (condiciones en Tabla 2) (Disolución de 9 sulfonamidas a 10 µg/L; 1. SPD, 2. SZD, 3. SMR, 4. SMZ, 5. SMI, 6. SMT, 7. SDX, 8. SMX, 9. SDM).

TIEMPO (min)	(A) Agua + 2% ác. acético	(B) AcN
20	50	50
22	65	35
30	65	35

Tabla 2: Gradiente ensayado

A la vista de los resultados obtenidos, decidimos seleccionar el programa de gradiente de elución de la fase móvil que aparece en la Tabla 3, que nos proporcionó tiempos de retención no demasiado elevados, con el fin de no alargar excesivamente el tiempo de análisis.

TIEMPO (min)	(A) Agua + 2% ác. acético	(B) AcN
2	65	35
15	50	50
20	50	50
22	65	35
30	65	35

Tabla 3: Gradiente seleccionado

6.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL CAUDAL

Los aspectos cinéticos juegan en cromatografía un papel importante. Por una parte, debe considerarse el tiempo en que se alcanza el equilibrio de distribución del sistema y, por otra parte, la velocidad de desplazamiento de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico. Dichas características cinéticas del proceso son claves para definir el ensanchamiento de banda que es el que determina, en definitiva, la eficiencia del sistema cromatográfico.

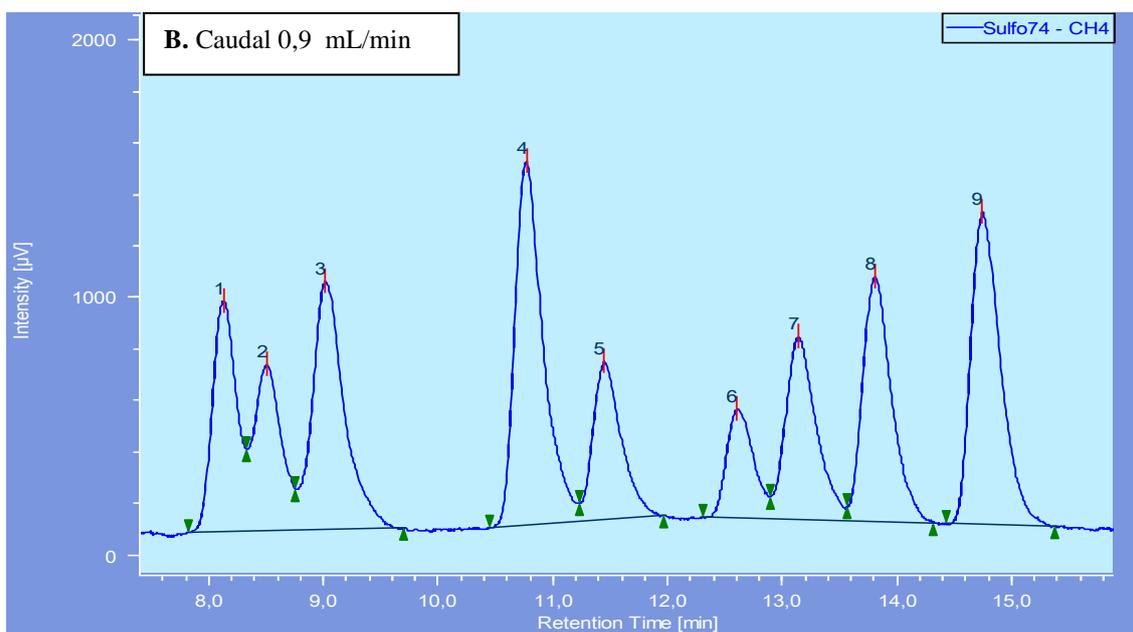
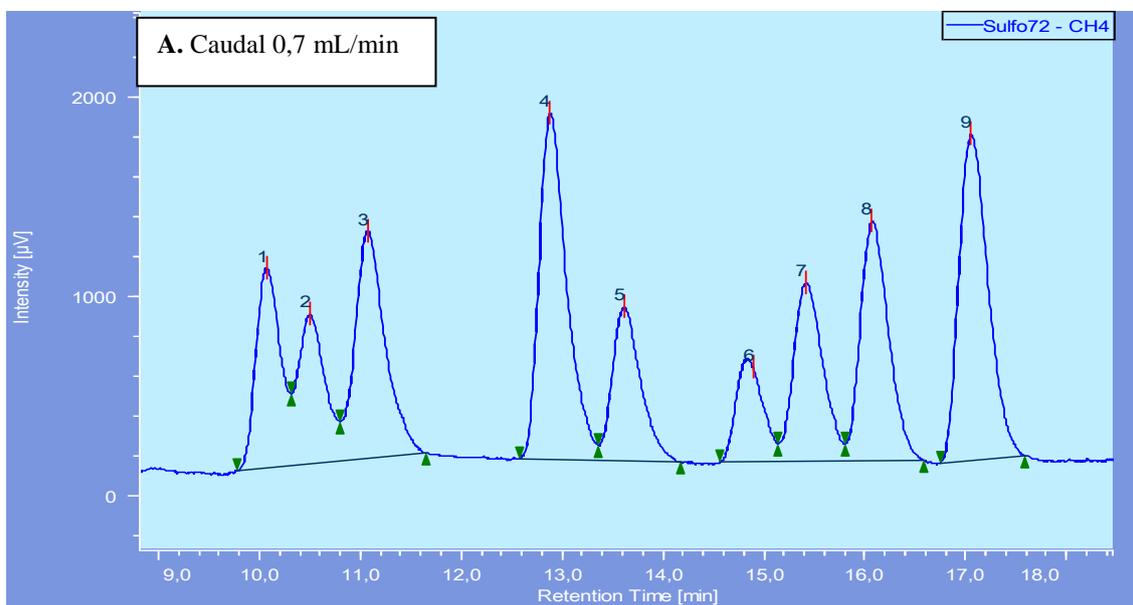
Con objeto de elegir el caudal de la fase móvil más apropiado, hemos estudiado cómo influye esta variable en la eficiencia del sistema cromatográfico, reflejada en el ancho de banda y en la resolución de los picos para cada sulfonamida.

Para la optimización de este parámetro se preparó una disolución de la forma habitual (1 ml de la mezcla de 9 sulfonamidas a 10 µg/L y 50 µL de fluorescamina) y se introdujo en el sistema cromatográfico para realizar la medida, manteniendo constantes las condiciones iniciales y modificando el caudal de la fase móvil entre 0,7 mL/min y 1,3 mL/min).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11 y en ellos puede observarse que en el rango de valores correspondientes al caudal que hemos modificado, el tiempo de retención disminuye al aumentar el caudal de la fase móvil y la presión del equipo aumenta. Teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de disminuir el tiempo de análisis, manteniendo buenas resoluciones de los picos cromatográficos, y valores de presión que no sean superiores a 15 MPa, en las medidas sucesivas se propone utilizar un caudal de 1,1 mL/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al aplicar el caudal seleccionado y manteniendo constantes las condiciones iniciales podemos obtener el cromatograma completo en 13,5 minutos.



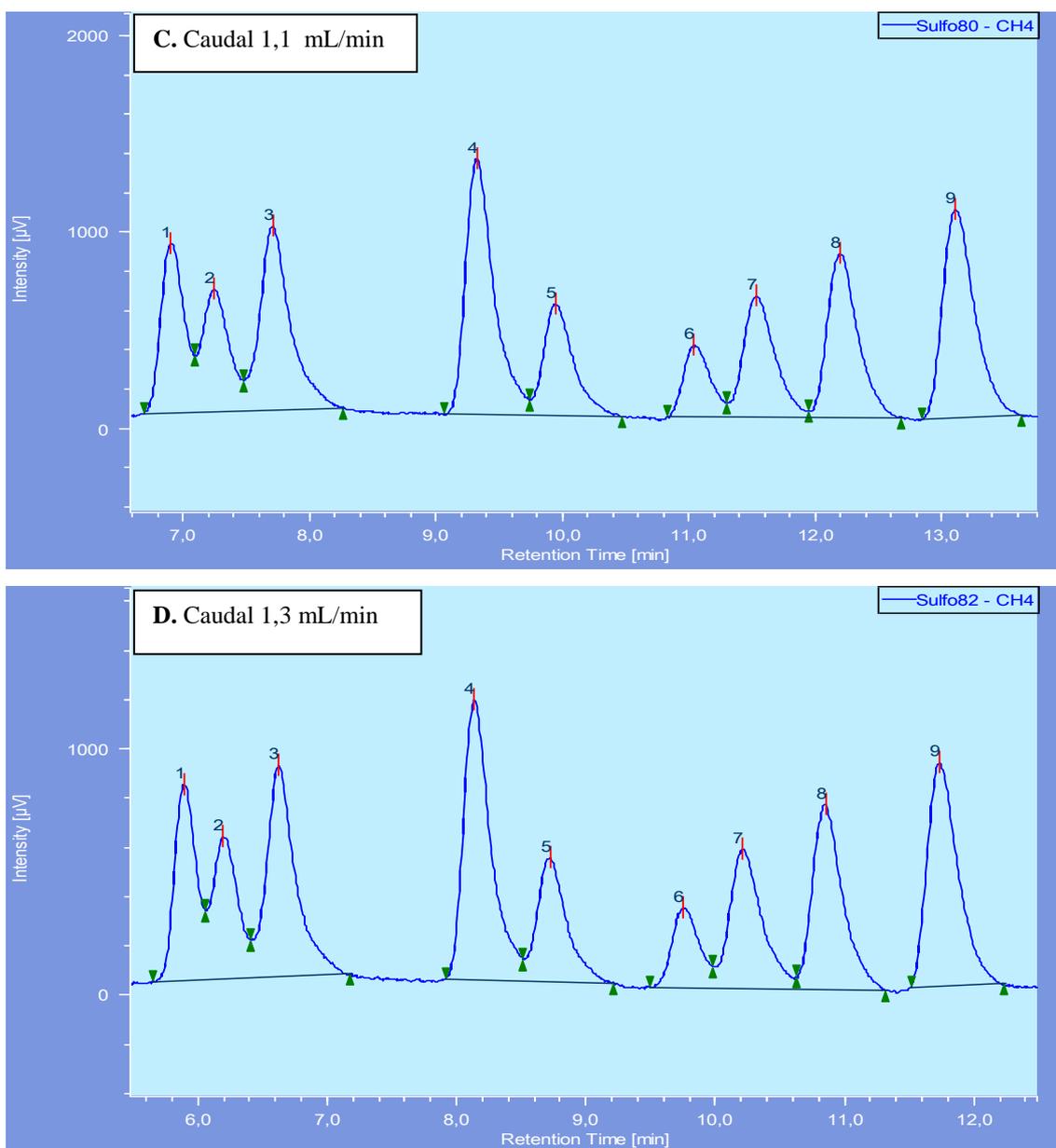


Figura 11: Cromatograma obtenido al aplicar diferentes caudales; **A.** 0,7 mL/min.; **B.** 0,9 mL/min; **C.** 1,1 mL/min; **D.** 1,3 mL/min.; (Disolución de 9 sulfonamidas a 10 $\mu\text{g/L}$; 1. SPD, 2. SZD, 3. SMR, 4. SMZ, 5. SMI, 6. SMT, 7. SDX, 8. SMX, 9. SDM)

En la Tabla 4 que se muestra a continuación aparece como disminuyen los tiempos de retención (T_R) a medida que aumentamos el caudal de la fase móvil.

T_R							
SAS	0,7 mL/min.	0,8 mL/min.	0,9 mL/min.	1,0 mL/min.	1,1 mL/min.	1,2 mL/min.	1,3 mL/min.
SPD	10,06	9,03	8,13	7,46	6,91	6,33	5,89
SDZ	10,50	9,43	8,51	7,83	7,25	6,66	6,19
SMX	11,07	9,93	9,02	8,30	7,71	7,11	6,63
SMI	12,88	11,71	10,77	9,96	9,33	8,67	8,13
SMT	13,60	12,39	11,44	10,62	9,94	9,26	8,72
SCP	14,88	13,56	12,60	11,73	11,03	10,32	9,74
SMZ	15,41	14,11	13,13	12,24	11,53	10,78	10,20
SDX	16,06	14,78	13,80	12,90	12,18	11,43	10,84
SDM	17,04	15,73	14,73	13,83	13,10	12,33	11,73

Tabla 4: Variación de los T_R en función del caudal aplicado.

8.1.3. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN

El volumen de inyección se debe seleccionar dependiendo de la concentración del analito en la muestra. Para los estudios de optimización se utilizaron volúmenes de inyección que van desde 20 μL a 100 μL , en intervalos de 20 μL . Los resultados mostraron un aumento de la sensibilidad al aumentar el volumen, sin disminuir la resolución de los picos ni aumentar significativamente los tiempos de retención. Como la concentración de la disolución de 9 sulfonamidas es muy baja (10 $\mu\text{g/L}$) hemos seleccionado finalmente 100 μL , el volumen máximo permitido por el bucle de inyección del equipo, siendo un volumen suficientemente alto para lograr señales analíticas adecuadas que puedan ser fácilmente medibles.

La intensidad de la señal aumenta al incrementar el volumen de inyección, como puede observarse en la Figura 12 en la que aparece la comparativa entre un volumen de inyección de 40 μL y el volumen de inyección que hemos seleccionado de 100 μL .

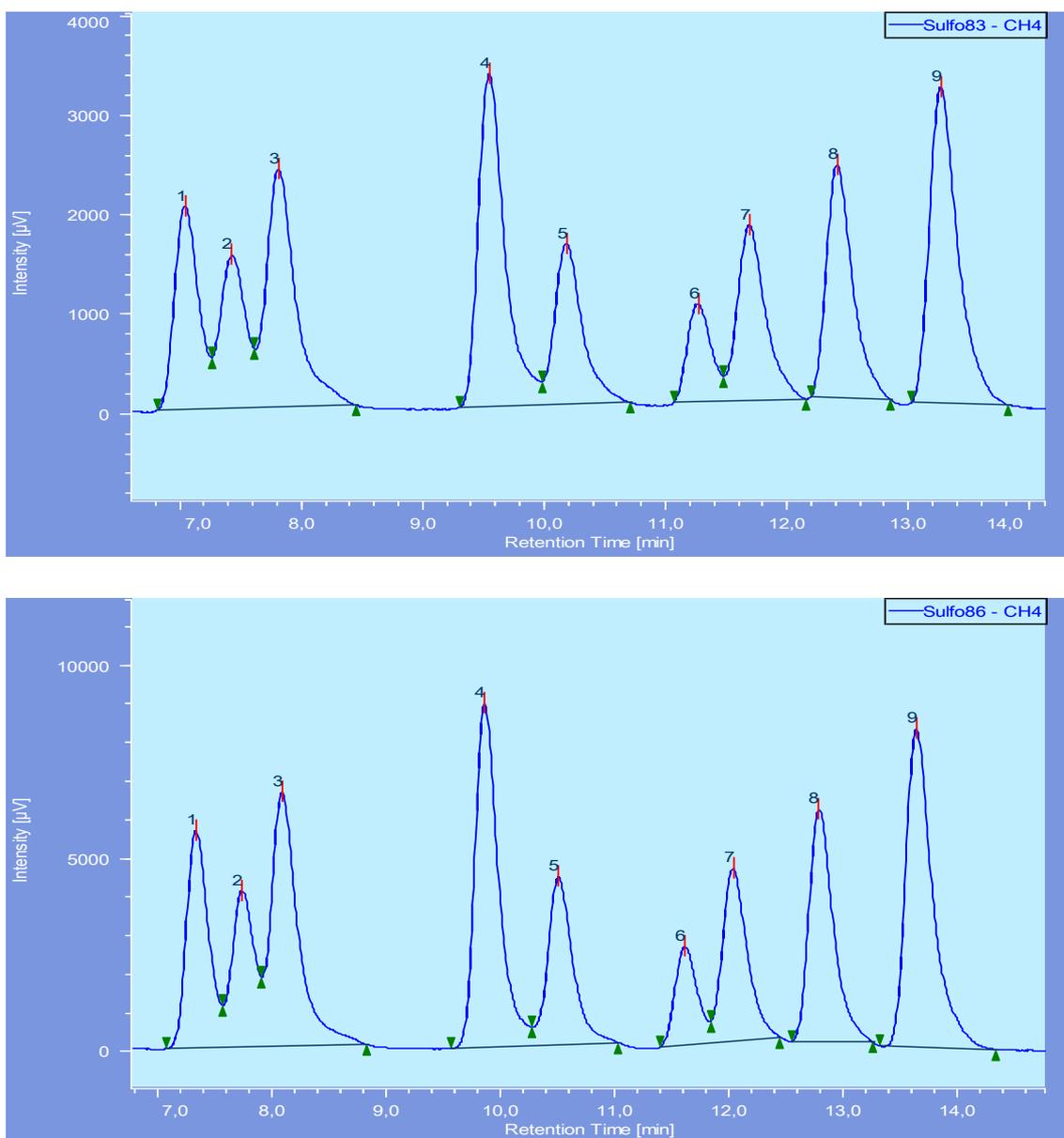


Figura 12: Comparativa de 2 volúmenes de inyección diferentes; 40 µL y 100 µL (Disolución de 9 sulfonamidas a 10 µg/L; 1. SPD, 2. SZD, 3. SMR, 4. SMZ, 5. SMI, 6. SMT, 7. SDX, 8. SMX, 9. SDM)

8.1.4. OPTIMIZACIÓN DE LA GANANCIA DEL DETECTOR

Otro de los parámetros que hemos optimizado ha sido la ganancia del detector a 10, 100 y 1000, obteniendo lo mejores resultados con ganancia 100, ya que a

valores superiores hemos observado que la componente ruido es muy elevada. En la Figura 13 podemos observar un gran aumento en la sensibilidad, sin embargo, la resolución de los picos es similar si aplicamos ganancia 10 ó 100.

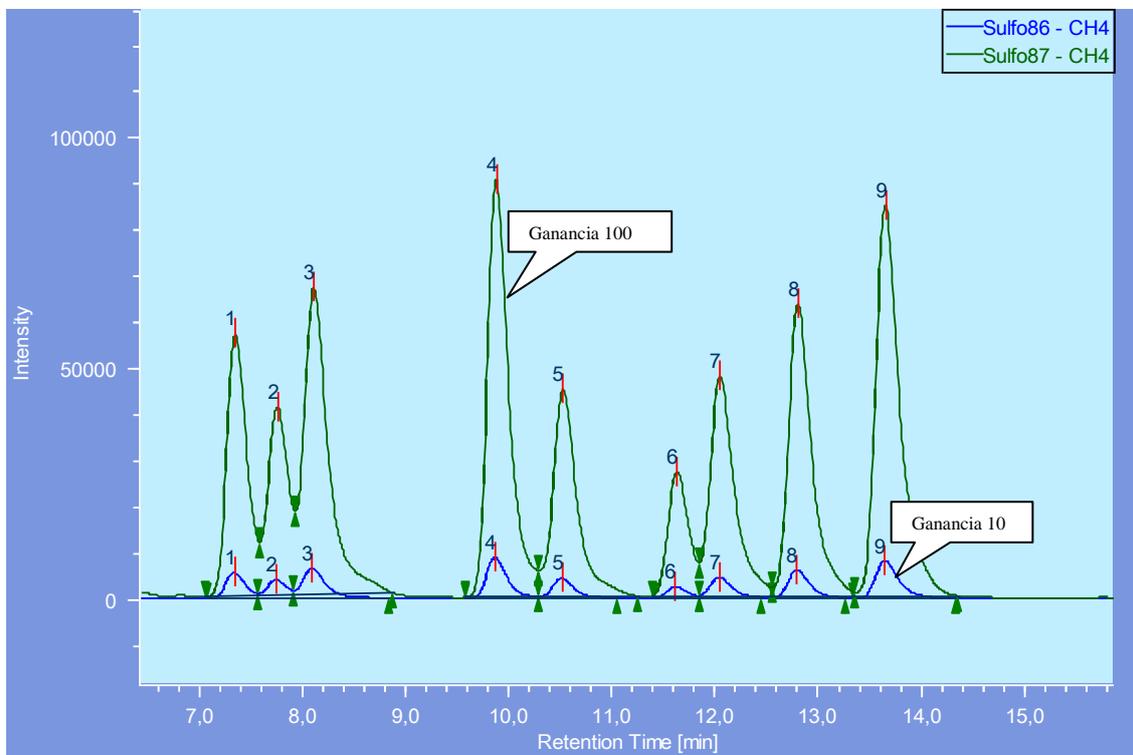


Figura 13: Cromatogramas obtenidos al aplicar ganancia 10 y ganancia 100 (Disolución de 9 sulfonamidas a 10 µg/L; 1. SPD, 2. SZD, 3. SMR, 4. SMZ, 5. SMI, 6. SMT, 7. SDX, 8. SMX, 9. SDM)

8.1.5. SELECCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Para estudiar esta variable hemos empleado dos columnas cromatográficas; Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 mm, 3µm) y Venusil XBP (2,1 x 50 mm, 3µm). Se han hecho pruebas con ambas, modificando tanto el gradiente de la fase móvil como el caudal. La columna seleccionada ha sido la Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 mm, 3µm) ya que nos proporciona una mejor resolución de los picos y unos tiempos de retención más bajos para las mismas condiciones de medida como podemos observar en la Figura 14.

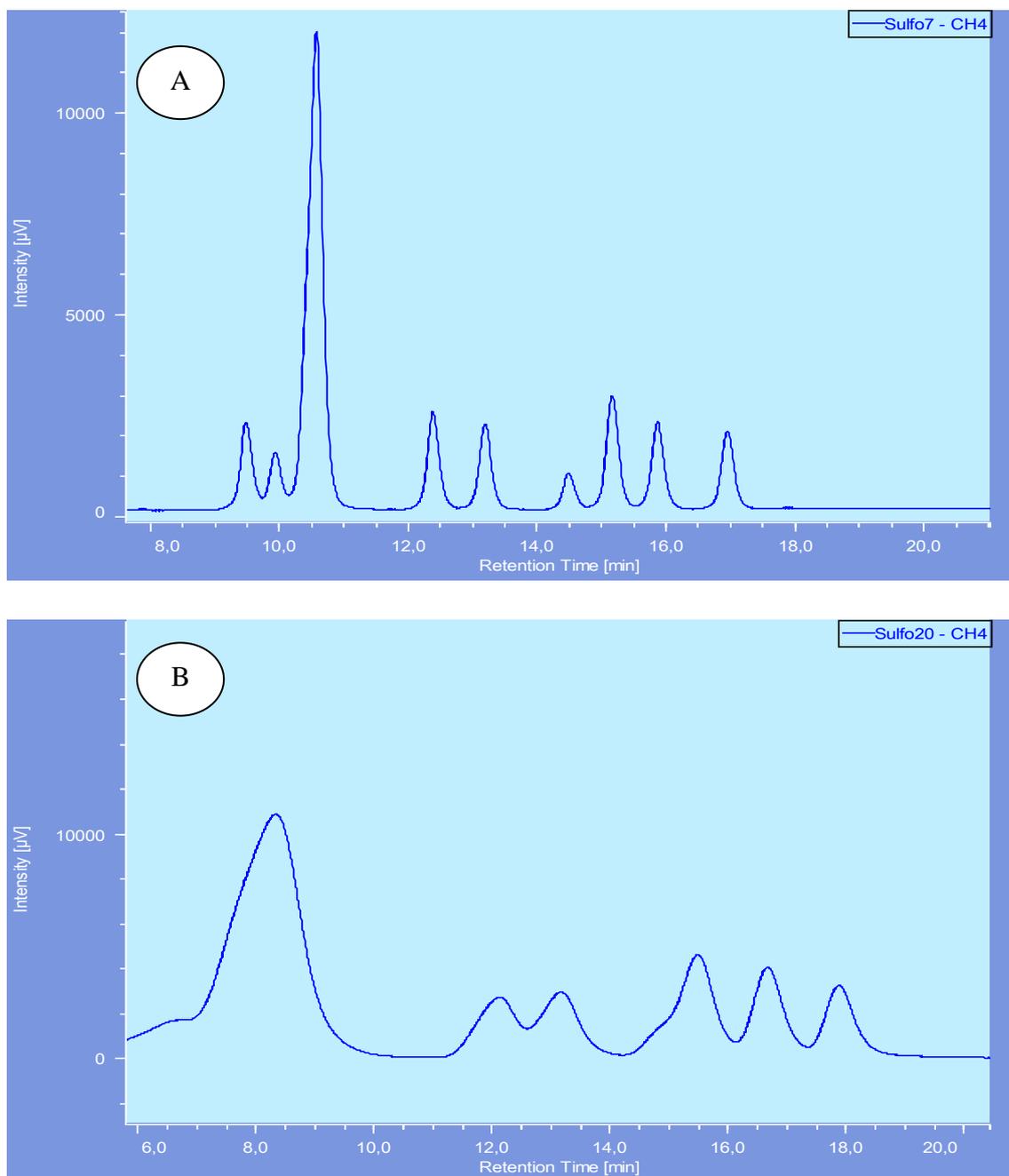


Figura 14: A. Cromatograma obtenido empleando la columna Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 mm, 3µm), B. Cromatograma obtenido empleando la columna Venusil XBP (2,1 x 50 mm, 3µm).

Una vez optimizados todos los parámetros que influyen en la separación cromatográfica, en la Tabla 5 se muestran los valores óptimos finales seleccionados para cada variable.

Columna	Ascentis™ C18 (10 cm x 4,6 mm, 3µm)
Volumen de inyección	100 µL
Composición de la fase móvil	A: agua con 2% de ácido acético a pH = 2,5 y B: AcN
Gradiente	65% A; 35% B (2 min) 50% A; 50% B (15 min) 50% A; 50% B (20 min) 65% A; 35% B (22 min) 65% A; 35% B (30 min)
Caudal fase móvil	1.1 µL/min
Longitud de onda excitación	405 nm
Longitud de onda de emisión	495 nm
Ganancia del detector	X 100

Tabla 5: Parámetros optimizados

8.1.6. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA

El tratamiento de muestra que hemos optimizado en el laboratorio está basado en el descrito por Agilent Technologies para la determinación de sulfonamidas en hígado bovino [82]. Hasta la fecha este procedimiento no se ha aplicado a la determinación de sulfonamidas en leche por ningún método de análisis.

Hemos llevado a cabo la optimización de dos etapas del procedimiento de tratamiento de muestra basado en metodología QuEChERS: por un lado la etapa de extracción y por otro la etapa de limpieza. Para llevar a cabo la primera de ellas hicimos tres pruebas; en una de ellas empleamos solamente AcN como agente extractante, y en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las otras AcN con distintas proporciones de ácido acético (99,0 % AcN : 1 % CH₃COOH y 95,0 % AcN : 5 % CH₃COOH).

Para llevar a cabo nuestro análisis empleamos un tubo falcón de 50 mL al que añadimos 2 mL de leche y lo fortificamos con 20 µL de una disolución que contiene las sulfonamidas que vamos a determinar a una concentración de 1 ppm. A continuación añadimos 8 mL de agua y 10 mL de AcN con 5% de ácido acético y agitamos en un vórtex durante 30 segundos. Para optimizar la etapa de extracción hicimos tres pruebas; en una de ellas empleamos solamente AcN como agente extractante, y en las otras AcN con distintas proporciones de ácido acético (99,0 % AcN : 1 % CH₃COOH y 95,0 % AcN : 5 % CH₃COOH).

En la Tabla 6 que mostramos a continuación aparecen los porcentajes de recuperación (calculados comparando la señal de la muestra considerada con la correspondiente a una muestra tratada y fortificada antes de la medida) que obtuvimos en cada caso, y se observa claramente que los mejores datos aparecen al emplear AcN con 5% de CH₃COOH.

RECUPERACIONES (%)			
SULFONAMIDAS	SIN CH ₃ COOH	1% CH ₃ COOH	5% CH ₃ COOH
SPD	72,53	66,68	94,2
SDZ	48,41	68,72	90,5
SMX	70,53	71,72	93,2
SMI	16,27	51,00	86,3
SMT	63,24	67,16	89,4
SCP	20,27	67,52	89,9
SMZ	57,84	76,04	90,7
SDX	40,78	72,70	89,5
SDM	44,56	69,05	83,9

Tabla 6: Estudio del extractante. Recuperaciones obtenidas al variar la proporción de CH₃COOH en AcN

El siguiente paso fue estudiar el volumen de agente extractante. Para ello se hizo el estudio empleando 5 mL o 10 mL de AcN con 5% de CH₃COOH. En este caso, como se muestra en la Tabla 7, obtuvimos mejores recuperaciones cuando empleábamos más cantidad de extractante.

RECUPERACIONES (%)		
SULFONAMIDAS	5 mL	10 mL
SPD	83,4	94,2
SDZ	87,7	90,5
SMX	88,4	93,2
SMI	86,5	86,3
SMT	84,1	89,4
SCP	86,2	89,9
SMZ	83,5	90,7
SDX	84,2	89,5
SDM	87,1	83,9

Tabla 7: Recuperaciones obtenidas al variar el volumen de agente extractante (AcN con 5% de CH₃COOH).

Para llevar a cabo la etapa de extracción añadimos un kit con sales y que permite tamponar que contiene: 4 g. MgSO₄, 1 g. NaCl, 1g. citrato sódico y 0,5 g. citrato disodio sesquihidrato. Agitamos vigorosamente durante 1 minuto y centrifugamos durante 5 minutos a 4000 r.p.m.

Por último, se estudió la etapa de limpieza. En dicha etapa tomamos una alícuota de la muestra (6 mL) y la añadimos a un tubo falcón de 15 mL que contiene una pequeña cantidad de adsorbente (150 mg PSA, 150 mg C₁₈ y 900 MgSO₄). Después lo agitamos en un vórtex durante 2 minutos y lo centrifugamos de nuevo a 4000 r.p.m. durante 5 minutos para distribuir uniformemente el material adsorbente y favorecer la etapa de limpieza. No obstante, también se realizaron pruebas eliminando esta etapa de limpieza y analizando directamente el extracto obtenido en la primera etapa y se comprobó que obteníamos las mismas recuperaciones, por lo que se determinó eliminar esta etapa de nuestro tratamiento de muestra.

A continuación, tomamos 1,5 mL del líquido sobrenadante del tubo falcón de 50 mL y le pasamos una corriente de N₂ hasta sequedad. Finalmente reconstituimos con 1,5 mL de tampón tris (hidroximetil)aminometano y agitamos durante 2 minutos en el vórtex. Por último, filtramos (con un filtro de 0,2 µm) y tomamos 1 mL al que añadimos 50 µL de fluorescamina para formar el derivado fluorescente. Después de someter la disolución a 15 minutos de sonicación se analiza mediante HPLC-FL

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otra parte, decidimos modificar la ganancia del detector, y trabajar a ganancia 1, ya que reducíamos considerablemente la componente del ruido aparecido al analizar muestras de leche.

El cromatograma de la Figura 15 fue obtenido después de optimizar todos los parámetros mencionados con anterioridad.

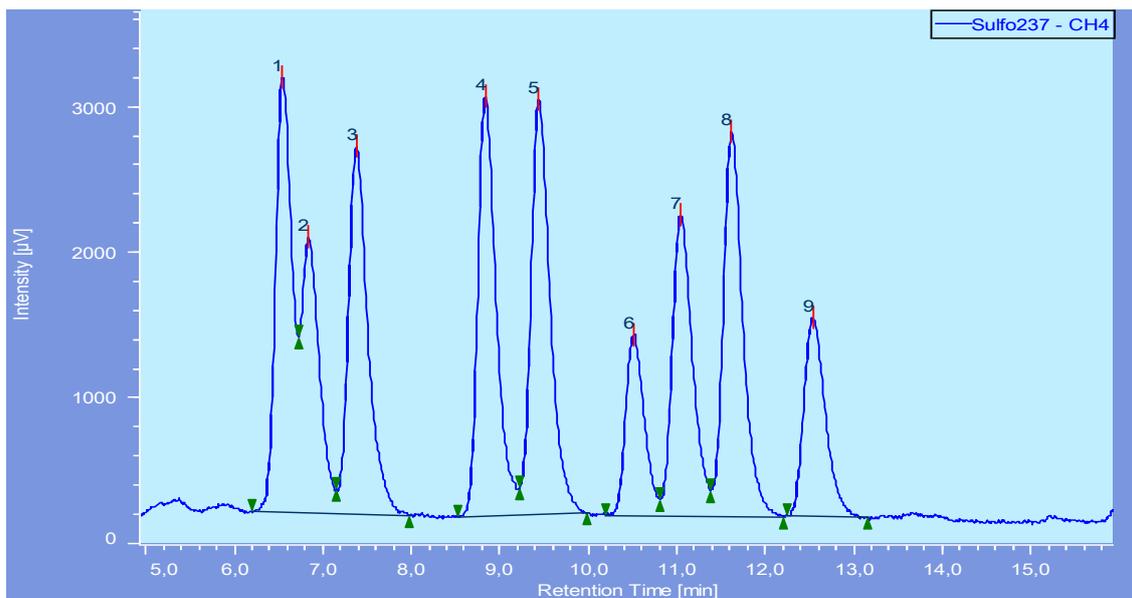


Figura 15: Cromatograma de una muestra de leche fortificada con 100 µg/L de cada sulfonamida y extraída con 10 mL de AcN con 5% de CH₃COOH, ganancia 1. (1. SPD, 2.SZD, 3.SMR, 4.SMZ, 5.SMI, 6.SMT, 7.SDX, 8.SMX, 9.SDM).

8.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

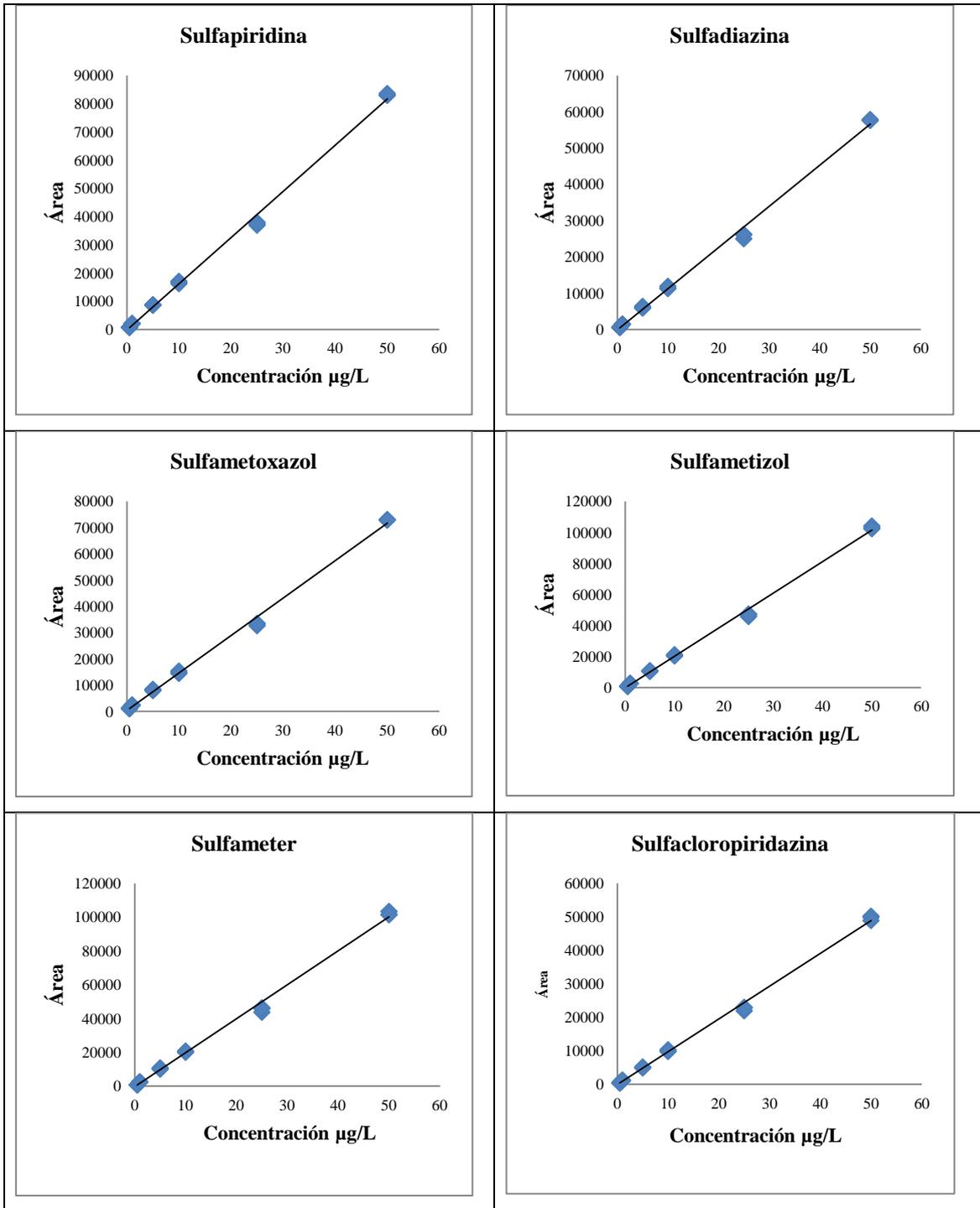
Para demostrar la validez del método propuesto y su aplicabilidad para el análisis de muestras de leche, se siguieron los siguientes pasos:

- Establecimiento de las rectas de calibrado (con patrones y en presencia de matriz, con muestras fortificadas de leche) y de los parámetros de calidad del método: rango lineal, límites de detección y cuantificación.
- Estudio de la precisión del método.
- Estudio de la veracidad del método mediante la realización de ensayos de recuperación sobre muestras dopadas

A continuación se comentan cada una de estas etapas.

8.4.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS RECTAS DE CALIBRADO Y DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD

En primer lugar se establecieron las funciones de calibrado con patrones de las 9 sulfonamidas a seis niveles de concentración: 0,5; 1; 5; 10; 25 y 50 $\mu\text{g/L}$. Se prepararon un patrón para cada nivel de concentración y cada uno fue inyectado por triplicado. La función de calibrado se estableció considerando las áreas de pico en función de la concentración de cada analito. Su representación gráfica se muestra en la Figura 16.



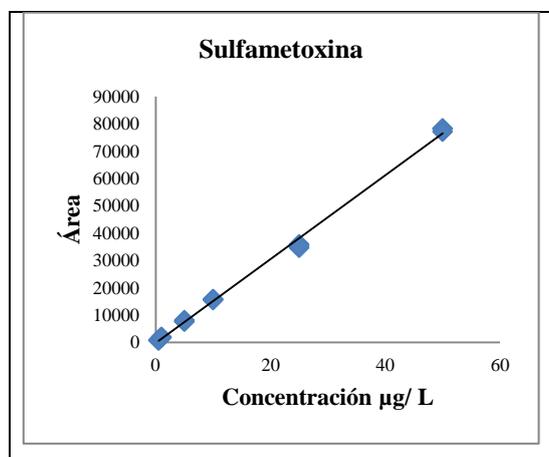
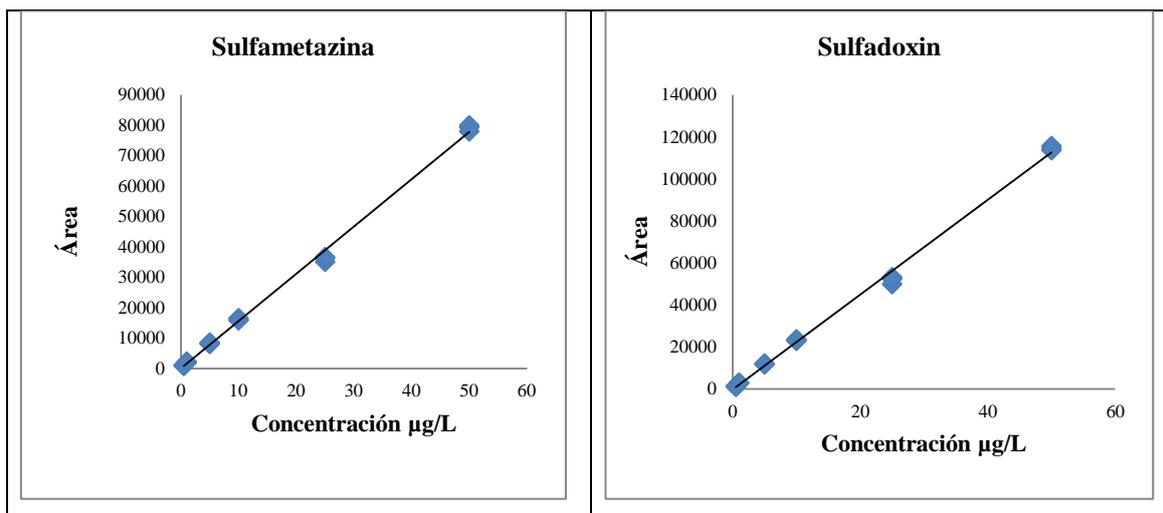


Figura 16: Rectas de calibrado con patrones

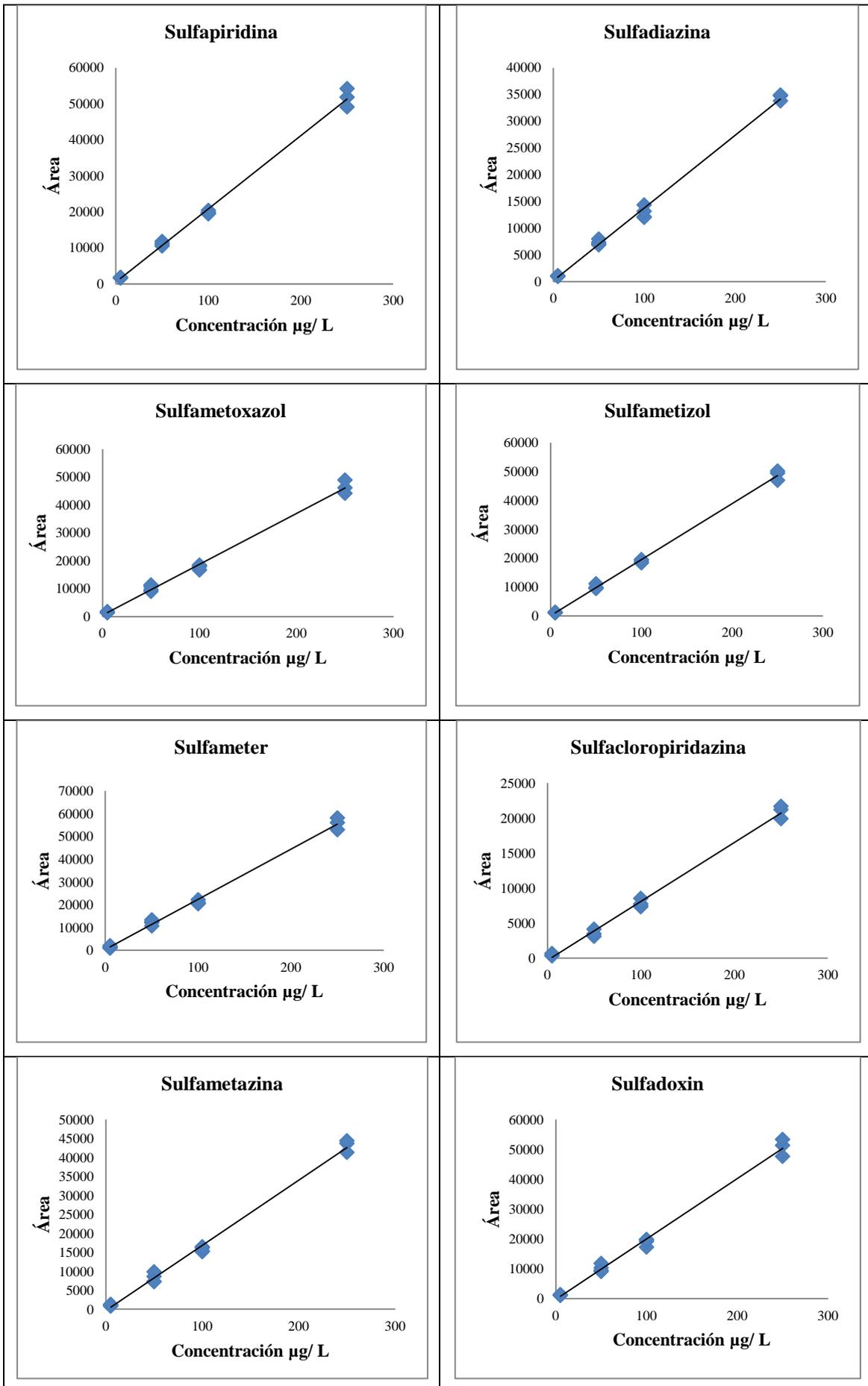
Los parámetros estadísticos, calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, y de calidad del método, se muestran en la Tabla 8. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para las 9 sulfonamidas se ajustan a un modelo lineal en el rango estudiado. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon a partir de $3 \times \text{señal/ruido}$ y $10 \times \text{señal/ruido}$, respectivamente y como se observa, son límites extremadamente bajos, lo que demuestra la sensibilidad alcanzada por el método propuesto.

Analito	Rango lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
SPD	0,28-50	114,5	1636,3	0,997	0,08	0,28
SDZ	0,41-50	62,7	1133,5	0,997	0,12	0,41
SMX	0,24-50	436,1	1424,6	0,997	0,07	0,24
SMI	0,30-50	126,9	2032,4	0,997	0,09	0,30
SMT	0,33-50	925,6	1802,6	0,996	0,10	0,33
SCP	0,48-50	137,7	979,7	0,997	0,14	0,48
SMZ	0,28-50	20,1	1554,0	0,997	0,08	0,28
SDX	0,27-50	239,2	2254,7	0,997	0,08	0,27
SDM	0,35-50	194,6	1534,0	0,997	0,10	0,35

Tabla 8: Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto.

También se estableció la correspondiente función de calibrado en presencia de matriz, usando para ello muestras de leche exenta de sulfonamidas. La función de calibrado para las sulfonamidas se obtuvo mediante fortificación de las muestras, antes del tratamiento, con concentraciones crecientes. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de cuatro niveles de concentración correspondientes a 5; 50; 100 y 250 µg/L de la mezcla de 9 sulfonamidas en la muestra. Teniendo en cuenta la dilución obtenida en el tratamiento de muestra, la concentración final en el vial a analizar fue de 1; 10; 20; 50 µg/L, respectivamente. Se prepararon tres muestras para cada nivel de concentración (réplicas experimentales), y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La función de calibrado se estableció considerando las áreas de pico en función de la concentración de cada analito. Su representación gráfica se muestra en la Figura 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



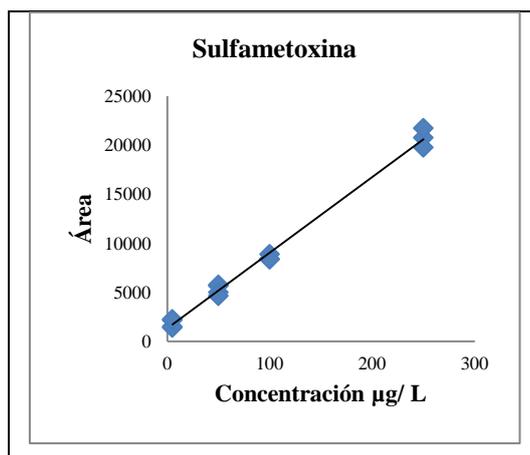


Figura 17: Rectas de calibrado de las sulfonamidas determinadas en presencia de matriz

Los parámetros estadísticos y de calidad calculados de forma similar a la calibración con patrones se muestran en la Tabla 9.

Analito	Rango lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ²	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
SPD	1.92-250	484,9	203,3	0,996	0,58	1,92
SDZ	2.60-250	121,4	136,0	0,996	0,78	2,60
SMX	2.04-250	277,2	187,5	0,992	0,61	2,04
SMI	2.38-250	49,6	194,4	0,998	0,71	2,38
SMT	2.41-250	280,6	220,2	0,995	0,72	2,41
SCP	4.55-250	321,1	84,1	0,994	1,36	4,55
SMZ	2.78-250	385,9	171,9	0,995	0,83	2,78
SDX	2.27-250	212,9	201,9	0,993	0,68	2,27
SDM	1.28-250	1328,8	77,1	0,994	0,38	1,28

Tabla 9: Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto.

Como puede observarse, los valores obtenidos para el límite de cuantificación están muy por debajo de los contenidos máximos permitidos por legislación (100 µg/Kg).

8.4.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

El estudio de la precisión del método propuesto se llevó a cabo tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia, de la siguiente forma:

- Repetibilidad (precisión intradía): se midieron cinco muestras de leche (réplicas experimentales), fortificadas a tres niveles de concentración (Nivel 1: 50 $\mu\text{g/L}$, Nivel 2: 100 $\mu\text{g/L}$ y Nivel 3: 150 $\mu\text{g/L}$), y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales) bajo las mismas condiciones y durante una misma sesión de trabajo.
- Precisión intermedia (interdía): se llevó a cabo de forma similar al estudio de repetibilidad, pero analizando una muestra de leche cada día, durante 5 días diferentes.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos, expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico.

Concentración	SPD	SDZ	SMX	SMI	SMT	SCP	SMZ	SDX	SDM
Repetibilidad DER (%) n*= 9									
50 ppb	4,4	3,1	4,5	5,9	3,8	5,2	3,2	3,9	6,4
100 ppb	2,6	3,9	3,0	2,8	2,4	4,4	3,1	3,3	3,4
150 ppb	3,8	5,7	3,0	4,1	5,6	6,1	3,9	4,9	7,2
Precisión intermedia DER (%) n*= 15									
50 ppb	5,6	4,5	8,7	4,9	3,1	5,5	3,0	4,4	6,5
100 ppb	3,4	4,8	3,7	4,7	3,0	4,1	3,6	4,6	4,1
150 ppb	5,2	9,2	7,1	8,2	7,9	6,7	8,2	9,1	7,8

(*n = n° de réplicas totales)

Tabla 10: Estudio de precisión para el método propuesto

8.4.3. ESTUDIO DE LA VERACIDAD DEL MÉTODO PROPUESTO

Para comprobar la veracidad del método propuesto para muestras de leche se llevaron a cabo ensayos de recuperación, añadiendo concentraciones crecientes de sulfonamidas a muestras de leche, exentas de la misma. Las muestras de leche se fortificaron con una mezcla de 9 sulfonamidas a diferentes niveles de concentración (Nivel 1: 50 µg/L, Nivel 2: 100 µg/L, Nivel 3: 150 µg/L). Cada nivel de concentración se preparó en cinco ocasiones y se inyectó tres veces. Los resultados obtenidos se

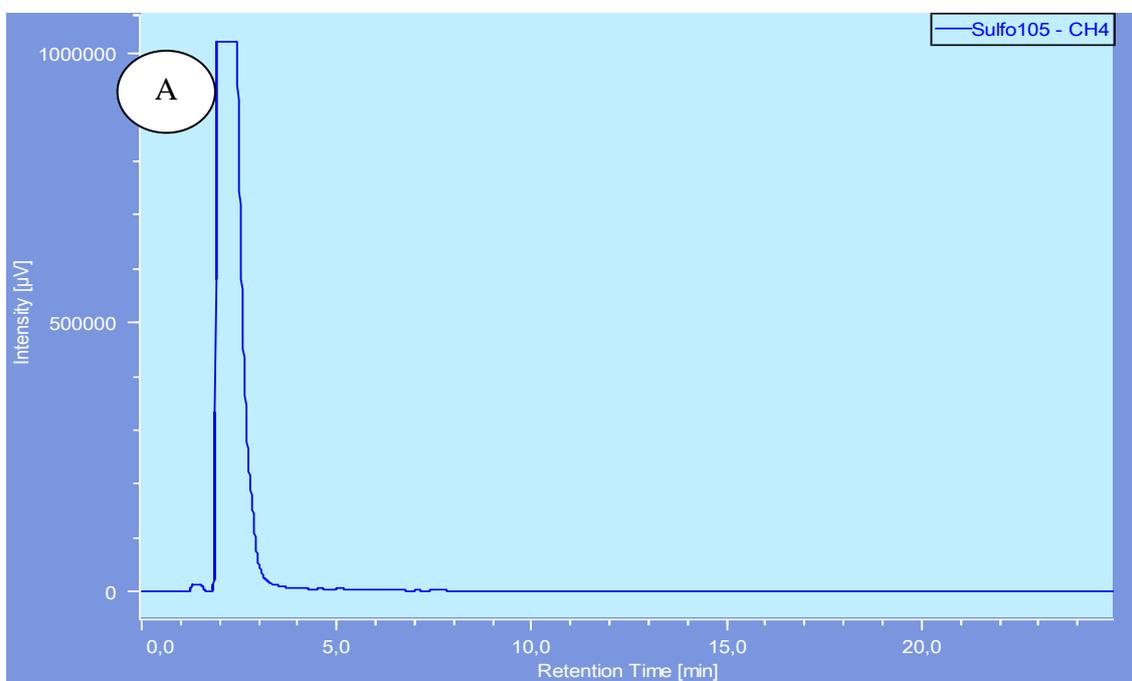
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

muestran en la Tabla 11, donde se puede observar que las recuperaciones fueron satisfactorias en todos los casos, no existiendo ningún interferente que impida la determinación de sulfonamidas en este tipo de muestra.

	50 µg/L		100 µg/L		150 µg/L	
	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)
SAS						
SPD	104,8	4,6	91,7	3,5	92,7	5,3
SDZ	98,6	3,1	99,3	4,8	97,1	9,2
SMX	95,3	4,6	91,7	3,8	93,0	7,2
SMI	97,6	6,0	89,1	4,7	90,6	8,2
SMT	97,1	3,9	92,6	3,1	93,2	7,9
SCP	89,2	4,9	86,9	4,0	88,3	6,5
SMZ	90,3	3,1	91,3	3,5	92,7	8,1
SDX	90,8	3,8	88,9	4,5	90,2	9,1
SDM	94,4	8,4	86,2	4,7	83,6	8,5

Tabla 11: Estudio de recuperación para el método propuesto (n=15)

En la Figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos para un blanco de muestra y para una muestra de leche fortificada, bajo las condiciones óptimas descritas anteriormente.



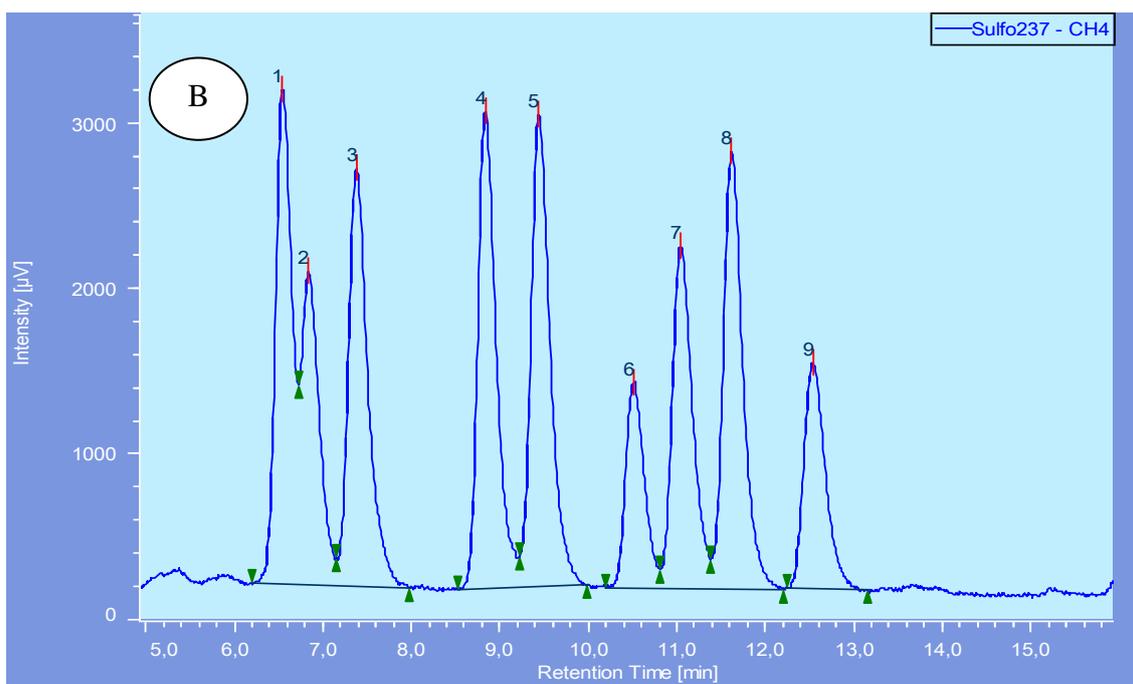


Figura 18: A. Cromatograma de un blanco de muestra, B. Cromatograma de una muestra de leche fortificada con 100 µg/L. (1. SPD, 2. SZD, 3. SMR, 4. SMZ, 5. SMI, 6. SMT, 7. SDX, 8. SMX, 9. SDM)

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

- En esta memoria se ha propuesto un método para la determinación simultánea de nueve sulfonamidas (SPD, SZD, SMR, SMZ, SMI, SMT, SDX, SMX, SDM)) en muestras de leche mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorescente empleando una metodología denominada QuEChERS (*Quick, Efficient, Cheap, Easy, Robust, Safe*) en el tratamiento de muestra para el análisis simultáneo de dichas sulfonamidas.
- La separación de las sulfonamidas se ha llevado a cabo en un tiempo inferior a los 15 minutos.
- Los compuestos de interés han sido modificados previamente a la etapa de detección mediante formación de un derivado fluorescente con fluorescamina, ya que las sulfonamidas no presentan fluorescencia nativa. Por esta motivo, se ha llevado a cabo la derivatización de las sulfonamidas en modo *off-line*, como un medio para la mejora de la sensibilidad y la selectividad del método.
- El método HPLC-FL ha sido caracterizado en cuanto a sus parámetros de calidad y validado para el análisis de muestras de leche, obteniéndose unos límites de detección y cuantificación muy por debajo de los valores establecidos por la legislación como límite máximo de residuos de sulfonamidas en alimentos.
- La precisión del método (tanto intradía como interdía), es aceptable en todos los casos de acuerdo con la legislación establecida.
- Los ensayos de recuperación realizados en muestra para evaluar el procedimiento analítico completo demuestran que el método ofrece porcentajes de recuperación satisfactorios así como DER aceptables, garantizándose la aplicabilidad del método a esta matriz.
- El método es rápido, simple y robusto al combinar las ventajas de la metodología QuEChERS (reducción del tiempo de tratamiento de muestra, disminución del volumen de disolventes empleados y eliminación de disolventes clorados) con las ventajas de la cromatografía líquida (HPLC) (gran sensibilidad, determinaciones cuantitativas exactas, etc.).

CONCLUSIONES

10. GLOSARIO

AcN – Acetonitrilo

AOAC - Asociación Oficial de Químicos Analíticos

CE - Electroforesis capilar

DAD – Batería de diodos

DER – Desviación estándar relativa

FR – Fluorescamina

HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución

LC – Cromatografía líquida

LLE – Extracción líquido-líquido

LMR – Límite Máximo de Residuo

LOD – Límite de detección

LOQ – Límite de cuantificación

MS – Espectrometría de masas

MSPDE – Extracción de la Matriz en Fase Sólida Dispersiva

PABA – Ácido *para*- aminobenzoico

PSA – Amina Primaria/ Secundaria

rpm – Revoluciones por Minuto

SAS - Sulfonamidas

SCP – Sulfacloropiridazina

SDM - Sulfadimetoxina

SDX – Sulfadoxin

SDZ – Sulfadiazina

SMI – Sulfametizol

SMT - Sulfameter

SMX - Sulfametoxazol

SMZ - Sulfametaina

SPD - Sulfapiridina

SPE – Extracción en fase sólida

TLC - Cromatografía en capa fina

TOF – Analizador de tiempo de vuelo

Tris - tris (hidroximetil)aminometano

UHPLC – Cromatografía líquida de ultra resolución

UV- Ultravioleta

VIS - Visible

