

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



USO DE TÉCNICAS SEPARATIVAS MINIATURIZADAS
COMO ALTERNATIVA A LA DETERMINACIÓN DE
ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS EN FÁRMACOS,
AGUAS Y ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

María Isabel Bailón Pérez

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Isabel Bailón Pérez
D.L.: GR. 2642-2009
ISBN: 978-84-692-4170-7

USO DE TÉCNICAS SEPARATIVAS MINIATURIZADAS COMO
ALTERNATIVA A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS
BETA-LACTÁMICOS EN FÁRMACOS, AGUAS Y ALIMENTOS

por

María Isabel Bailón Pérez

Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada

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

Fdo. **María Isabel Bailón Pérez**
Licenciada en Biología y
Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

VISADA en Granada, a 26 de Mayo de 2009

Directoras de la Memoria,

Fdo.- **Dra. Ana M^a García
Campaña**, Prof. Titular del Dpto.
de Química Analítica. Universidad
de Granada

Fdo.- **Dra. Monsalud del Olmo
Iruela**, Prof. Titular. Del Dpto. de
Química Analítica. Universidad de
Granada.

Fdo.- **Dra. Carmen Cruces Blanco**,
Prof. Titular, Departamento de
Química Analítica. Universidad de
Granada

Dña. Ana María García Campaña, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y responsable del grupo de investigación “Calidad en Química Analítica, Alimentaria, Ambiental y Clínica” (FQM-302)

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de **“USO DE TÉCNICAS SEPARATIVAS MINIATURIZADAS COMO ALTERNATIVA A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS EN FÁRMACOS, AGUAS Y ALIMENTOS”**, ha sido realizado bajo mi dirección y la de las Prof. D^a. Monsalud del Olmo Iruela y Prof. D^a Carmen Cruces Blanco, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de doctorado “Química”.

Granada, 26 de Mayo de 2009

Este trabajo se ha realizado gracias a diversos contratos con cargo al grupo de investigación FQM-302 y a la financiación obtenida en los siguientes proyectos de investigación, en los que se enmarcan los resultados obtenidos y presentados en la memoria:

- *“Implantación de nuevas estrategias analíticas, bajo criterios de calidad, para la determinación de residuos de fármacos y presencia de organismos genéticamente modificados (OGMs) en leche, derivados lácteos y otros alimentos”* (Ref.: CAL03-096-C2-2, Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA).
- *“Nuevas estrategias basadas en técnicas miniaturizadas acopladas con detección por fluorescencia y espectrometría de masas para el control de pesticidas y fármacos en muestras ambientales y biológicas”* (Ref.: CTM2006-06363, Ministerio de Educación y Ciencia).
- *“Desarrollo de metodologías analíticas miniaturizadas con diversos sistemas de detección para el control de antibióticos de uso veterinario legislados por la UE en alimentos de origen animal”* (Ref.: AGL2007-64313/ALI, Ministerio de Ciencia e Innovación).

INDICE

OBJETO DE LA MEMORIA	29
INTRODUCCIÓN	33
1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	36
1.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA “TINCIÓN DE GRAM” DE LAS BACTERIAS	37
1.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL EFECTO DE SU ACCIÓN	37
1.3. SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN	39
1.4. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA	40
a) ANTIBIOTICOS β-LACTÁMICOS.....	41
a.1. Penicilinas	41
a.1.1. Naturales	
a.1.1.1. Bencilpenicilinas.	
a.1.1.1.1. Penicilina G cristalina acuosa o benzilpenicilina	
a.1.1.1.2. Penicilina G procaína	
a.1.1.1.3. Penicilina G benzatínica	
a.1.1.2. Fenoxipenicilinas.	
a.1.2. Sintéticas	
a.1.2.1. Amidinopenicilinas.	
a.1.2.2. Aminopenicilinas.	
a.1.2.3. Carboxipenicilinas.	
a.1.2.4. Isoxazolilpenicilinas.	
a.1.2.5. Ureidopenicilinas.	
a.1.2.6. Otras penicilinas semisintéticas.	
a.2. Clavamas	47
a.3. Cefalosporinas y otros antibióticos relacionados	48
a.3.1. Cefalosporinas	
a.4. Monobactamas	50
a.5. Carbapenemas	51
b) AMINOGLUCÓSIDOS	51
c) TETRACICLINAS	52
d) SULFAMIDAS	52
e) FENICOLES	53
f) MACRÓLIDOS	53
g) RIFAMICINAS.....	54

h) POLIMIXINAS Y OTROS	54
2. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA	55
2.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA	55
2.2. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CON FINES PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS	59
2.3. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL: PROBLEMÁTICA Y LEGISLACIÓN	60
a) PROBLEMAS SANITARIOS	60
b) PROBLEMAS TECNOLÓGICOS	61
c) PROBLEMAS ANALÍTICOS	62
2.4. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES	66
3. TÉCNICAS MINIATURIZADAS: ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR	72
3.1. ELECTROFORESIS CAPILAR	72
3.1.1. GENERALIDADES	72
3.1.2. MODALIDADES DE ELECTROFORESIS CAPILAR	81
3.1.3. TÉCNICAS DE PRECONCENTRACIÓN ON-LINE DE LA MUESTRA	83
3.2. DETECCIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	90
3.2.1. MÉTODOS DE IONIZACIÓN	92
A) Ionización por electrospray (ESI)	
3.2.2. ANALIZADORES DE MASAS.....	101
3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR	102
3.3.1. COLUMNAS	106
3.3.2. ENSANCHAMIENTO DE BANDA EXTRACOLUMNA	108
4. ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	109
4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS	111
4.2. DESARROLLO Y ESTRUCTURA GENERAL DE LAS PENICILINAS ..	116
4.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS ESTUDIADOS	119
4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS	130

4.4.1. METODOS CROMATOGRÁFICOS.....	130
4.4.1.1. Cromatografía de Gase(GC).....	130
4.4.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	131
4.4.1.3. Cromatografía en Capa Fina.....	148
4.4.2. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS	148
4.4.3. MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS	169
4.4.3.1. Métodos basados en Ensayos de Barrido (Test de Screening).....	169
4.4.1.3.2. Características de los Ensayos de Barrido	171
4.4.1.3.3. Clasificación de los Ensayos de Barrido	172
4.4.1.3.4. Ensayos de Barrido para Antibióticos β -Lactámicos	174
4.4.1.3.4.1 Métodos Microbiológicos	174
4.4.1.3.4.1.a. Ensayos de inhibición microbiana	174
4.4.1.3.5. Ensayos de receptores	176
4.4.1.3.6. Ensayos enzimáticos	178
4.4.1.4. Métodos Inmunoquímicos	180

CAPÍTULO I: DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS..... 183

1. INTRODUCCIÓN	185
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL y MUESTRAS ...	186
3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	187
4. PROCEDIMIENTO ELECTROFORÉTICO PROPUESTO	187
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	188
5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	188
5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES	188
5.1.1.1. Inyección de la muestra	189
5.1.1.2. Selección del voltaje	189
5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES	191
5.1.2.1. Optimización del pH de separación	191
5.1.2.2. Optimización de la naturaleza y concentración de la disolución tampón.....	193
5.1.2.3. Empleo de medios organizados	196
5.1.3 SELECCIÓN DEL PATRÓN INTERNO	198
5.1.4 OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EN MODO MEKC	200

5.2. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO	207
5.2.1. RECTAS DE CALIBRADO	207
5.2.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN	209
5.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO AL CONTROL DE CALIDAD DE PREPARADOS FARMACÉUTICOS	211
CAPÍTULO II: DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β- LACTÁMICOS EN DISTINTOS TIPOS DE LECHE Y AGUA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE	215
1. INTRODUCCIÓN	217
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL Y MUESTRAS.	218
3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	219
4. PROCEDIMIENTO ELECTROFORÉTICO PROPUESTO	220
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	221
5.1. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES	221
5.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL pH	221
5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN	223
5.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN	224
5.1.4. EMPLEO DE MODIFICADOR ORGÁNICO	226
5.2. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES	227
5.2.1. SELECCIÓN DEL CAPILAR	227
5.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL VOLTAJE Y TEMPERATURA DEL CAPILAR	227
5.3. DESARROLLO DEL MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN ON-LINE	229
5.3.1. SELECCIÓN DEL DISOLVENTE	230
5.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA INYECTADA	231
5.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CORRIENTE DE INVERSIÓN.....	231
5.4. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD	233
5.4.1. RECTAS DE CALIBRADO	233
5.4.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN	236

5.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA, CABRA Y AGUA ...	238
5.5.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA Y CABRA	238
5.5.1.1. Tratamiento de las muestras	239
5.5.1.2. Validación del método para el análisis de muestras de leche	243
5.5.1.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	243
5.5.1.2.2. Estudio de la precisión	246
5.5.1.2.3. Estudio de la veracidad	248
5.5.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS PROCEDENTES DE ESTACIÓN DEPURADORA, POZO Y RÍO ...	250
5.5.2.1. Tratamiento de las muestras	250
5.5.2.2. Validación del método para el análisis de muestras de agua	255
5.5.2.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	255
5.5.2.2.2. Estudio de la precisión	257
5.5.2.2.3. Estudio de la veracidad	258

CAPÍTULO III: DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO Y AGUAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁMDEM

1. INTRODUCCIÓN	263
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL Y MUESTRAS	
3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	264
4. PROCEDIMIENTO CE-MS PROPUESTO	265
4.1. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	266
4.2. INTERFASE ESI	267
4.3. CONDICIONES MS y MS/MS	268

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	269
5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	269
5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA Y pH DEL TAMPÓN DE SEPARACIÓN	269
5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN DE SEPARACIÓN	273
5.1.3. OPTIMIZACIÓN DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN Y TEMPERATURA DEL CAPILAR	274
5.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE CE-MS y CE-MS/MS	276
5.2.1. ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN AL ELECTROSPRAY.	276
5.2.1.1. Elección del modo de ionización por electrospray (ESI+, ESI-)	276
5.2.1.2. Composición del líquido adicional	278
5.2.1.2.1. Selección de los constituyentes del líquido adicional	278
5.2.1.2.2. Optimización del porcentaje de ácido fórmico	280
5.2.1.2.3. Optimización del porcentaje de isopropanol	283
5.2.1.3. Optimización del caudal del líquido adicional	286
5.2.1.4. Optimización de la presión del nebulizador	288
5.2.1.5. Optimización del caudal del gas de secado	290
5.2.1.6. Optimización de la temperatura del gas de secado	293
5.2.2. VOLTAJE DEL CAPILAR DE ENTRADA	297
5.2.3. AMPLITUD DE LA FRAGMENTACIÓN.....	299
5.2.4. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INYECCIÓN	305
5.3. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD	306
5.3.1. RECTAS DE CALIBRADO	306
5.3.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN	311
5.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO Y AGUAS	314
5.4.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO	314
5.4.1.1. Tratamiento de las muestras	314
5.4.1.1.1. Extracción con disolventes presurizados	314
5.4.1.1.2. Extracción por agitación	316
5.4.1.2. Validación de los métodos para el análisis de muestras de carne	319
5.4.1.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	319

5.4.1.2.2. Estudio de la precisión	323
5.4.1.2.3. Estudio de la veracidad	326
5.4.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS DE POZO Y RÍO	330
5.4.2.1. Tratamiento de las muestras de agua	330
5.4.2.2. Validación de los métodos para el análisis de muestras de agua	331
5.4.2.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	331
5.4.2.2.2. Estudio de la precisión	335
5.4.2.2.3. Estudio de la veracidad	338

CAPÍTULO VI: DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y DE ALIMENTOS, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN 343

1. INTRODUCCIÓN	345
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL Y MUESTRAS ..	347
3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	348
4. PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO PROPUESTO	349
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	349
5.1. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS	349
5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA Y EL GRADIENTE DE LA FASE MÓVIL	350
5.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL CAUDAL DE LA FASE MÓVIL	353
5.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA	354
5.1.4. EMPLEO DE LA COLUMNA LUNA C ₁₈	355
5.1.5. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN	358
5.2. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD	360
5.2.1. RECTAS DE CALIBRADO	360
5.2.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN	363

5.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA, CARNE DE POLLO Y AGUAS	365
5.3.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA	365
5.3.1.1. Tratamiento de las muestras	365
5.3.1.2. Validación del método para el análisis de muestras de leche	368
5.3.1.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	368
5.3.1.2.2. Estudio de la precisión	371
5.3.1.2.3. Estudio de la veracidad	373
5.3.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO.....	375
5.3.2.1. Tratamiento de las muestras	375
5.3.2.2. Validación del método	378
5.3.2.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	378
5.3.2.2.2. Estudio de la precisión	380
5.3.2.2.3. Estudio de la veracidad	383
5.3.3. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS NATURALES.....	384
5.3.3.1. Tratamiento de las muestras	385
5.3.3.2. Validación del método	386
5.3.3.2.1. Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación	387
5.3.3.2.2. Estudio de la precisión	389
5.3.3.2.3. Estudio de la veracidad	391
CONCLUSIONES	395
ABREVIATURAS	405
ANEXO PUBLICACIONES	413

OBJETO DE LA MEMORIA

En las últimas décadas las técnicas separativas miniaturizadas han cobrado un gran interés ya que ofrecen numerosas ventajas sobre las técnicas clásicas, tales como la disminución en el consumo de reactivos químicos y en la generación de residuos, la mejora en resolución y en muchos casos, el aumento de sensibilidad. Es de destacar igualmente la reducción en la cantidad de muestra requerida, lo cual resulta fundamental en ámbitos del análisis medioambiental, biomédico o alimentario. En la actualidad existen dos tendencias fundamentales en la miniaturización de los sistemas de separación: el diseño y fabricación de sistemas de análisis total en microchips y el desarrollo de técnicas de cromatografía líquida o de electromigración en las que la separación se realiza en columnas capilares o capilares de sílice fundida.

En este sentido, la presente Memoria tiene como objetivo principal demostrar la potencialidad de las técnicas miniaturizadas de Electroforesis Capilar y Cromatografía Líquida Capilar en la determinación de una importante familia de compuestos: los antibióticos β -lactámicos. Estos compuestos constituyen uno de los grupos más usados para la profilaxis y el tratamiento de infecciones, tanto en medicina humana como en veterinaria.

En esta Tesis Doctoral se aborda la puesta a punto de nuevos métodos de análisis sensibles y selectivos usando las técnicas anteriormente mencionadas para la determinación simultánea de tales antibióticos en muestras de fármacos, alimentos de origen animal y aguas. En el caso del análisis de fármacos el objetivo fundamental consiste en demostrar las ventajas de la Electroforesis Capilar como técnica rutinaria para el control de calidad de los principios activos. En el caso del análisis de alimentos de origen animal, la legislación vigente establece unos Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los antibióticos β -lactámicos que no deben ser superados con objeto de garantizar la calidad del producto y permitir su distribución y consumo. Por ello se plantea la Cromatografía Líquida Capilar y la Electroforesis Capilar con

diversos sistemas de detección y estrategias para incrementar la sensibilidad, como importantes alternativas a las técnicas cromatográficas clásicas en la determinación de estos compuestos en matrices complejas, como la carne o la leche. Igualmente se hace necesario establecer métodos eficaces de extracción, preconcentración y limpieza de las muestras.

En el caso de las aguas es relativamente reciente la preocupación por detectar residuos de fármacos, y en concreto de antibióticos en aguas naturales o residuales, cuya presencia puede generar cierta resistencia bacteriana o reacciones alérgicas en la población. Considerando los bajos niveles de residuos que pueden ser encontrados en este tipo de muestras se pretende demostrar la capacidad de estas técnicas miniaturizadas, combinadas con procesos de preconcentración adecuados, para la detección y cuantificación de los antibióticos β -lactámicos.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Desde el principio de la existencia del ser humano, su lucha por la supervivencia se estableció con otros seres vivos de muy diversos tamaños. Algunos tan pequeños que no se veían ni se tocaban, sin embargo estos microorganismos, en la batalla por su propia supervivencia infligieron a la especie humana grandes pérdidas. Se las llamaron plagas (como las de Egipto), o pestes (como la Peste bubónica) o, más modernamente epidemias como la gripe, el cólera, etc.

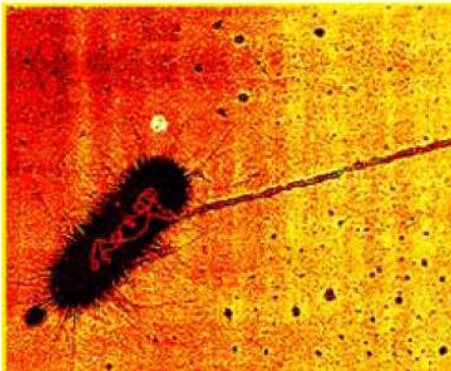


Figura 1. *Microscopía electrónica de una bacteria.*

Fueron necesarios muchos años hasta que empezaron a identificarse, gracias al microscopio, bacterias, riketsias y virus (microorganismos)

En **1897**, el médico francés **E. Dúchense** demostró que ciertos mohos podían detener la proliferación de cepas microbianas.

En **1929**, **A. Fleming** evidenció la acción lítica sobre el estafilococo dorado, de una cepa de *Penicillium notatum*. Gracias a él, se produjo el descubrimiento del primer antibiótico, la **penicilina**, adentrándonos pues en la **era antibiótica**.

En **1941**, **E. B. Chain** aisló la sal sódica, amorfa e impura de la penicilina aplicando diversas técnicas de extracción y purificación. Años después, **H. W. Florey** la sintetizó a escala industrial.



Cuando Sir Alexander Fleming (1881-1955) descubrió los efectos de la penicilina, introdujo la era antibiótica y ganó el premio Nobel en 1945.

Desde entonces, se han preparado numerosas moléculas en búsqueda del **antibiótico ideal**, caracterizado por: ser efectivo para todas las infecciones, generar sólo el efecto buscado, no generar resistencias, actuar en cualquier parte del organismo, ser útil por vía oral, ser económicamente accesible.

Los antibióticos, del griego *αντι* *anti* (=contra) y *βίος* *bios* (=vida), son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos (acción bacteriostática), u originan su destrucción (acción bactericida). En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos, como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antibacteriana [1]. La acción antibacteriana de los antibióticos ocasiona un cambio en la capacidad de reproducirse y/o alimentarse, de las células microbianas.

El gran éxito terapéutico en la lucha contra enfermedades de origen bacteriano trajo como consecuencia natural, su empleo continuo, utilizándose, en forma progresiva, a partir de 1945. Los antibióticos se encuentran incluidos entre los aditivos alimentarios, en la categoría de *conservadores*.

1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. Las múltiples clasificaciones existentes presentan diferentes características y han sido realizadas basándose en múltiples criterios, por tal motivo es difícil determinar cuál es la ideal. De ellas las más utilizadas son las que se mencionan a continuación.

[1] M.A. Sande, J.E. Kapusnik-Uner, G.L. Mandell, *Agentes antimicrobianos*. 1993.

1.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA “TINCIÓN DE GRAM” DE LAS BACTERIAS

Según la actividad que tienen los antibióticos frente a las bacterias gram positivas y gram negativas, éstos pueden clasificarse según indica la Tabla 1 [2].

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según la tinción de gram de las bacterias.

Antibióticos contra Gram +:	penicilinas, glicopéptidos, lincosamida, rifampicinas
Antibióticos contra Gram -:	aminoglucósidos, monobactámicos, aminociclitolos, polipéptidos
Antibióticos de amplio espectro:	Cefalosporinas, carbapenémicos, amfenicoles, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas.

1.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL EFECTO DE SU ACCIÓN

Según el efecto de su acción sobre las bacterias (Tabla 2), los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, respectivamente. Esta clasificación es bastante inexacta, pues estos términos varían dependiendo del tipo de germen y de la concentración del antibiótico, como es por ejemplo, el caso del cloramfenicol que se comporta como bacteriostático frente a la *E. coli* y otros

[2] S.B. Calderwood, R.C.Jr. Moellering, *Principles of anti-infective therapy*. En: J.H. Stein, Internal Medicine. 3th ed. Boston: Little Brown and Co (1990) 1202.

microorganismos y como bactericida frente a algunas cepas de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*. Similar es el caso de la penicilina, la cual es bactericida frente a los cocos Gram positivos, con excepción de los enterococos frente a los cuales se comporta como bacteriostático debido a que, a pesar de inhibir la formación de la pared bacteriana (Figura 2), no activa las enzimas autolíticas intrabacterianas [3].

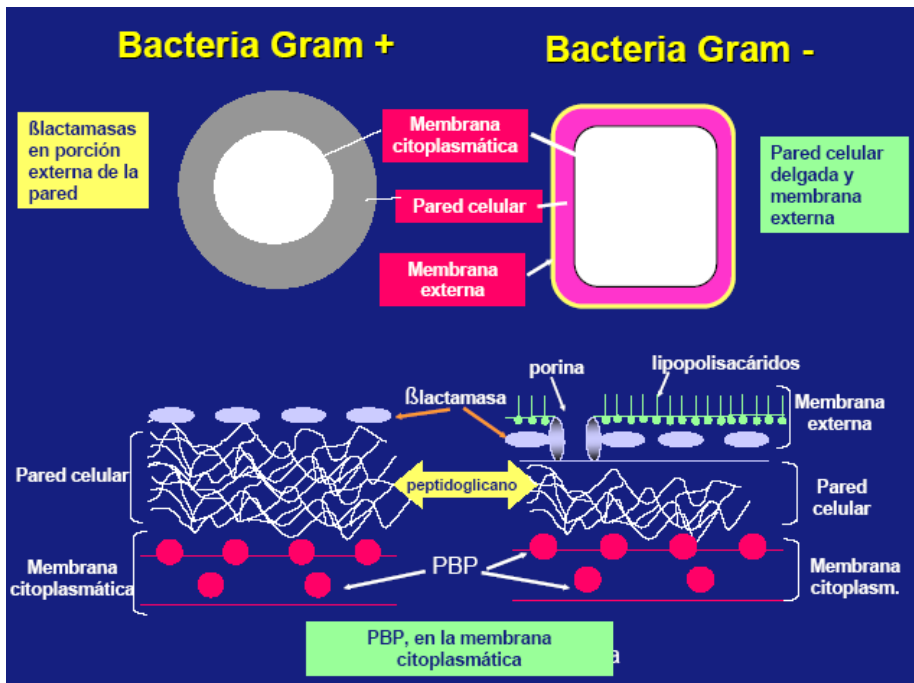


Figura 2. Detalle de la estructura de la pared celular de bacterias gram positivas y gram negativas.

[3] A.J. Frisby, Introduction on the use of the antibiotics. Guideline. Thomas Jefferson University, 1995.

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su acción sobre las bacterias.

Bactericidas	Bacteriostáticos
Betalactámicos	Amfenicoles
Aminoglucósidos	Lincosamidas
Glicopéptidos	Macrólidos
Quinolonas	Sulfamidas
Rifampicinas	Tetraciclinas

1.3. SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN

Dependiendo de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos (Figura 3), los antibióticos se clasifican en:

- a) Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, y afectan la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana (penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos, y agentes varios, como vancomicina, bacitracina, cicloserina, inhibidores de betalactamasa y los antimicóticos imidazólicos, miconazol, ketoconazol y clotrimazol).
- b) Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la subunidad 30s (aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas) y los que actúan sobre la subunidad 50s (macrólidos, lincosamidas y amfenicoles). Los antibióticos que actúan en el mismo nivel no deben asociarse, pues compiten por el sitio de unión y se antagonizan.
- c) Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos (quinolonas, rifamicinas y antivirales).

INTRODUCCIÓN

- d) Agentes antimetabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico (sulfonamidas y trimetoprima).
- e) Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo (polimixina B, colistina, colistimetato, detergentes y antimicóticos poliénicos, como nistatina y anfotericina B, que se unen a los esterol de la pared celular).

Es probable que surjan categorías adicionales a medida que se diluciden mecanismos más complejos, pues en la actualidad se desconoce el mecanismo de acción preciso de algunos antimicrobianos.

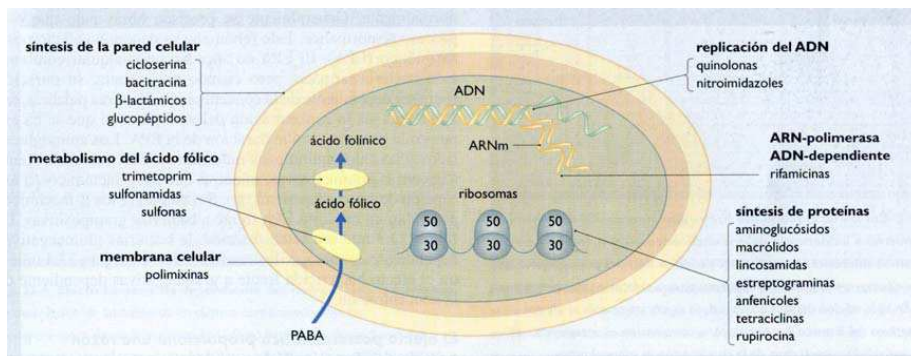


Figura 3. Acción de los distintos antibióticos

1.4. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA

Esta clasificación es la más utilizada en la literatura científica. Se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas. Dentro de esta clasificación, se pueden dividir en:

a) ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

a.1. Penicilinas

a.1.1. *Naturales*

a.1.1.1. *Bencilpenicilinas.*

La bencilpenicilina o penicilina G, se puede considerar la representativa de la mayoría del resto de las penicilinas, tiene un grupo fenilacetamido enlazado al 6-APA. Es activa contra bacterias Gram positivas y *Neisseria spp.* Es muy eficaz en infecciones por *Streptococcus A, B, C, viridans*, neumococos y enterococos, *Pasteurella multocida*, actinomicosis, sífilis, gonorrea causada por gonococos susceptibles, en infecciones por meningococos, neumococos y anaerobios, así como en la mayoría de los casos de endocarditis bacteriana subaguda (EBS), en las infecciones fuso Spiroquetales, el carbunco, la estreptobacilosis y en la enfermedad de Lyme. La mayoría de las infecciones causadas por estafilococos, sean estas adquiridas en la comunidad o nosocomiales, son resistentes a ella. Además, se inactiva por las enzimas penicilinasas que producen algunas bacterias.

En función de sus usos clínicos, la penicilina G se puede clasificar en:

a.1.1.1.1. Penicilina G cristalina acuosa o benzilpenicilina

Es un excelente antibiótico bactericida, poco tóxico, de bajo costo, pero con algunas desventajas: degradación por el ácido gástrico, destrucción por las betalactamasas y ocasionales reacciones de hipersensibilidad.

La penicilina G cristalina acuosa se usa cuando se quieren obtener efectos rápidos o una alta concentración sérica del antibiótico. En infecciones graves como endocarditis infecciosa (EI) o meningitis la vía de administración es la intravenosa. Cuando se da por vía intramuscular, la concentración plasmática

máxima se alcanza en 30 a 60 minutos. Aproximadamente el 50% de la penicilina G se une a las proteínas plasmáticas. El antibiótico se hace indetectable en el plasma entre las 3 y 6 horas, lo que se relaciona con el tamaño de la dosis. Aunque esencialmente excretada por el riñón, la penicilina G es también eliminada por el hígado.

La penicilina G es adecuada cuando los gérmenes responsables son: *Streptococcus pyogenes* (beta-hemolítico) del grupo A, grupo B (*S. agalactiae*), grupo D (*S. bovis*), *Streptococcus* alfa-hemolítico grupo *viridans*, *Streptococcus pneumoniae* sensible de cualquier localización (pero no para infecciones del SNC (sistema nervioso central) si *S. pneumoniae* es de sensibilidad intermedia), *Neisseria meningitidis*, *Treponema pallidum*. Asociada a aminoglucósicos es de primera línea para tratar infecciones por *Enterococcus faecalis* sensible. También está indicada para tratar otras afecciones producidas por gérmenes habitualmente sensibles como leptospirosis, infecciones clostridiales, actinomicosis, carbunco, difteria, o infecciones mixtas con participación de anaerobios supradiafragmáticos.

a.1.1.1.2. Penicilina G procaína

Se usa cuando se necesita que los niveles séricos de penicilina persistan por horas y la vía intravenosa no está indicada. Cuando la administración es por vía intramuscular, la absorción es lenta. Alcanza la concentración plasmática máxima en 2 a 4 horas, detectándose niveles aun a las 24 horas.

Tiene más riesgos de complicaciones alérgicas que la penicilina G cristalina acuosa.

Es útil en el tratamiento de la sífilis y para la profilaxis de infecciones por *Streptococcus* beta hemolítico.

a.1.1.1.3. **Penicilina G benzatínica**

Se usa cuando son suficientes bajos niveles plasmáticos de penicilina, pero es necesario que éstos se mantengan por períodos prolongados. Cuando se administra penicilina G benzatínica se detectan niveles séricos durante 15 a 30 días.

Es adecuada para el tratamiento de la sífilis precoz, latente o tardía no neurológica. Para la neurosífilis la elección es la penicilina G cristalina acuosa, porque ni la penicilina G benzatínica ni la penicilina procaina alcanzan concentraciones suficientes en el LCR (líquido cefalorraquídeo). También está indicada en la profilaxis de infecciones por *Streptococcus* beta-hemolítico del grupo A cuando el paciente tiene antecedentes de fiebre reumática, glomerulonefritis difusa o erisipela recurrente. En infecciones estreptocócicas activas sólo se admite su uso para tratar las faringitis. Se administra exclusivamente por vía intramuscular.

a.1.1.2. **Fenoxipenicilinas.**

La fenoximetilpenicilina o penicilina V, se introdujo en 1954, y es una penicilina semisintética, aunque se considera natural. Tiene un grupo fenoxiacetamido unido al 6-APA y es estable en medio ácido, por lo que se administra por vía oral. Se absorbe en la porción alta del intestino delgado y produce un nivel pico en el suero a los 60 minutos. Los niveles se mantienen por aproximadamente 4 horas y la frecuencia de administración es cada 6 a 8 horas. Se usa en infecciones moderadas por bacterias Gram positivas sensibles, pero no debe utilizarse para tratar infecciones por *Neisseria* o *Haemophilus* por su baja actividad frente a estos microorganismos y, al igual que la bencilpenicilina, se inactiva también por las penicilinasas.

a.1.2. *Sintéticas*

a.1.2.1. *Amidinopenicilinas.*

El mecilinam, que tiene un grupo amidino en la posición 6, es activo contra muchas bacterias gramnegativas, aunque *P. aeruginosa* y *Bacteroides spp.* son resistentes. Es sensible a las penicilinasas y es sinérgico con otros antibióticos betalactámicos.

a.1.2.2. *Aminopenicilinas.*

La ampicilina, la cual tiene un grupo D(-)- α -aminofenilacetamido fue descubierta en 1961 y fue la primera aminopenicilina. Su espectro de acción es mayor que el de la bencilpenicilina, aunque también es sensible a las penicilinasas. Es menos activa contra bacterias Gram positivas, pero es activa contra algunas Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella spp.*, aunque se han reportado incrementos en su resistencia. La ampicilina está indicada, fundamentalmente, en infecciones por algunas bacterias Gram negativas y enterococos, pero es ineficaz frente a *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas spp.* Es eficaz en las infecciones debidas a estreptococos y estafilococos sensibles, así como en las infecciones urinarias (IU) causadas por *E. coli*, *P. mirabilis* y *Enterococcus*, en las meningitis por *H. influenzae*, neumococos y meningococos sensibles y en las infecciones por *Listeria*, incluyendo meningitis. La ampicilina es mejor que las tetraciclinas para el tratamiento de las exacerbaciones de la bronquitis causada por *H. influenzae* y pueden obtenerse buenos resultados en el tratamiento de la colangitis y colescistitis provocadas por microorganismos sensibles, dado que los niveles del fármaco en la bilis son altos. Es eficaz en la fiebre tifoidea, combinada con probenecid, y en algunos portadores crónicos de *Salmonella typhi*. Es estable a

los ácidos, por lo que puede administrarse por vía oral, pero es inactivada por la penicilinasa [4].

La amoxicilina se obtuvo en 1970 y solamente difiere de la ampicilina por la adición de un grupo hidroxilo. Se absorbe mejor en el tracto gastrointestinal, pero es menos activa frente a la *Shigella*. Se utiliza en el tratamiento de la otitis media (es el antibiótico de elección en niños), sinusitis, bronquitis aguda, IU por *E. coli*, *Proteus* y enterococos susceptibles y en la profilaxis de la endocarditis bacteriana en procesos respiratorios, orales y dentales. Otras aminopenicilinas son: bacampicilina, ciclacilina, epicilina, hetacilina, metampicilina, pivampicilina y talampicilina, las cuales se absorben mejor y se hidrolizan a ampicilina in vivo.

La amoxicilina con ácido clavulánico y la ampicilina con sulbactam son equivalentes en cuanto a actividad a la amoxicilina y la ampicilina solas, pero son, además, activas frente a cepas de estafilococos, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, *Bacteroides* y *Klebsiella spp.* productoras de betalactamasas. La amoxicilina con ácido clavulánico se utiliza en infecciones respiratorias por microorganismos productores de betalactamasas o por anaerobios, recomendándose en estados agudos de bronquitis, sinusitis u otitis media. La ampicilina con sulbactam se recomienda en infecciones combinadas de microorganismos Gram positivos y anaerobios, como pueden ser neumonía, así como también en el tratamiento empírico de mordeduras de animales. A pesar de la gran actividad de los preparados de aminopenicilinas con inhibidores de betalactamasa, estos encarecen bastante los tratamientos, lo cual es un aspecto a tener en cuenta para que su uso no sea indiscriminado.

[4] B. Barnes, N. Nimphius, *Antibiotic Guide. Wisconsin Medical College, 1996.*

a.1.2.3. Carboxipenicilinas.

La carbenicilina, la cual tiene un grupo carboxifenilacetamido, se introdujo en el mercado en 1969 y fue la primera penicilina antiestafilocócica. Posee una actividad similar a la de la ampicilina (la mayoría de los cocos Gram positivos, excepto los estafilococos resistentes a la bencilpenicilina, *E. coli* y *P. mirabilis*) y es también sensible a las penicilinasas. Además, es activa frente a la mayoría de las cepas de *Bacteroides fragilis* y *P. aeruginosa* (se utiliza en combinación con un aminoglucósido), *Enterobacter sp.* y *Proteus* indol-positivos.

a.1.2.4. Isoxazolilpenicilinas.

Las isoxazolilpenicilinas, entre las que se hallan la cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina y oxacilina son resistentes a las penicilinasas y a los ácidos gástricos. Sus estructuras son similares y difieren, fundamentalmente, en su absorción. La nafcilina es también resistente a las penicilinasas, pero se absorbe irregularmente en el tracto gastrointestinal. Las isoxazolilpenicilinas constituyen un tratamiento adecuado en las infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo A y *Staphylococcus epidermidis* sensibles; sin embargo, son ineficaces frente a enterococos, gonococos y bacilos Gram negativos. La nafcilina es el antibiótico de elección en las infecciones por *Staphylococcus aureus* penicilino-resistente, pero sensibles a la meticilina y es también activa contra neumococos y *Streptococcus pyogenes*.

a.1.2.5. Ureidopenicilinas.

La azlocilina y la mezlocilina y las muy semejantes piperacilina y apalcilina, son más activas que la carbenicilina contra *P. aeruginosa* y tienen un espectro de acción más amplio contra las bacterias Gram negativas, aunque son también sensibles a las penicilinasas. La mezlocilina tiene un espectro similar al de la ticarcilina, pero también es activa frente a muchas cepas de *Klebsiella* y

Serratia. La azlocilina y la piperacilina tienen espectros similares al de la mezlocilina, pero su actividad frente a *Pseudomonas* es de 4 a 8 veces mayor. Las ureidopenicilinas, en general, son más activas frente a los enterococos que las carboxipenicilinas y, al igual que éstas, se deben reservar para las infecciones graves. La piperacilina es el antibiótico de elección en infecciones por *P. aeruginosa* en combinación con un aminoglicósido, por lo que se recomienda en el tratamiento de neumonías graves. También se usa en infecciones por estreptococos y enterococos, y tiene actividad variable frente a *E. coli* y *Klebsiella*. La asociación de piperacilina con tazobactam no ha demostrado ser más eficaz que la piperacilina sola, pero sí permite reducir las dosis a utilizar de antibiótico.

a.1.2.6. Otras penicilinas semisintéticas.

La más importante es la meticilina, que tiene un grupo 2,6-dimetoxibenzamido, y se introdujo en el mercado en 1959. Fue la primera penicilina resistente a la destrucción por la penicilinasa estafilocócica, pero no es estable en medio ácido y se debe administrar en forma inyectable. Se indica, fundamentalmente, en las infecciones por estafilococos coagulasa-positivos productores de penicilinasa. Existen también azidocilina, benetamina y penicilina clemizol, la primera, de administración oral y las otras, parenterales de acción prolongada [5].

a.2. Clavamas

El anillo clavamo se caracteriza porque el azufre del anillo penamo está sustituido por un átomo de oxígeno. Es el resultado de la fusión de un anillo β -lactámico en uno heterocíclico de oxazolidina.

[5] P.F. Mateos, *Agentes antimicrobianos y microorganismos*. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca, 2000.

El ácido clavulánico es el único antimicrobiano comercializado de este grupo. Es de origen natural, habiéndose obtenido de *Streptomyces clavuligerus*. Es un inhibidor enzimático de las β -lactamasas (enzimas generadas por las bacterias que interactúan con antibiótico para degradarlos) en bacterias resistentes a antibióticos como penicilinas y cefalosporinas. Comúnmente se encuentra combinado junto con amoxicilina o ticarcilina. Su nombre deriva del microorganismo *Streptomyces clavuligerus* y se sintetiza a partir del aminoácido arginina y del monosacárido gliceraldehído 3-fosfato. Tiene una baja actividad bactericida intrínseca, pero su principal función es la de inhibidor de amplio espectro de β -lactamasa de bacterias Gram positivas y Gram negativas, haciendo que la acción del antibiótico sea sumamente efectiva. Su administración es variable ya que es fácilmente absorbible tanto vía oral como parenteral. Su forma activa es como clavulanato de potasio.

a.3. Cefalosporinas y otros antibióticos relacionados

a.3.1. *Cefalosporinas*

Las cefalosporinas o cefems son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, un antibiótico natural producido del hongo *Cephalosporium acremonium* [6,7]. El núcleo activo, ácido 7-aminocefalosporánico, está muy estrechamente relacionado con el ácido 6-amino-pencilánico, por poseer ambos un anillo betalactámico. Son bactericidas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana al igual que las penicilinas y se clasifican por generaciones, en base a la similitud de sus actividades antibacterianas y de cuando fueron introducidas en el mercado. Las más modernas han ido incrementando su actividad contra las bacterias Gram negativas. Se distribuyen ampliamente en la mayoría de los

[6] L.R. Wisemen, P. Benfield, Cefprozili. *A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. Drugs* 45 (1993) 295.

[7] A. Adu, C.L. Armour. *Drug utilization review of the third generation cephalosporins. Forms on ceftriaxone, ceftazidime and cefotaxime. Drugs* 50 (1995) 423.

líquidos y los tejidos corporales y las concentraciones que se alcanzan son suficientes para el tratamiento de la infección, especialmente si hay inflamación, la cual facilita su difusión. Sin embargo, la penetración en el humor vítreo del ojo y LCR es relativamente baja, aunque las de tercera generación pueden alcanzar niveles bastante altos en el LCR para el tratamiento de la meningitis.

Las cefalosporinas se clasifican clásicamente en "generaciones", en base al espectro de actividad para gérmenes Gram positivos y Gram negativos. En términos generales, a medida que evolucionan en generaciones ganan actividad frente a microorganismos Gram negativos, reduciéndola frente a Gram positivos y también mejoran su comportamiento en relación al principal factor de resistencia (las betalactamasas), siendo las cefalosporinas de tercera y cuarta generación más estables que las de primera y segunda, frente a estas enzimas.

Las cefalosporinas de **1ª generación** fueron aprobadas para su uso clínico desde 1973-75. Son las más activas frente a la mayoría de los cocos Gram positivos aerobios, incluyendo *S. aureus* meticilinosensible. En este grupo se incluyen: cefazolina, cefalotina, cefaloridina, cefapirina, cefadroxil, cefalexina, cefadrina, cefatrizina.

Las cefalosporinas de **2ª generación** son utilizadas desde 1979. Tienen menor actividad frente a *Staphylococcus* spp. meticilinosensible, pero son más activas frente a algunos gramnegativos. Su actividad frente a la mayoría de anaerobios es escasa. En este grupo se incluye: cefuroxima, cefamandol, cefonicid, ceforamida, moxalactan, cefaclor, cefprozil, cefotiam, cefamicinas, cefoxitina, cefmetazol, cefminox, cefotetan, cefbuperazona.

Las cefalosporinas de **3ª generación** se utilizan en la práctica médica desde 1980, siendo altamente activas contra gérmenes Gram negativos. Se dividen en: ceftazidime, ceftizoxime, cefotaxima y cefoperazona, son las de mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae* de sensibilidad alta o intermedia son sensibles a los agentes de esta generación, ceftriaxone, cefpirome, cefodizima, cefmenoxima, cefsulodina. Las cefalosporinas de esta generación tienen una actividad variable frente a anaerobios, siendo cefotaxima y ceftizoxima los más activos frente a *Bacteroides fragilis*.

Las cefalosporinas de **4ª generación** son las de más reciente aparición (1992). Tienen un espectro extendido frente a Gram negativos, Gram positivos, siendo su actividad baja frente a anaerobios. Tienen una actividad mayor que las de 3ª generación frente a gérmenes grampositivos. Su actividad es similar a las cefalosporinas de 3ª generación frente a Gram negativos productores de betalactamasas plasmídicas clásicas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp.), pero es superior frente a especies productoras de cefalosporinasas cromosómicas inducibles o desreprimidas (*E. cloacae*, *S. marcescens*, *C. freundii*) y frente a *P. aeruginosa*. También son activas frente a cepas productoras de algunas betalactamasas de espectro ampliado, pero son hidrolizados por otras. Su actividad frente a anaerobios es limitada. Dentro de este grupo se incluyen: Cefepime, cefaclidina, cefoselis, cefelidina, entre otras

a.4. Monobactamas

Los monobactamas son antibióticos β -lactámicos monocíclicos que interactúan con las PBP induciendo la formación de largas estructuras bacterianas filamentosas. Presentan un alto grado de resistencia a las β -lactamasas y son muy efectivos contra bacilos Gram negativos, pero no contra Gram positivos y anaerobios.

El primer antimicrobiano sintetizado de este grupo fue el Aztreonam. Se administra por vía intramuscular o endovenosa y alcanza concentraciones plasmáticas de 50 µg/ml (dosis intramuscular 1 g). Se utiliza en personas alérgicas a las penicilinas y para tratar infecciones producidas por bacilos Gram negativos multirresistentes.

a.5. Carbapenemas

Tienen un amplio espectro de acción. Son activos contra numerosos bacilos Gram negativos, anaerobios y microorganismos Gram positivos.

El Imipenem fue el primer compuesto de este grupo en sintetizarse (semi-sintético). Es inactivado en los túbulos renales por peptidasas, por lo que se administra junto a Cilastatín, que es un inhibidor de peptidasas, cuando se requiere una alta concentración en orina. El Imipenem se administra por vía endovenosa debido a que no se absorbe en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones plasmáticas máximas que se alcanzan con este antimicrobiano son 30-33 µg/ml (dosis intravenosa 500 mg). Es resistente a la acción de β-lactamasas y atraviesa la barrera hemato-encefálica.

Se utiliza ampliamente en muchos tipos de infecciones como las urinarias, respiratorias bajas, cutáneas, ginecológicas, intrabdominales, óseas y articulares. Este tipo de antimicrobianos puede ocasionar diarrea y alergia, y los paciente alérgicos a las penicilinas también pueden presentar alergia al imipenem.

b) AMINOGLUCÓSIDOS

Los aminoglucósidos (AG), conocidos hace más de medio siglo, continúan siendo drogas de elección en infecciones de bacilos aerobios gramnegativos y endocarditis bacteriana. Fueron dados a conocer en clínica desde 1944, con la introducción del uso de la estreptomina. En la actualidad, el desarrollo farmacológico ha ampliado notablemente la variada disponibilidad

de esta familia de antimicrobianos y ofrece alternativas importantes de su uso. A pesar de sus indeseables efectos tóxicos sobre oído y riñón, su exitoso y continuo uso se atribuye a factores tales como: rápido efecto bactericida dosis-dependiente, sinergismo con los betalactámicos, baja resistencia y bajo costo. Según la forma de obtención, los aminoglucósidos se clasifican en:

- Obtenidos por fermentación: estreptomina, kanamicina, neomicina, gentamicina y tobramicina.
- Semisintéticos: amikacina, dibekacina, netilmicina, sisomicina e isepam.

c) TETRACICLINAS

Constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas. Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos, por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en seres humanos, en animales y en algunas áreas de la agricultura. Actualmente el uso en humanos es cada vez menor, aunque siguen siendo muy habituales en veterinaria.

d) SULFAMIDAS

Las sulfamidas fueron los primeros agentes antibacterianos eficaces empleados en el tratamiento de las infecciones en el hombre. Su descubrimiento durante la década de 1930-1940 es el punto de partida de la terapia antiinfecciosa. Son antibióticos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro, inicialmente con actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, pero con posterior

desarrollo de amplia resistencia. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos bacterianos. Dentro de las sulfamidas existen numerosos compuestos con diferentes propiedades farmacocinéticas y efectos secundarios. Sin embargo todos comparten el mismo modo de acción y es frecuente la resistencia cruzada entre ellos. Dentro de este grupo podemos encontrar: sulfametizol, sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfacetamida, sulfatiazol, sulfaguanidina, sulfanilamida, etc...

e) FENICOLES

Los fenicoles son antibióticos bacteriostáticos, de amplio espectro y tienen acción bactericida para *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Deben considerarse como fármacos de reserva, dada su potencial toxicidad sobre la médula ósea.

Son principalmente sintetizados el cloranfenicol y el tianfenicol (recientemente). El cloranfenicol se obtuvo un poco antes que las tetraciclinas. Su eficacia se observó en una plaga de tífus. Es uno de los antibióticos más eficaz frente a los *Rickettsia*. Tiene amplio espectro, abarcando Gram positivas y Gram negativas, sobre todo microorganismos aeróbicos. Es muy eficaz frente a determinadas cepas de *Salmonella* y no es eficaz contra los microorganismos anaeróbicos. El cloranfenicol debe usarse de modo restringido y en determinadas especies está completamente prohibido, como es el caso de especies destinadas al consumo humano. Sólo se usa en pequeños animales, aunque frecuentemente tenga efectos indeseables, porque es muy eficaz y de muy bajo coste.

f) MACRÓLIDOS

Son bacteriostáticos igual que las tetraciclinas. Pueden ser bactericidas en determinadas situaciones. Pueden acceder directamente al interior de la célula y

actúan a nivel de la fracción ribosomal 50s, impidiendo que el tRNA pueda ir a su sitio para traducir el mRNA. En este grupo se encuentran: eritromicina, claritromicina, azitromicina, miocamicina, roxitromicina, espiramicina, rokitamicina, oleandomicina, midecamicina, josamicina. Comparten la misma actividad antimicrobiana. Son antibióticos seguros, dentro de los cuales las moléculas nuevas presentan menos problemas de intolerancia gástrica y mejor farmacocinética.

g) RIFAMICINAS

Las rifamicinas constituyen un grupo de antibióticos estructuralmente relacionados que se obtienen por fermentación de cultivos del microorganismo *Streptomyces Mediterranei*. Debido a que su forma natural posee escasa actividad antibacteriana, su uso terapéutico como antimicrobiano comienza en los años 60, a partir del desarrollo de un derivado semisintético: la rifamicina SV. Desde entonces, se han creado numerosas variantes de rifamicinas que han probado ser muy potentes para tratar infecciones ocasionadas por un amplio espectro de microorganismos.

h) POLIMIXINAS Y OTROS

Son una familia de péptidos poco difusibles y con efectos tóxicos cuando se suministran por vía sistémica. Se designan con letras A, B, C, D y E, pero sólo la polimixina B y la polimixina E (o colistina) están disponibles para uso clínico. Son drogas bactericidas que actúan a nivel de las membranas celulares causando su disrupción por un efecto surfactante. Al igual que la bacitracina (antibiótico obtenido a partir del *Bacillus licheniformis* o *subtilis*, con actividad frente a bacterias grampositivas), se obtiene de *Bacillus* spp., por lo que puede existir sensibilización cruzada a estas drogas.

2. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA.

Los antibióticos se empezaron a utilizar en medicina veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana. 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, contribuyendo así a mantener la salud de la población. El empleo de antibióticos en animales de compañía tiene fines fundamentalmente terapéuticos y a veces profilácticos, mientras que en los animales productores de alimentos también se pueden utilizar como promotores del crecimiento añadiéndolos al pienso en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo relativamente prolongados.

2.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA

Los antibióticos se utilizan ampliamente como aditivos en el pienso y el agua de bebida de animales destinados a la producción de alimentos. La práctica de incluir antibióticos en la alimentación de los animales está muy extendida desde que en 1950 Stokstad y Jukes [8,9] observaron que tras la administración de pequeñas dosis de clortetraciclina aumentaba su ritmo de crecimiento. Los mecanismos mediante los cuales los antibióticos aceleran el crecimiento y favorecen un mayor aumento de peso en los animales que los consumen no se conocen bien. Se cree que la forma en que promueven el crecimiento se debe a la eliminación de organismos causantes de infecciones subclínicas, a la reducción de sustancias tóxicas, como el amoníaco, que retardan el crecimiento, y a la menor destrucción y competencia por nutrientes en el tracto gastrointestinal por parte de los microorganismos. Como

[8] P. Díez, V. Calderón, Centro Nacional de Alimentación, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2001.

[9] E.L.R. Stokstad, T.H. Jukes, *Further observations on the animal protein factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73 (1950) 523.

consecuencia existe una mayor capacidad de adaptación de los animales a los cambios de alimentación y manejo, y una disminución de enfermedades causadas por el transporte y los cambios de ambiente, con lo cual se logran mayores ganancias de peso, con menor cantidad de alimento consumido, en periodos menores de tiempo [10].



Figura 4. *Los antibióticos se utilizan como sustancias auxiliares fundamentales en el mantenimiento de la salud de los animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano.*

Se puede decir que la causa final del aumento del crecimiento es una compleja interacción de factores nutritivos, fisiológicos, microbianos y patológicos. Esta respuesta es distinta para cada especie animal y, dentro de una misma especie, es distinta según la raza, la edad de los animales, las condiciones ambientales o el tipo de alimentación. El índice de conversión del pienso y el índice de crecimiento suelen aumentar conforme aumenta la dosis del antibiótico hasta un cierto límite. El efecto de los antibióticos es más marcado en casos de poca higiene, ya que actúan frente a los agentes infecciosos. No obstante, parece posible diferenciar el efecto estimulante del crecimiento

[10] E. Ortega, G. Arellano, M. Morales, *Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la salud pública. Revista investigación clínica* 40 (1988) 423.

ejercido por los antibióticos del efecto que tienen como preventivos de enfermedades, sobre todo cuando se trata de antibióticos que no se absorben en el intestino [11].

También se obtienen ventajas medioambientales, ya que una mayor productividad permite una reducción significativa del número de animales necesarios para alimentar a una determinada población. Menor número de animales implica una menor carga para el medio ambiente como resultado de volúmenes menores de metano y de residuos animales. Más aún, el mejor uso de la alimentación animal lleva a menores concentraciones de nitrógeno y de fósforo en el estiércol y, por tanto, en el agua.

La utilización de antibióticos como aditivos en el pienso con el fin de estimular el crecimiento tiene varios inconvenientes. Puede inducir resistencia a los antibióticos en los microorganismos, tanto en las bacterias que producen infecciones zoonóticas como en las bacterias apatógenas que actúan como reservorios de plásmidos para las bacterias dotadas de mayor grado de virulencia, y dejar residuos de antibióticos en las carnes. Además, entraña el peligro de que se contaminen accidentalmente los piensos durante su molienda. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso de un determinado antibiótico en las pequeñas concentraciones necesarias para conseguir la estimulación del crecimiento, es menos probable que seleccione flora resistente que el uso de ese mismo antibiótico en concentraciones profilácticas o terapéuticas.

Con el fin de evitar problemas de inducción de resistencias o de residuos en los alimentos, la Unión Europea ha establecido listas de antibióticos que

[11] J.F. Prescott, J.D. Baggot, *Incorporación de antibióticos a los piensos como estimulantes del crecimiento. Terapéutica antimicrobiana veterinaria*. Acribia, Zaragoza (1991) 297.

pueden ser utilizados como aditivos en la alimentación animal. En general se trata de antibióticos que no se usan en terapéutica humana ni animal y que no se absorben en el tracto gastrointestinal. Así, la Orden de 23 de marzo de 1988 [12] estableció la lista de aditivos autorizados, los contenidos máximos y mínimos y las características de su composición. Dicha orden ha sufrido numerosas modificaciones, adaptándose a la evolución de los conocimientos científicos y técnicos. Los antibióticos cuyo uso está admitido en la actualidad (en determinadas condiciones) como aditivo en los piensos destinados a la alimentación animal vienen reflejados en la Tabla 3.

Tabla 3. *Antibióticos admitidos como aditivos en determinadas condiciones.*

Nº CEE	Aditivo
E - 700	Bacitracina de zinc
E - 710	Espiramicina
E - 711	Virginiamicina
E - 712	Flavofosfolipol
E - 713	Fosfato de tilosina
E - 714	Monensina sódica
E - 715	Avoparcina
E - 716	Sanilomicina sódica
E - 717	Avilamicina

[12] B.O.E. Orden de 23 de marzo de 1988 por la que se dictan normas relativas a los aditivos en la alimentación de los animales. Boletín Oficial del Estado Nº 92 de 16 de abril de 1988.

2.2. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CON FINES PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

La producción animal a gran escala ha favorecido el desarrollo de productos que protegen la salud de los animales. Por razones económicas y medioambientales, muchas formas de producción animal suponen la concentración de un gran número de animales en un espacio reducido. En esta situación, las infecciones subclínicas pueden dañar seriamente la productividad de la explotación, ya que, en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales de ese ambiente cerrado.

En este tipo de explotaciones en las que tratar a cada individuo por separado es prácticamente imposible tiene mucha importancia la adición de antibióticos y otros medicamentos al pienso, para prevenir enfermedades o, en caso necesario, tratar a toda la población animal.

La incorporación de España a la Comunidad Europea ha supuesto importantes modificaciones legislativas en este sector. El Real Decreto 109/1995 de 27 de enero [13] regula todo lo relacionado con los medicamentos veterinarios, y el Real Decreto 157/1995 de 3 de febrero [14] establece las condiciones de preparación, puesta en el mercado y utilización de los piensos medicamentosos. Dicha normativa exige, además, que tales piensos, por lo que respecta al componente medicamentoso, respeten las normas aplicables a los medicamentos veterinarios y que, en consecuencia, sólo se

[13] B.O.E. Real Decreto 109 sobre medicamentos veterinarios. Boletín Oficial del Estado Nº 53 de 27 de enero de 1995.

[14] B.O.E. Real Decreto 157 por el que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos. Boletín Oficial del Estado Nº 64 de 3 de febrero de 1995.

empleen premezclas medicamentosas autorizadas, así como que la entrega de piensos medicamentosos se efectúe mediante prescripción de un veterinario.

Tras la administración de antibióticos en veterinaria es necesario respetar un plazo de espera o periodo de supresión antes de utilizar la carne, leche, huevos o cualquier producto animal, para que el antibiótico haya sido eliminado totalmente y no queden residuos o que éstos se encuentren por debajo de un límite máximo de residuos fijado en cada caso y que se comentará a continuación.

2.3. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL: PROBLEMÁTICA Y LEGISLACIÓN

La utilización de antibióticos en animales destinados al consumo humano proporciona innegables ventajas, ya que permite una mejora en la producción. Los beneficios alcanzan al consumidor, que encuentra disponibles con mayor facilidad proteínas de origen animal. Sin embargo, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos (o sus metabolitos) persistan en el animal y, por tanto, pasen a la cadena de alimentación humana, comportando una serie de riesgos que implican problemas de índole sanitaria (toxicidad y aparición de resistencias), problemas tecnológicos y problemas analíticos. Todos ellos se comentan a continuación.

a) PROBLEMAS SANITARIOS

El consumo de productos animales que contienen residuos de antibióticos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si se administrara de forma directa una dosis equivalente. Los efectos tóxicos son, en general, poco probables, ya que los residuos estarán presentes en pequeñas cantidades, pero pueden producir reacciones alérgicas en individuos sensibles.

El principal efecto peligroso es, desde el punto de vista sanitario, el desarrollo de resistencias bacterianas [15], que se pueden extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre, ya que sus ecosistemas bacterianos no están separados. La ruta principal por la que pueden transmitirse las bacterias resistentes de los animales al hombre es el contacto directo con los animales que están siendo tratados o están consumiendo antibióticos con el alimento. En este caso tienen mayor riesgo las personas que están directa y continuamente relacionadas con ellos, como veterinarios, granjeros, etc. Aunque esta vía puede ser importante desde el punto de vista individual, el número de personas que tienen relación directa con los animales es muy pequeño comparado con el total de la población y, por lo tanto, esta forma de transmisión tiene menos importancia desde el punto de vista de salud pública. Otra vía de transmisión más general sería el consumo o manipulación de productos de origen animal, como la leche, los huevos y la carne, que contengan flora resistente a antibióticos. La leche generalmente se pasteuriza y aunque es poco probable que contenga bacterias resistentes, puede tener residuos de antibióticos por haber recibido el ganado tratamientos terapéuticos con estos compuestos. Los huevos se encuentran en la mayoría de los casos estériles si la cáscara no ha sufrido ningún daño al manipularlos. Por tanto, la carne es la que puede representar el mayor peligro debido a la contaminación por bacterias resistentes del contenido intestinal a la hora del sacrificio.

b) PROBLEMAS TECNOLÓGICOS

Los residuos de antibióticos dan lugar a fermentaciones anormales y fallos en los iniciadores de los productos cárnicos fermentados. La presencia de

[15] N.T. Crosby, *Current trends in agricultural practice*. En: Ellis Horwood (Ed.). *Determination of Veterinary Residues in Food*, London, 1991.

estos residuos en la leche puede inhibir el crecimiento de los microorganismos requeridos para la fabricación de queso o yogur.

c) PROBLEMAS ANALÍTICOS

Los residuos de antibióticos pueden inhibir el desarrollo de la flora microbiana que ha podido contaminar un alimento y, de esta forma, cuando se realiza el análisis bacteriológico pasa desapercibida la presencia de patógenos. De este modo podría permitirse comercializar un alimento potencialmente peligroso o de mala calidad bacteriológica, cuyos patógenos se desarrollarán una vez que en el curso de su manipulación el efecto inhibitor de los antibióticos se haya disipado.

Todos estos problemas han ocasionado que la normativa Europea establezca 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 [16]. En el R.D. 109/1995 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 Límite Máximo de Residuos (LMR) tal y

[16] Real Decreto 109/1995, de 27 de enero sobre medicamentos veterinarios. BOE. 53, de 3 de marzo de 1995.

como está previsto en la Decisión de la UE 2377/ 90/CEE [17]. Esta normativa entró en vigor a partir del 1 de Enero de 1997, quedando desde entonces prohibido el uso de medicamentos veterinarios que contengan sustancias farmacológicamente activas que no estén mencionadas en los anexos I, II o III, en especies productoras de alimentos. La Directiva comunitaria 96/23/CE [18] establece las medidas de control y los planes de vigilancia 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.

Asimismo, el Reglamento (CE) n° 1181/2002 [19] modifica el anexo I del Reglamento n° 2377/90/CEE del Consejo, sobre los LMR de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, incorporando nuevas sustancias. Los grupos incluidos cuyos LMRs están legislados en diferentes tejidos animales comestibles y productos (grasa, hígado, riñón, leche, músculo, etc.) para diversas especies productoras de alimentos (bovinos,

[17] 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.

[18] Directiva 96/23/EC de Abril 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancia y sus residuos en animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/EEC y 86/469/EEC y las Decisiones 89/18/EEC y 91/664/EEC, Off. J. Eur. Commun. L125 (1996) 10.

[19] Reglamento 1181/2002 de la Comisión, de 1 de julio de 2002, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CEE) n° 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.

porcinos, caprinos, equinos, aves, conejos, salmónidos, etc.) son los agentes antiinfecciosos, dentro de los cuales 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.).

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de disponer de métodos analíticos y técnicas de tratamiento de muestra para la detección de residuos de antibacterianos en alimentos, con la problemática que esto conlleva y que está relacionada con:

- i) El gran número de compuestos que deben ser controlados, así como sus posibles metabolitos debido a que ciertos productos pueden oxidarse, reducirse o hidrolizarse en la primera etapa del metabolismo o incluso biotransformarse a conjugados solubles en etapas posteriores, como es el caso de los nitrofuranos, presentando los metabolitos cierta toxicidad.
- ii) Los niveles extremadamente bajos a los cuales pueden presentarse estos residuos en los alimentos de interés (por debajo de los mg/Kg).
- iii) La complejidad de la matriz objeto de análisis (carne, leche, huevos, etc., con alto contenido proteico, siendo posible la unión de estos antibacterianos con las proteínas, e incluso con ciertos cationes divalentes y trivalentes que forman complejos con éstos y que pueden aumentar su retención en diferentes tejidos).

La Decisión 2002/657/EC [20] relativa a la validación de los métodos analíticos de control de estos residuos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los resultados, en el marco de la Directiva 96/23/EC [18] no establecen obligación de usar métodos normalizados en el control de tales residuos en los alimentos. Sin embargo, se establecen distintos criterios de funcionamiento y requisitos que deben cumplir los métodos analíticos a aplicar en función del tipo de método. En el caso de requerir confirmación inequívoca de los residuos encontrados se indica que la detección por espectrometría de masas (MS) es la adecuada tras separación cromatográfica, empleándose un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos, basado en el uso de la MS mediante análisis de los fragmentos (modo SIM: control de iones específicos). La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo A (anabolizantes y sustancias no autorizadas) de la Directiva 96/23/EC requiere un mínimo de 4 puntos de identificación y las clasificadas en el grupo B (medicamentos de uso veterinario con LMR establecido, como es el caso de las quinolonas) un mínimo de 3 puntos, considerando que se asignará 1 punto por cada ión precursor y 1.5 puntos por cada ión fragmento obtenido.

España cuenta con un Plan Nacional para la Investigación de Residuos en los animales y en las carnes frescas. El Centro Nacional de Alimentación del Instituto de Salud Carlos III es Laboratorio Nacional de Referencia para la determinación de residuos de antibióticos. En un estudio [21] sobre 634 muestras recibidas en dicho Centro para identificar el inhibidor detectado en los laboratorios de control durante los años 1999 y 2000 se observó que en más

[20] Commission Decision 2002/657/EEC, Off. J. Eur. Comm. L 221 (2002) 23.

[21] V. Calderón, J.A. Berenguer, J. González, P. Díez, *Post-screening of antibiotic residues in meat and kidney samples*. En: Haagsma, N. (Ed). EuroResidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, 6-8 Mayo (1996) 305.

del 90% de las muestras de riñón y músculo de ovino remitidas para su confirmación se detectó la presencia de residuos de tetraciclinas. Las tetraciclinas fueron asimismo el grupo de residuos más frecuentemente determinado en muestras de porcino, pero también se detectaron β -lactámicos en un número importante de muestras de músculo de esta especie, y neomicina o gentamicina en riñón. Los porcentajes en vacuno son más variados: tetraciclinas y β -lactámicos son los residuos más frecuentes en músculo, y neomicina o gentamicina en riñón. Si consideramos el conjunto de todos los tejidos y especies, el 83 % de las muestras positivas contenían tetraciclinas, el 7.5% β -lactámicos, el 5 % neomicina o gentamicina, el 1.7% eritromicina y otros macrólidos, el 1.7% estreptomomicina y menos del 0.5% tilosina y quinolonas. Hay que tener en cuenta que los resultados se refieren a la detección de un residuo, pero esto no quiere decir que la concentración detectada esté por encima del límite máximo de residuos (LMR). De hecho, en el caso más frecuente (la presencia de residuos de tetraciclinas), el número de muestras positivas con residuos por encima del límite (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón) no supera el 16 %.

2.4. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

Además de todo lo expuesto hasta ahora en cuanto al riesgo de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos y su control, existe otro problema adicional y es el de su presencia en el medio ambiente, ya que a pesar de que el efecto de los plaguicidas ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, los fármacos se han incorporado constantemente en el medio ambiente (a través de la alimentación animal o de residuos orgánicos animales)

sin el debido control [22,23]. En los últimos años se han publicado algunos artículos de revisión concernientes al efecto de los fármacos en el medio ambiente [24], lo que demuestra el creciente interés que este problema está suscitando en la comunidad científica.



Figura 5. Contaminación por residuos de fármacos: fuentes y ecosistemas afectados: [1] Uso doméstico: (1a) Personas, (1b) Mascotas. Fuentes de contaminación por fármacos existen en: Excreción del organismo (sustancias no metabolizadas o metabolitos), vertido incontrolado de medicamentos al desagüe, filtración al subsuelo desde el sistema de alcantarillado, (1c) abandono de cadáveres de animales que sirven de alimento a carroñeros. [2] Vertido de residuos de hospitales a sumideros urbanos. [3] Liberación de efluentes líquidos de fosas sépticas (3a) y plantas depuradoras (3b) en aguas superficiales y/o acuíferos. [4] Transferencia de residuos sólidos a superficies: fertilización con abonos (ej. antibióticos), vertido de piensos medicamentosos, etc. [5] Liberación directa por baños, lavados. [6] Vertido controlado y clandestino de residuos industriales. [7] Compactación y enterramiento de residuos (domésticos, medicamentos, cementerios). [8] Liberación de aguas (medicadas y/o excretadas) empleadas en acuicultura, vertido de sustancias procedentes de cultivos transgénicos. [9] Liberación de agentes químicos empleados para desinfectación y desratización. [10] Transporte final al compartimento acuoso (fototransformación, alteración físico-química, degradación, mineralización, volatilización, absorción por plantas, etc.).

[22] F. M. Christensen, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 28 (1998) 212.

[23] *Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts of Aquatic Ecosystems*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), R.T. Williams (Ed.), Florida, 2005.

[24] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alba, D. Barceló, *Trends in Anal. Chem.* 22 (2003) 340.

En los últimos tiempos se han obtenido nuevos conocimientos sobre los efectos de xenobióticos de uso extendido, que actúan como disruptores endocrinos, lo que ha provocado inquietud en ámbitos relacionados con la salud pública ya que sustancias consideradas como seguras pueden causar efectos desconocidos incluso a concentraciones traza. Así, una gran variedad de productos farmacéuticos que incluye β -bloqueantes (como el propanolol), analgésicos (como el ibuprofeno), disruptores endocrinos (como el etinilestradiol) y antimicrobianos (como eritromicina, ciprofloxacina, sulfametazina y tetraciclina) se han detectado en plantas de tratamiento de aguas residuales [25,26,27,28,29,30]. Además, estos contaminantes emergentes presentan las propiedades necesarias para su bio-acumulación, provocando efectos desconocidos en los ecosistemas acuáticos o terrestres. De esta forma, los medicamentos se han convertido en un problema medioambiental de envergadura. Si hasta hace unos años lo que preocupaba prioritariamente eran los vertidos de carácter industrial, ahora el interés se centra en el impacto de los vertidos que reciben los ríos desde los núcleos de población.

La exposición a fármacos del medio ambiente es función de la combinación de varios factores: cantidad manufacturada, desecho del producto sin usar o una vez caducado, dosis (cantidad, frecuencia y duración), eficacia de la excreción del compuesto inalterado y de sus metabolitos bioactivos, adsorción/desorción en los suelos y descomposición metabólica una vez sedimentado.

Así, los antibióticos y las sustancias empleadas como aditivos alimentarios para incrementar el crecimiento de animales (como por ejemplo en

[25] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2719.

[26] X.S. Miao, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A.* 998 (2003) 133.

[27] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 69.

[28] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 109.

[29] A. Gobel, C.S. McArdell, M.J.F. Suter, W. Giger, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4756.

[30] X.S. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3533.

piscifactorías), acaban vertiéndose al medio ambiente, sin que se tenga gran conocimiento de las consecuencias de esta exposición. Por ejemplo, las sustancias empleadas en ganadería, se excretan en la orina o heces directamente al campo, pudiendo presentar concentraciones locales altas. Así mismo, los antibióticos empleados en piscifactorías se vierten directamente al agua, acumulándose y afectando a los microorganismos acuáticos.

El destino de los fármacos en el medio ambiente puede dividirse en tres rutas principales [31,32]:

- (1) El producto se mineraliza a dióxido de carbono y agua;
- (2) El producto es lipofílico y parte de él no se degrada, quedando en los sedimentos;
- (3) El producto se metaboliza a una forma más hidrofílica, pero aún persistente, terminando en las aguas residuales o en un río, pudiendo afectar a organismos acuáticos, si los metabolitos son biológicamente activos. Pueden permanecer en sedimentos o campos de cultivo, terminar formando parte del estiércol y afectar a microorganismos o cultivos.

Las directivas propuestas prescriben que el control del riesgo ambiental debe ser parte del procedimiento para aprobar un nuevo fármaco. La *Food and Drug Administration* (FDA) ha emitido el *Environmental Assessment Technical Handbook* para sus requerimientos medio ambientales. En 1995 emitió una guía para la industria destinada a la valoración medio ambiental de fármacos y suplementos de consumo humano, así como documentos para el control del impacto ambiental de algunos fármacos en concreto. Sin embargo, estas normativas parecen no tener una gran difusión, ya que en los últimos años, sólo unos pocos de los nuevos fármacos incluyen un estudio ecotoxicológico apropiado. En Europa la legislación en este campo se inició al comienzo de los

[31] S.E. Jørgensen, B. Halling-Sørensen, *Chemosphere* 40 (2000) 691.

[32] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhøfl, S.E. Jørgensen, *Chemosphere* 36 (1998) 357.

90, y distingue entre sustancias médicas que no contienen (o no consisten en) organismos modificados genéticamente (OMGs) y aquellas que los contienen. Así, las nuevas normativas de la UE incluyen el medio ambiente en sus decisiones. Esto implica que cualquier ley (en transporte, agricultura, pesca, medicina e industria farmacéutica) tendrá en cuenta el posible impacto medio ambiental. En enero de 1998, la UE emitió una guía técnica para controlar el riesgo de la exposición medio ambiental a fármacos empleados en veterinaria (EM/CAMP/055/96-final). Asimismo, la Directiva Técnica 81/852/EEC (enmienda desde el 1 de abril de 1993) concerniente a productos médicos veterinarios, incluye secciones con los requerimientos básicos para hacer un estudio del riesgo de ecotoxicidad medio ambiental, mientras que la guía EMEA/cvmp/055/96-Final de 1997 proporciona las directrices técnicas para la evaluación del riesgo de sustancias médicas veterinarias.

Sin embargo, las directivas técnicas para productos médicos de consumo humano (directiva UE 75/318/EEC) no incluyen ninguna referencia a la ecotoxicidad o ecotoxicología y aparentemente no hay planes de incluirlas próximamente. En este aspecto difiere de su homólogo veterinario (directiva UE 81/852/EEC), descrito anteriormente. Así, excepto para los productos que contienen OMGs, la legislación no especifica cómo realizar una evaluación del riesgo medio ambiental de los productos farmacéuticos. El borrador de la Guía III/5504/94 propuesta en 1994, indica que las recomendaciones dadas para productos veterinarios son también aplicables a fármacos de consumo humano. En Europa, Alemania es el país que más ha trabajado en este campo y Dinamarca destaca por el número de depuradoras que ya tiene operativas con medios suficientes como para eliminar los restos de medicamentos antes de que lleguen a los ríos. En los demás países, las investigaciones aún son escasas y en España se conoce muy poco del grado de contaminación real que ejercen estas sustancias. Avanzar en el conocimiento del problema es uno de los principales objetivos del programa europeo «Aquaterra», que se desarrollará durante cinco

años en cinco grandes ríos del continente: Ebro, Meuse, Brevilles, Elba y Danubio. Participan 45 instituciones de trece países de la UE, más Suiza y Serbia. Un grupo de expertos, coordinado por el Dr. Damiá Barceló [33,34,35], del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC, lleva ya varios años evaluando la calidad de las aguas del Ebro y profundizando en el impacto que están teniendo los medicamentos y de evaluar en general la contaminación industrial, agrícola y urbana. Aunque el efecto contaminante de los medicamentos no es un hecho nuevo, el avance en las técnicas analíticas ha permitido detectarlos y tomar conciencia del problema que causan en los ecosistemas, siendo necesario potenciar los estudios que determinen el alcance del riesgo, para tomar las medidas necesarias. De momento no hay ninguna legislación sobre el tema, siendo necesario impulsar los estudios que proporcionen métodos suficientemente fiables, sensibles y selectivos para su determinación con objeto de esclarecer si es necesario regular la cantidad máxima de cada fármaco que puede salir de una depuradora.

Por todo lo expuesto hasta ahora, el consumo de fármacos (tanto humano como en veterinaria) obliga al control de sus residuos tanto en alimentos como en el medio ambiente, garantizando que no supongan un riesgo para la salud pública. La correcta evaluación del impacto que supone el uso de estos productos y el diseño de medidas conducentes a eliminar o paliar sus efectos, sólo se puede llevar a cabo si se dispone de técnicas analíticas suficientemente sensibles y selectivas que originan datos analíticos fiables.

[33] D. Barcelo, R. Brix, Farre, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 743.

[34] J. Barth, P. Grathwohl, *Das integrierte EU-Projekt AquaTerra erreicht sein zweites Projektjahr. Grundwasser* 11 (2006) 131.

[35] N. Ratola, Lacorte S., A. Alves, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 198.

3. TÉCNICAS MINIATURIZADAS: ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

En los últimos años las técnicas de separación miniaturizadas han cobrado gran interés debido a las numerosas ventajas que presentan, tales como la reducción del consumo de disolventes, el incremento en la resolución e incluso una mejorada sensibilidad. Igualmente es de destacar los bajos volúmenes de muestras requeridos, lo que constituye una gran ventaja, fundamentalmente en el ámbito biomédico [36]. En general, dentro de los sistemas miniaturizados se engloban actualmente los que utilizan columnas de bajo diámetro interno o capilares de sílice fundida, y aquellos en los que la separación se realiza en microchips.

En esta apartado se recoge una breve introducción a las técnicas miniaturizadas que se han usado en esta Memoria para abordar la determinación simultánea de residuos de antibióticos β -lactámicos en diversas matrices: la electroforesis capilar y la cromatografía líquida capilar.

3.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

3.1.1. GENERALIDADES

El desarrollo de métodos basados en electroforesis capilar (CE) para separar diversos analitos en muestras de distinta naturaleza ha aumentado muy rápidamente en la última década [37,38,39,40,41] y la técnica ha demostrado su

[36] M. Szumski, B. Buszewski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 1.

[37] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis: Principles, and Practice and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1993.

[38] P. Camilleri, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

[39] J.P. Landers, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.

[40] D.L. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1995.

potencialidad en aplicaciones muy diferentes. Algunos artículos de revisión recogen su aplicación reciente en el ámbito del análisis de fármacos [42], de biopolímeros [43], antibióticos en alimentos, muestras biológicas o medioambientales [44,45,46,47,48,49], plaguicidas [53,54,50,51], péptidos y proteínas [52], toxinas [48], compuestos de interés forense [53], etc.

Como características de la electroforesis capilar debemos destacar que se trata de una nanotécnica, tanto en los volúmenes de muestra que emplea (1 a 40 nL) como en los volúmenes de reactivos. Esto la convierte en una técnica más barata y menos contaminante si se compara con HPLC. Se trata también de una técnica rápida puesto que los tiempos de análisis suelen ser siempre inferiores a 30 min., incluso a veces se consiguen separaciones en menos de 2 min. Quizás su característica más destacable es su alta eficacia, pudiéndose conseguir fácilmente cientos de miles de platos teóricos y en ocasiones hasta varios millones. La razón estriba fundamentalmente en su perfil de flujo plano, recordemos que en HPLC los perfiles de flujo son parabólicos. Otra característica importante es que no se encuentra limitada por el peso molecular de los analitos, pudiendo separar, en la misma columna, desde pequeñas moléculas hasta otras mucho más complicadas. Al igual que HPLC se puede automatizar completamente y si bien es cierto que

[41] K.D. Altria, *Capillary Electrophoresis Guidebook. Methods in Molecular, Biology* Vol 52, Humana Press, Totowa, 1996.

[42] L. Geiser, J.L. Vetheuy, *Electrophoresis* 28 (2007) 45.

[43] S. Hu, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2833.

[44] H.Y. Huang, Y.C. Shih, Y.C. Chen, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 317.

[45] M. Hernández, F. Borull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416.

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

[47] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *Electrophoresis* 26 (2005) 1550.

[48] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 793.

[49] V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 534.

[50] Y. Picó, R. Rodríguez, J. Mañes, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 133.

[51] J. Hernández-Borges, S. Frías-García, A. Cifuentes, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 947.

[52] A.M. García-Campaña, H. Fabre, M. Taverna, *Electrophoresis* 28 (2007) 208.

[53] C. Cruces-Blanco, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 215.

CE presenta una limitación en cuanto a sensibilidad debido al poco volumen de muestra que se introduce en el capilar, y al reducido camino óptico, también es posible realizar técnicas de concentración “on-line” e “in-line” que aumentan considerablemente su capacidad de detección, además de recurrir a técnicas de detección más sensibles, como es el caso de la fluorescencia inducida por laser o la quimioluminiscencia.

La separación por (CE) se basa en las diferencias entre las movilidades electroforéticas de los distintos analitos (como consecuencia de su diferente relación carga / tamaño) dentro de un tubo capilar lleno de disolución tampón cuando son sometidos a la acción de un campo eléctrico. Para llevar a cabo la separación son necesarios los siguientes elementos:

- Fuente de alto voltaje: capaz de aplicar hasta 30 kV.
- Capilar: su diámetro interno oscila entre 25 y 100 μm y el externo es de 375 μm .
- Viales: además del vial de muestra son necesarios un vial con agua, otro con NaOH y otro con disolución tampón para acondicionar el capilar, un vial de desecho y dos más con tampón para cerrar el circuito cuando apliquemos un voltaje.
- Sistema de introducción de la muestra: el modo más habitual es aplicando presión sobre el vial de muestra (inyección hidrodinámica) aunque también se puede hacer mediante la aplicación de un voltaje (inyección electrocinética). Otra posibilidad es elevando el vial de entrada para que la muestra entre por gravedad (inyección por efecto sifón).

Instrumentalmente, la aplicación de presión en el vial de entrada es la solución más sencilla, la que adoptan la mayoría de equipos y ha sido la empleada en esta Memoria. Este tipo de inyección presenta la ventaja de que la cantidad de cada analito inyectada es independiente de la movilidad electroforética del mismo.

La presión y el tiempo que ésta se aplica (tiempo de inyección) son los dos parámetros que controla el analista para variar el volumen de inyección (vol)

que puede ser calculado según la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$vol = \frac{\Delta P d^4 \pi}{128 \eta L}$$

El volumen inyectado es función de la presión aplicada (ΔP), el tiempo de inyección (t), la viscosidad de la disolución (η) y características del capilar como su longitud (L) o el diámetro interno (d). Valores de inyección próximos a 250 mbar s^{-1} son habituales en CE. Con este sistema de inyección, la precisión del área de pico es del orden del 2% (medida como coeficiente de variación).

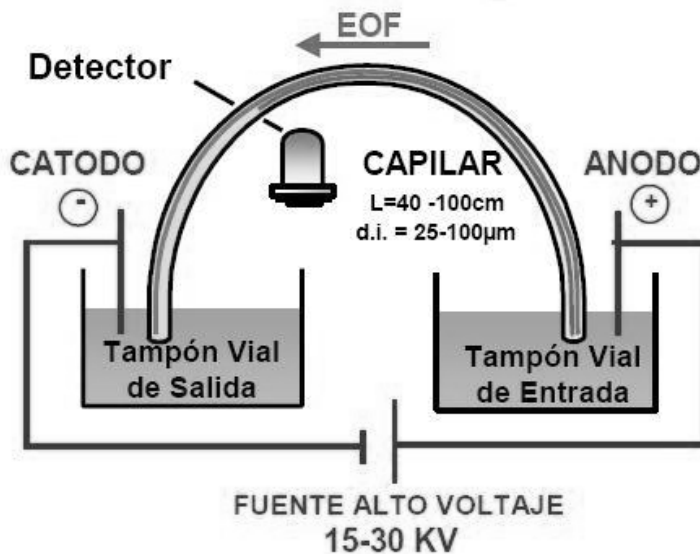


Figura 11. Diagrama de un sistema de electroforesis capilar.

• **Detector:** el más utilizado es el de diodos en fila aunque también se puede utilizar un detector fluorescente, un espectrómetro de masas y en menor medida se encuentran los detectores quimioluminiscentes, fosforescentes y de espectroscopia Raman. A continuación se comentan los dos sistemas de detección empleados en esta Memoria: detección UV/Vis y espectrometría de masas.

▪ **Detección UV-Vis.** Este detector destaca por su universalidad, ya que son muchos los analitos que poseen algún grupo cromóforo que absorbe en el intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm en el cual trabajan la mayoría de detectores. Además, en el caso de CE este tipo de detectores también pueden ser aplicados a compuestos no absorbentes haciendo uso de una detección indirecta. La detección se realiza en el capilar, eliminando parte del recubrimiento de poliimida del mismo. La dependencia de la absorbancia con el camino óptico, según la ley de Lambert-Beer, hace que la sensibilidad esté limitada como consecuencia del pequeño camino óptico que el capilar ofrece. Esto hace que el detector tenga que ser cuidadosamente diseñado para enfocar la máxima luz en el capilar y para minimizar la luz dispersa que llega al monocromador. La utilización de un detector DAD en lugar de la detección por única o múltiple longitud de onda supone muchas ventajas, como son: visualización del espectro UV/Vis en todo momento del análisis, obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, identificación de compuestos y determinación de la pureza de pico.

Existen algunos métodos que permiten mejorar la sensibilidad mediante el aumento del camino óptico, que se muestran en la Figura 12, consistentes en el uso de iluminación axial en lugar de perpendicular, utilizando una celda de flujo de alta detección o el uso de capilares con camino óptico extendido (capilares de burbuja), en los que el diámetro interno está aumentado de 3 a 5

veces en el punto de detección, sin que esto implique un aumento en la difusión del analito.

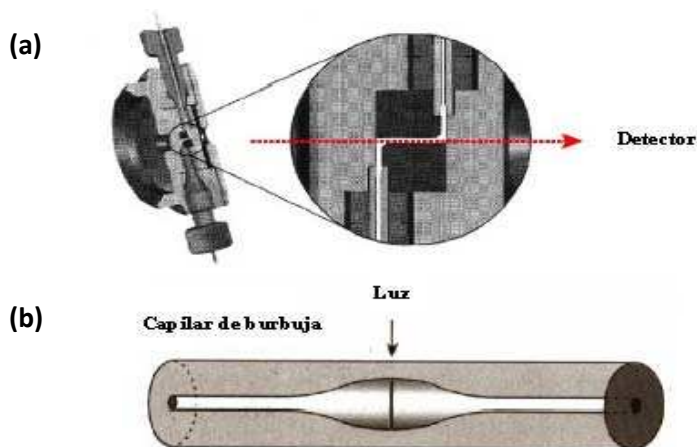


Figura 12. Celda de flujo de alta detección (a) y capilar de burbuja (b).

▪ *Detección por Espectrometría de Masas.* La Espectrometría de Masas (MS) acoplada como sistema de detección a la CE constituye una poderosa alternativa en la que se combina la rapidez del análisis, la elevada resolución y el bajo consumo de muestra que presenta la CE, con la selectividad del análisis y la información estructural proporcionada por la MS. Esta combinación proporciona una segunda dimensión a la separación, ya que los analitos no sólo quedan separados por su relación carga/tamaño (como es el caso de la CZE) sino además en función de su relación masa/carga (m/z). A pesar de los avances y del incremento de aplicaciones que se han producido en la última década, aún son escasas las aplicaciones de CE-MS en análisis cuantitativo [54,55, 56, 57, 58].

[54] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3837.

Dada la importancia y complejidad de este acoplamiento, se comentará en detalle en un apartado posterior.

Los dos fenómenos en los que se basan las separaciones electroforéticas son: electroósmosis y electromigración [59].

La *electromigración* consiste en el movimiento neto de las especies que forman la muestra a través de la disolución tampón dentro del capilar, bajo la influencia del campo eléctrico, es decir, afecta de forma individual a cada uno de los analitos que se encuentran en dicho capilar y el resultado es la aparición de la llamada movilidad electroforética, directamente proporcional a la relación carga/tamaño de los analitos. El fenómeno de electromigración viene caracterizado por tres factores:

a) Velocidad electroforética (V_e), que es directamente proporcional al campo eléctrico (es decir, cuanto mayor sea el voltaje aplicado (V), mayor es la velocidad con la que se mueven las especies cargadas) e inversamente proporcional a la longitud total del capilar (L) [60,61,62]:

$$V_e = \frac{\mu_e \cdot V}{L}$$

b) Movilidad electroforética (μ_e), que depende de una serie de factores relacionados con el medio electroforético, como la viscosidad (η) y, sobre todo de la relación carga (q)/tamaño de los analitos presentes en la muestra.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

donde r = radio del analito

[55] J. Ohnesorge, C. Sanger-van de Griend, H. Watzig, *Electrophoresis* 26 (2005) 2360.

[56] J. Ohnesorge, C. Neusüß, H. Watzig, *Electrophoresis* 26 (2005) 3973.

[57] P. Schmitt-Kopplin, M. Englmann, *Electrophoresis* 26 (2005) 1209.

[58] C. Simó, A. Cifuentes, en *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, M.L. Marina, A. Rios, M. Valcárcel (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, Capítulo 9.

[59] C. Cruces-Blanco, *Electroforesis Capilar*, Ed. Universidad de Almería, 1998.

[60] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.

[61] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *J. High Resolut. Chromatogr. Comm.* 4 (1981) 230.

[62] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *Science* 222 (1983) 266.

c) Tiempo de migración: es el tiempo que tarda un analito en moverse a través del capilar desde el punto de inyección hasta el detector y será tanto menor cuanto mayor sea el voltaje aplicado.

La *electroósmosis* es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida), dando como resultado un movimiento, tanto de las especies neutras como del conjunto de la disolución tampón, que se conoce con el nombre de movilidad electroosmótica. Este fenómeno da lugar a un perfil plano del flujo, eliminándose así una de las causas del ensanchamiento del flujo cuando éste se genera externamente, como sucede en HPLC, donde el perfil del flujo es parabólico, constituyendo una causa de ensanchamiento de las bandas y pérdida de eficacia. Cuando el ensanchamiento de bandas es controlado exclusivamente por difusión, se obtienen picos que generalmente superan los 105 platos teóricos.

De la existencia del llamado flujo electroosmótico (EOF) se derivan una velocidad electroosmótica y una movilidad electroosmótica, de expresiones similares a las obtenidas por electromigración. El EOF está provocado por el movimiento de los cationes de la disolución tampón que contrarrestan la carga negativa de los grupos silanoles que constituyen las paredes internas del capilar de sílice. Se forma una doble capa eléctrica o, también denominada, capa móvil. Estos cationes arrastran moléculas de disolvente en su movimiento hacia el cátodo lo que origina un flujo de disolvente en ese sentido. Cuanto mayor es el pH mayor es este flujo.

Al existir los dos fenómenos de migración, la velocidad, la movilidad y el tiempo de migración reales de cada especie van a ser la suma de las dos contribuciones. En capilares de sílice huecos, el movimiento de los analitos está influenciado por la naturaleza del medio electroforético. Debido a que para que tenga lugar la separación en CE se aplica un campo eléctrico a la disolución que

contiene la muestra, el medio electroforético tiene que ser tal que conduzca bien la corriente eléctrica. El más empleado es una disolución tampón, generalmente de tipo inorgánico, puesto que presentan una baja conductividad y el efecto térmico se minimiza, pudiendo trabajar con voltajes elevados y conseguir adecuadas resoluciones. El tipo de tampón elegido es de vital importancia ya que determina el comportamiento de los analitos, que se afectan enormemente por propiedades tales como el pH, fuerza iónica y composición del mismo. El flujo de iones será la suma del EOF y del flujo electroforético. El flujo electroforético sólo afecta a las especies cargadas en disolución cuando se someten a la acción de un campo eléctrico externo (Figura 13).

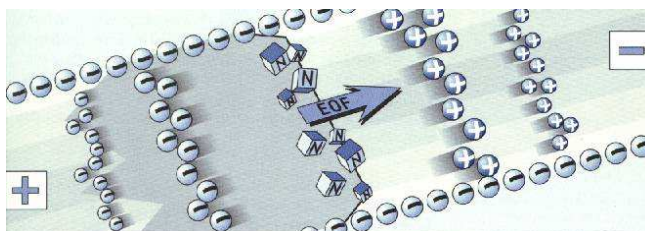


Figura 13. *Migración diferencial de las moléculas según carga/radio.*

Junto con la naturaleza del medio electroforético, otra variable que va a afectar en gran medida a la magnitud y dirección del EOF y, por tanto, a la calidad de las separaciones, es la composición del capilar. El capilar es la parte más importante de un equipo de CE ya que, gracias a su empleo, se pueden aplicar voltajes elevados, consiguiendo una buena disipación del calor generado y, por tanto, minimizándose el calentamiento o el efecto Joule.

Una de las características más destacables de la CE es su gran versatilidad para afrontar una gran variedad de análisis. Esta versatilidad se fundamenta en gran parte en los diversos modos de operación que la técnica ofrece. Estos modos son en su mayoría fácilmente accesibles cambiando la composición del tampón de separación o algunas condiciones de separación.

3.1.2. MODALIDADES DE ELECTROFORESIS CAPILAR

Las modalidades de electroforesis que se emplean actualmente se describen a continuación brevemente (Tabla 4):

- ***Electroforesis capilar zonal (CZE)***: es la modalidad más empleada por ser la más sencilla. Consiste en rellenar todo el capilar con un electrolito fondo que en la mayoría de los casos es un tampón.
- ***Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)***: El mecanismo de separación en MEKC se basa en la distribución de los solutos en dos fases: la solución tampón y una fase micelar. Un surfactante es añadido al tampón en una concentración superior a la concentración micelar crítica (CMC), por lo que se forman micelas. Estas micelas, de forma esférica, tienen la parte hidrofílica de las moléculas de surfactante orientadas hacia la solución de tampón, mientras que la parte hidrofóbica está orientada hacia el interior. Los surfactantes más utilizados en MEKC son los aniónicos (como el dodecilsulfato sódico, SDS). En este caso, las moléculas neutras interactúan con la micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad, dando lugar a la separación (Figura 14).

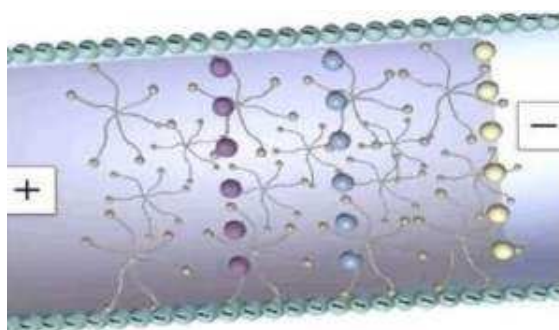


Figura 14. Esquema de separación MEKC.

La micela actúa, de este modo, como fase pseudoestacionaria, ya que realiza una función similar a la de una fase estacionaria cromatográfica. A pesar

de su carga negativa, la micela o el conjunto micela-analito neutro migran hacia el cátodo arrastrados por el EOF. Si los solutos no son neutros, hay que tener en cuenta otros efectos: relación carga/masa, hidrofobicidad e interacción de carga. También se han empleados surfactantes catiónicos, como el bromuro de deciltrimetilamonio (DTAB), no iónicos (Tritón X-100), zwitteriónicos, como el 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) o sales biliares (ácido taurocólico). El uso de otros aditivos (metanol, ciclodextrinas, iones metálicos, etc.), además de las micelas, permite obtener mejoras en la selectividad y resolución.

- ***Isoelectroenfoque capilar (CIEF)***: consiste en establecer un gradiente de pH a lo largo del capilar. Se ha empleado para separar proteínas y péptidos basándose en su diferentes puntos isoeléctricos.

- ***Electroforesis capilar en gel (CGE)***: el capilar se rellena con un gel. La separación se basa en las diferencias de tamaños entre moléculas puesto que el gel actúa de criba.

- ***Isotacoforesis capilar (CITP)***: es similar a CZE con la diferencia de que ahora el electrolito no es continuo, el tampón de entrada no es el mismo que el de salida. Su limitación es que no podemos separa cationes y aniones a la vez.

- ***Electrocromatografía capilar (CEC)***: el capilar se rellena de fase estacionaria y los analitos se separan en base al equilibrio de partición entre la fase estacionaria y la fase móvil. La diferencia con HPLC estriba en que la fuerza que hace avanzar a los analitos por la columna no es una bomba de alta presión sino el campo eléctrico aplicado.

En esta tesis se han utilizado las modalidades de CZE y MECK. Un aspecto de la detección muy importante en el análisis cuantitativo es el hecho de que el área de pico en CE es función del tiempo de residencia del analito en el detector. Por

tanto, es habitual relacionar la concentración del analito con el área corregida por el tiempo de migración. Con esto se consigue compensar las variaciones de área de pico que se producen debido a la irreproducibilidad en los tiempos de migración.

3.1.3. *TÉCNICAS DE PRECONCENTRACIÓN ON-LINE DE LA MUESTRA*

Además de aumentar el camino óptico, también se pueden emplear otros métodos para mejorar la sensibilidad y disminuir los límites de detección, tales como la preconcentración de la muestra en el mismo capilar, combinada con el análisis por CE, con objeto de aumentar la cantidad de analito que se introduce dentro del capilar de separación, consiguiéndose así una mejor sensibilidad. Se han publicado numerosas revisiones acerca de las distintas técnicas de apilamiento (“*stacking*”) para muestras [63,64,65,66,67,68,69,70]. Estas técnicas básicamente consisten en provocar el movimiento de los iones de la muestra a través de un límite de concentración que separa la región que contiene la muestra del resto del capilar, que contiene el tampón electroforético. Así, se produce la acumulación *on-line* de analitos diluidos a partir de una gran zona de muestra inyectada, en una zona mucho más estrecha que resulta con una mayor concentración de los analitos. El principio básico de la preconcentración aplicado al caso de aniones en una muestra se ilustra en la Figura 15: la región que contiene los iones de la muestra es una disolución de

[63] Z.K. Shihabi, *J. Chromatog. A* 902 (2000) 107.

[64] J. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatog. A* 902 (2000) 119.

[65] T. Hirokawa, N. Ikuta, T. Yoshiyama, *J. Chromatog. A* 894 (2000) 3.

[66] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466.

[67] R.L. Chien, *Electrophoresis* 24 (2003) 486.

[68] B.M. Simonet, M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 605.

[69] G. Hempel, *Electrophoresis* 21 (2003) 691.

[70] Z. Malá, L. Křivánková, P. Gebauer, P. Bocek, *Electrophoresis* 28 (2007) 243.

baja conductividad mientras que la zona que contiene el electrolito es una disolución de alta conductividad (Figura 15 (A)).

Si disoluciones de alta y baja conductividad se encuentran presentes en el interior del capilar bajo la aplicación de un voltaje, la zona de baja conductividad experimentará Si disoluciones de alta y baja conductividad se encuentran presentes en el interior del capilar bajo la aplicación de un voltaje, la zona de baja conductividad experimentará un mayor campo eléctrico comparado con la zona del electrolito tampón. Los iones de la muestra se moverán más rápido en la zona de baja conductividad que en la de alta conductividad. El cambio brusco en el movimiento de iones de la muestra a través del límite de concentración consigue un apilamiento de la muestra, proporcionando zonas dentro del capilar con mayores concentraciones de analito que la original (Figura 15 (B)). En este caso se asume que el EOF es cero.

Si disoluciones de alta y baja conductividad se encuentran presentes en el interior del capilar bajo la aplicación de un voltaje, la zona de baja conductividad experimentará Si disoluciones de alta y baja conductividad se encuentran presentes en el interior del capilar bajo la aplicación de un voltaje, la zona de baja conductividad experimentará un mayor campo eléctrico comparado con la zona del electrolito tampón. Los iones de la muestra se moverán más rápido en la zona de baja conductividad que en la de alta conductividad.

Tabla 4. Características y mecanismo de separación de los distintos modos de CE

Modo	Características/aplicaciones	Mecanismo
Enfoque isoelectrico capilar (CIEF)	-Capilar lleno de electrolitos, cada uno capaz de tamponar a un pH diferente. Extremos del capilar sumergidos en dos soluciones: una ácida y otra básica. Se genera gradiente de pHs en el capilar. -Aplicaciones: sustancias anfotéricas como péptidos, proteínas y aminoácidos.	Punto isoelectrico de los analitos: migran hasta alcanzar el pH donde son neutros.
Isotacoforesis capilar (CITP)	-Sistema discontinuo de tampón: tampones con distinta movilidad. Separación en zonas consecutivas: escalones, no picos. -Aplicaciones: iones metálicos, aniones orgánicos e inorgánicos.	Separación en el interior de zona delimitada por los dos tampones.
Electroforesis capilar en gel (CGE)	-Aplicaciones: macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas.	Diferencia de tamaños y cargas.
Electrocromatografía capilar (CEC)	-Capilar funcionalizado con fase estacionaria. -Aplicaciones: macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas.	Diferencia de tamaños y cargas

El cambio brusco en el movimiento de iones de la muestra a través del límite de concentración consigue un apilamiento de la muestra, proporcionando zonas dentro del capilar con mayores concentraciones de analito que la original (Figura 15 (B)). En este caso se asume que el EOF es cero.

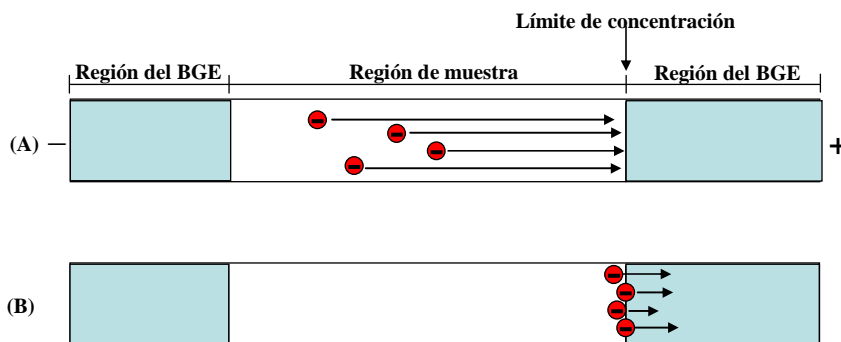


Figura 15. Modelo general de preconcentración online de analitos para aniones (BGE, electrolito tampón)

Estos métodos de preconcentración de muestra *online* pueden realizarse tanto usando el modo de inyección hidrodinámica (por gravedad o por presión), como electrocinética, siendo el primer modo el más utilizado. En este caso es posible distinguir entre:

- *Modo normal de apilamiento de muestra (normal stacking mode, NSM).*

Es el más simple de los procedimientos de preconcentración *online* y consiste en disolver la muestra en un disolvente de baja conductividad, inyectando posteriormente la disolución resultante hidrodinámicamente. La preconcentración comienza en la interfase entre la zona de baja conductividad y el electrolito tampón debido al cambio brusco en la velocidad electroforética. Con este modo es posible conseguir factores de concentración aproximadamente de 10, mejorando los límites de detección en aproximadamente un orden de magnitud. Normalmente los factores de

concentración se obtienen dividiendo la altura de pico obtenida al aplicar la preconcentración *online* por la altura de pico obtenida mediante inyección normal. La limitación que presenta esta modalidad es la reducida longitud de la zona de muestra que puede ser inyectada en el capilar sin pérdida de eficiencia o resolución en la separación. Esto se debe al ensanchamiento de las zonas en las que se produce el apilamiento o agrupación debido a la mezcla de las zonas de baja y alta conductividad en esta región límite y al flujo laminar generado dentro del capilar como resultado del desequilibrio de la velocidad del EOF local y en el resto del capilar.

- *Apilamiento de muestra de gran volumen (large volume sample stacking, LVSS)*. En esta modalidad el volumen de muestra introducido es mayor que el óptimo usado en NSM, y la matriz de la muestra debe ser propulsada hacia fuera del capilar con objeto de preservar la eficacia de la separación. Esta expulsión debe llevarse a cabo mediante presión externa o mediante el EOF, el sentido siempre será opuesto al del movimiento de los solutos cargados y la velocidad de expulsión debe de ser menor que la velocidad electroforética de éstos. Una limitación de esta modalidad es que sólo pueden concentrarse a la vez analitos cargados positiva o negativamente. Es posible conseguir factores de concentración mayores de 100, mejorándose los límites de detección en más de 2 órdenes de magnitud. Esta modalidad puede llevarse a cabo invirtiendo o no la polaridad.

- *LVSS con cambio de polaridad*. En esta modalidad la muestra se disuelve en un disolvente de baja conductividad y se inyecta la disolución resultante hidrodinámicamente durante un periodo de tiempo prolongado. La Figura 16 muestra un esquema de este proceso para el caso de LVSS con cambio de polaridad para aniones. El cambio de polaridad se realiza con objeto de controlar el EOF y se lleva a cabo en sistemas de CZE que requieren alto EOF para llevar los analitos separados hasta el detector. La polaridad del voltaje

durante el apilamiento de la muestra se selecciona en función de la carga de los iones de la muestra, siendo inversa a la polaridad usada para la separación y la detección. Como se muestra en la Figura 16, en el caso de separación de aniones en una muestra se usa un electrodo positivo en el vial de salida. En el caso de muestras con cationes, se usa un aditivo en el tampón electroforético (por ejemplo un surfactante catiónico) para invertir el EOF y el electrodo negativo se ubica en el vial de salida. En ambos casos, cuando se observa que la corriente alcanza el 90-99 % de la corriente real (corriente obtenida cuando el capilar se llena sólo con el tampón electroforético), la polaridad se invierte de modo que el sentido del EOF es hacia el detector.

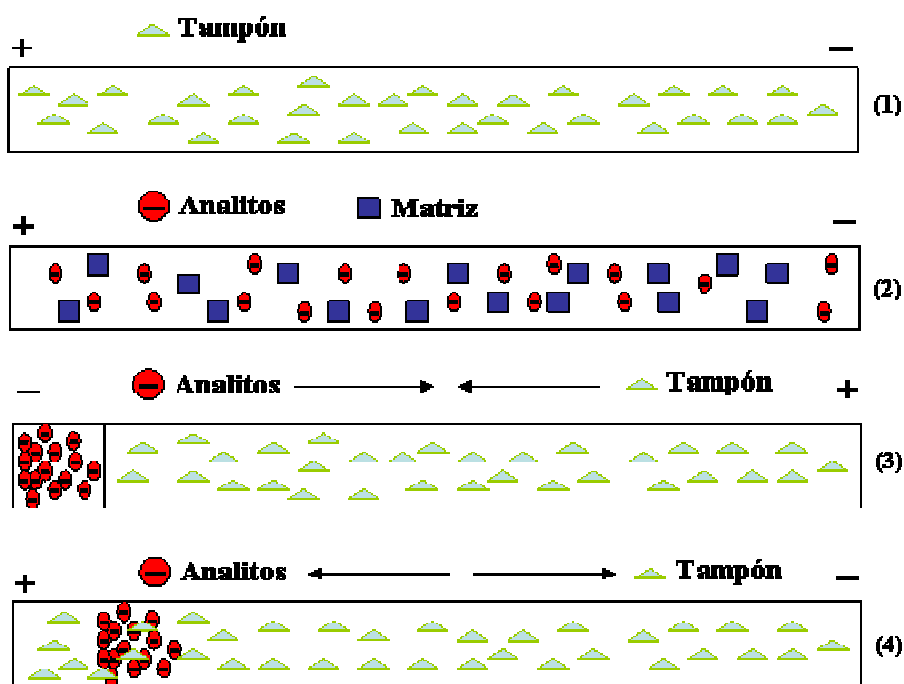


Figura 16. LVSS con cambio de polaridad para aniones. (1) Situación inicial, capilar lleno de tampón de separación; (2) inyección de la muestra preparada en disolvente de baja conductividad; (3) aplicación de voltaje a polaridad negativa para focalizar zonas y eliminar la matriz de la muestra; los aniones se focalizan completamente y la mayoría de la matriz se elimina, parándose el voltaje; (4) aplicación de voltaje a polaridad positiva para la separación y detección de las zonas focalizadas.

LVSS sin cambio de polaridad. En algunos instrumentos en los que no es posible llevar a cabo la inversión de la polaridad, se puede llevar a cabo esta modalidad, en la que la magnitud y sentido del EOF debe manipularse adecuadamente con objeto de llevar a cabo la preconcentración por LVSS sin cambio en la polaridad. Para aniones, el EOF debe ser reducido o debería ser menor que la velocidad electroforética de la muestra. Por ejemplo, es posible usar un aditivo (surfactante catiónico, etc.) que se añade a un tampón neutro o de bajo pH. Para cationes, además de reducir el EOF, el sentido de éste debe invertirse. Esto puede conseguirse usando un tampón de bajo pH que contenga una baja concentración de surfactante catiónico o usando capilares recubiertos especialmente.

Las etapas para el LVSS sin cambio de polaridad para aniones serían: (A) Situación inicial, inyección de la muestra preparada en disolvente de baja conductividad y aplicación de voltaje a polaridad negativa para focalizar zonas y eliminar la matriz de la muestra; (B) los aniones se focalizan completamente y la mayoría de la matriz se elimina, el voltaje se retiene hasta que la velocidad del EOF es menor que la velocidad electroforética de los aniones; (C) separación y posterior detección de zonas focalizadas.

3.2. DETECCIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para llevar a cabo el acoplamiento de una técnica que trabaja en fase líquida, como es la CE, con un espectrómetro de masas, en el que las sustancias a analizar deben encontrarse en fase gaseosa es necesario una interfase adecuada que haga ambas técnicas compatibles. Además, este acoplamiento debe solucionar un segundo inconveniente como es el cierre del circuito eléctrico aplicado en cualquier sistema de CE. En la Figura 17 se muestra un esquema general del acoplamiento CEMS en el que se observa la entrada de muestra a través de un equipo de CE, las diferentes fuentes de ionización

posibles, los analizadores de que se disponen actualmente y los tipos de detectores [71,72].

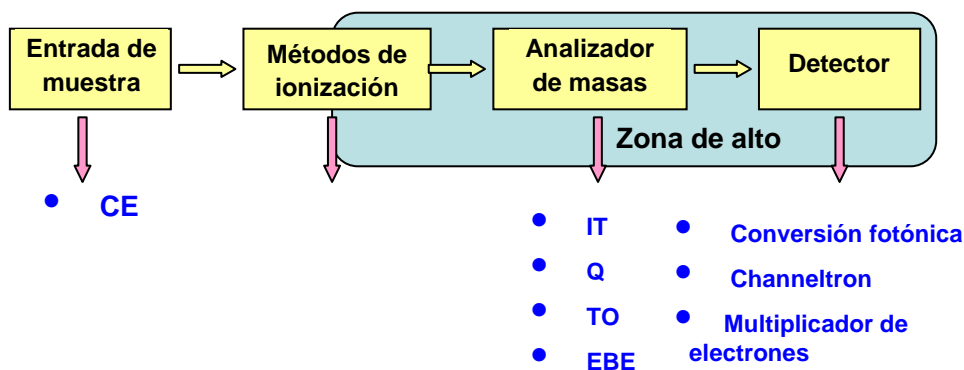


Figura 17. Esquema global del acoplamiento CE-MS.

En este sentido, los principales avances instrumentales acaecidos en los últimos años, además de los sofisticados analizadores de masas, se han centrado en el desarrollo de métodos de ionización y procedimientos metodológicos para el acoplamiento directo de ambas técnicas [73,74,75,76,77].

[71] J. Hernández Borges, C. Simó, A. Cifuentes, *Cromatografía y Técnicas Afines* 24 (2003) 45.

[72] I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi. *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Chichester, 2006, Capítulo 1.

[73] K.B. Tomer, L.J. Deterding, C.E. Parker, en *High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques and Applications*, M.G. Khaledi (Ed.), John Wiley & Sons, New York 1998.

[74] E. Gelpi, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 241.

[75] A. Brocke, G. Nicholson, E. Bayer, *Electrophoresis* 22 (2001)1251.

[76] K.B. Tomer, *Chem. Rev.* 101 (2001) 297.

[77] C.W. Klampfl, *Electrophoresis* 27 (2006) 3.

3.2.1. MÉTODOS DE IONIZACIÓN

Entre los métodos de ionización desarrollados para facilitar la transferencia de los analitos de la fase líquida obtenida en CE a la fase gaseosa requerida en MS se han usado el ICP, fundamentalmente usado para átomos metálicos y algunos no metálicos, la de flujo continuo y bombardeo con átomos rápidos [78] (*Continuous Flow-Fast Atom Bombardement*, CF-FAB), la ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI), la ionización química a presión atmosférica [79] (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), o la de ionización-desorción por láser asistida por una matriz [80,81] (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), usada fundamentalmente en acoplamientos CE-MS *offline* recogiendo las fracciones procedentes de la columna capilar. Estos desarrollos han favorecido la aplicación de CE-MS como una alternativa real a HPLC-MS para el análisis de compuestos polares y cargados. La naturaleza de los compuestos analizados es cada vez más variada, desde iones inorgánicos a pequeñas moléculas o biomoléculas de elevada masa molecular [82], incluyendo aminoácidos, péptidos y proteínas [83,84,85], ácidos nucleicos [86], carbohidratos [87], fármacos [88,89,90,91,], plaguicidas

[78] M.A. Moseley, L.J. Deterding, K.B. Tomer, J.B. Jorgenson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3 (1989) 87.

[79] Y. Tanaka, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1889.

[80] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4785.

[81] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, E. Moskovets, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 17.

[82] J. Hernández-Borges, C. Neusüß, A. Cifuentes, M. Pelzing, *Electrophoresis* 25 (2004) 2257.

[83] M. Moini, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 466.

[84] H. Hanno, *Electrophoresis* 26 (2005) 1254.

[85] M.R.N. Monton, S. Terabe. *Anal. Sci.* 21 (2005) 5.

[86] A.V. Willems, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, J.F. Van Bocxlaer, *Electrophoresis* 26 (2005) 1221.

[87] C. Campa, A. Coslovi, A. Flamigni, M. Rosi, *Electrophoresis* 27 (2006) 2027.

[88] L. Geiser, S. Rudaz, J.L. Vetheuy, *Electrophoresis* 24 (2003) 3049.

[89] U.L. Peri-Okonny, E. Kenndler, R. John Stubbs, N.A. Guzman, *Electrophoresis* 24 (2003) 139.

[71,92,93,94,95,96,97], antibióticos [98,99,100,101,102,103], metabolitos y biomarcadores para diagnóstico clínico [104,105,106], aplicaciones en análisis de alimentos [107, 108, 109] o medioambiental [109], en proteómica [110], en análisis clínico y forense [111], etc.

El método de ionización más utilizado en la actualidad es la ESI ya que además de permitir la transferencia directa de los compuestos desde el capilar de separación hasta el espectrómetro de masas, permite un análisis eficaz de compuestos polares lábiles y/o compuestos con una elevada masa molecular, siendo sensible, fácil de implementar y mostrando un extenso intervalo de

- [90] C.W. Huck, G. Stecher, H. Scherz, G. Bonn, *Electrophoresis* 26 (2005) 1319.
[91] W.F. Smyth, *Electrophoresis* 27 (2006) 2051.
[92] R. Rodríguez, J. Manes, Y. Picó, *Anal. Chem.* 75 (2003) 452.
[93] V. Andreu, Y. Picó, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 772.
[94] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 25 (2004) 2065.
[95] H. Safarpour, R. Asiaie, S. Katz, *J. Chromatog. A* 1036 (2004) 217.
[96] S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida, *J. Chromatog. A* 1051 (2004) 297.
[97] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 948.
[98] J. McCourt, G. Bordin, A. Rosa Rodríguez, *J. Chromatog. A* 990 (2003) 259.
[99] B. Santos, A. Lista, B.M. Simonet, B.M., A. Rios, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 26 (2005) 1567.
[100] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés Barrero, J.M. Bosque Sendra, L.E. García-Ayuso, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7665.
[101] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *Electrophoresis* 27 (2006) 2240.
[102] J.J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, *Electrophoresis* 28 (2007) 4164.
[103] G. Font, A. Juan-García, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 233.
[104] P. Senk, L. Kozak, F. Foret, *Electrophoresis* 25 (2004) 1447.
[105] K. Walter, C. Neusüß, M. Pelzing, *Mass Spectrometry Reviews* 24 (2005) 959.
[106] A.C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, *Electrophoresis* 27 (2006) 2616.
[107] C. Simó, C. Barbas, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 26 (2005) 1306.
[108] L.M. Ravelo-Pérez, M. Asensio Ramos, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, *Electrophoresis* 30 (2009) 1.
[109] V. Rodríguez-Robledo, F.W. Franklin, *Electrophoresis* 30 (2009) 1.
[110] D.C. Simpson, R.D. Smith, *Electrophoresis* 26 (2005) 1291.
[111] F.W. Franklin, P. Brooks, *Electrophoresis* 25 (2004) 1413.

aplicaciones. Este método de ionización es el que más se aproxima a las características ideales para el acoplamiento CE-MS [112], que pueden enumerarse como: a) sensible, preciso y de respuesta lineal; b) que mantenga la eficacia de la separación y la resolución; c) que mantenga la corriente eléctrica a través del capilar de separación; d) compatible con las sustancias que eluyen del capilar; y e) que proporcione una ionización eficaz a partir de los flujos tan pequeños que provienen del capilar de separación (nL/min). No obstante, existen ciertas dificultades que deben superarse, como la incompatibilidad de algunas sustancias que pueden usarse en los electrolitos tampón en CE. Considerando que es el modo más utilizado y que es el aplicado en esta Memoria, nos centraremos en la descripción de este modo de ionización y en las interfases para su acoplamiento a CE-MS.

A) Ionización por electrospray (ESI)

El ESI es una técnica de ionización suave en la cual los iones de la muestra procedentes de la disolución a la salida del capilar de separación son transferidos desde una fase condensada a fase gaseosa. Su aplicación en MS fue desarrollada principalmente por Yamashita y Fenn [113,114], obteniendo este último el Premio Nobel de Química por estos avances en el año 2002. Para la generación del electrospray se establece inicialmente una diferencia de potencial entre el final del capilar de separación y la entrada al espectrómetro de masas, aproximadamente de entre $\pm 2-6$ kV. La muestra procedente del capilar de separación, y con la ayuda de un gas nebulizador, se transforma en una nube de gotas cargadas y dispersas que son sometidas a un gradiente de

[112] J.C. Servers, R.D. Smith, en *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, R.B. Cole (Ed.), John Wiley & Sons, Nueva York 1997.

[113] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451.

[114] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4671.

potencial antes de llegar al espectrómetro de masas. El disolvente se va evaporando de las microgotas formadas, lo que se favorece mediante la aplicación de un flujo de gas “de secado” (nitrógeno caliente) en la cámara de ionización y estas van aumentando su densidad de carga eléctrica, de modo que los iones de la misma polaridad son atraídos hacia la superficie de la microgota debido al campo eléctrico aplicado entre la salida del capilar y la entrada al equipo MS. Al mismo tiempo, las microgotas se van dividiendo en otras aún más pequeñas debido a las repulsiones electrostáticas que se producen entre ellas (explosiones de Coulomb). Así, los iones pasan a la fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas debido al voltaje aplicado. Si este potencial es positivo, entrarán al equipo MS los iones negativos presentes en la disolución que sale del capilar. Por el contrario, si se aplica un potencial negativo, entrarán al sistema los iones positivos. Al final del proceso se obtienen iones mono- o multicargados, que son transferidos al sistema óptico del espectrómetro de masas, zona en la que los iones son transportados al analizador de masas y posteriormente al detector. Esquemáticamente el proceso se representa en la Figura 18.

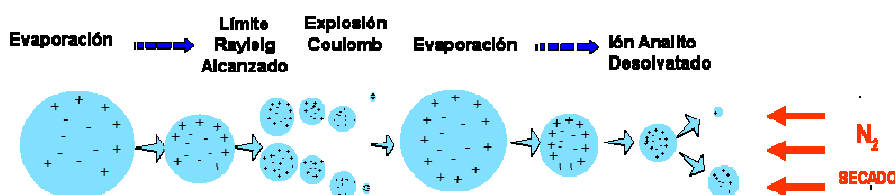


Figura 18. Proceso de ionización por ESI.

El hecho de que sea posible la producción de iones multicargados ha potenciado el éxito de esta técnica en el ámbito de los acoplamientos de las

técnicas separativas en fase líquida con la MS. Un incremento en el número de cargas en una molécula disminuiría el valor de su relación m/z , que es el parámetro utilizado para el análisis en MS. Así, mediante la detección de iones multicargados se pueden detectar compuestos con pesos moleculares muy altos empleando analizadores de masas que trabajan con un intervalo limitado de valores m/z .

La ionización puede realizarse en modo positivo (ESI +) o en modo negativo (ESI-). En el primer caso se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]n+$, siendo n el número de protones cargados positivamente en la molécula. Igualmente pueden formarse aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En modo ESI- se produce normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar iones $[M-nH]n-$.

En este tipo de acoplamiento se plantean diversos problemas para compatibilizar ambas técnicas. Estos se pueden concretar en los siguientes apartados [115]:

- i) Incompatibilidad del flujo procedente del capilar de separación (de hasta 100 nl min⁻¹) con el flujo necesario para la formación de un electrospray estable (1-200 µl min⁻²). Existen diferentes metodologías para compatibilizar ambos flujos, una de ellas implica el uso de un flujo adicional y otra el uso de interfases micro- o nano-ESI en las que se pueden usar los flujos extremadamente bajos característicos de CE.
- ii) Necesidad de mantener el circuito eléctrico que se requiere para llevar a cabo la separación en CE y que se establece entre los extremos del capilar al aplicar la diferencia de potencial.
- iii) Compatibilidad de los diferentes modos de CE con el espectrómetro de masas, ya que en función de éstos podría ser necesario el empleo de

[115] C. Simó, A. Cifuentes, en *Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección*, A. Fernández Gutierrez, A. Segura Carretero (Eds.), Editorial Universidad de Granada, 2006, Capítulo 12.

sustancias poco compatibles con ESI (tales como iones borato, fosfato, surfactantes, ciclodextrinas, etc.) los cuales, por su limitada volatilidad contribuirían de forma significativa al incremento del ruido de fondo en la detección por MS, empeorando la sensibilidad y llegando incluso a contaminar u obstruir el detector.

Estas dificultades han sido solventadas mediante el desarrollo de diferentes interfases que tienen como objetivo la formación de un electrospray estable y el mantenimiento de la corriente eléctrica en el interior del capilar. Así, es posible distinguir entre: interfase coaxial con flujo adicional, interfase sin flujo adicional e interfase de unión líquida. Las características fundamentales de cada una de ellas se muestran en la Tabla 5.

Desde su primera aplicación [116], la interfase coaxial con flujo adicional es la más utilizada para llevar a cabo el acoplamiento CE-MS, siendo la aplicada en los métodos CE-MS desarrollados en esta Memoria. Esta interfase está formada por tres tubos concéntricos: el capilar de separación, que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que se hace fluir el líquido adicional (*"sheath liquid"*) y un tercer tubo por el cual se introduce el gas nebulizador, normalmente nitrógeno, que favorece la formación del electrospray. Estos tres tubos concéntricos están situados en la cámara de nebulización, la cual se encuentra a una temperatura generalmente comprendida entre 100 y 350 °C. En la Figura 19 se muestra un esquema de esta interfase CE-ESI-MS. El flujo adicional que se hace pasar por el tubo metálico que rodea el capilar cierra el circuito eléctrico necesario durante la separación por CE, al establecer el contacto eléctrico entre el electrodo situado en el vial de entrada, el capilar y el tubo de acero inoxidable que hace de electrodo de salida. Este tubo metálico sirve además para definir la diferencia

[116] R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, H.R. Udseth, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948.

de potencial entre la salida del capilar y el electrodo que se encuentra a la entrada del espectrómetro de masas. Con el flujo adicional además se consigue aumentar el flujo necesario para que la interfase ESI funcione de modo adecuado originando un electrospray estable, ya que aumenta el flujo con el que típicamente se trabaja en la separación por CE, obteniéndose flujos del orden de los mL/min.

Tabla 5. *Tipos de interfases en el acoplamiento CE-MS. Características fundamentales [115].*

Tipo de Interfase	Contacto eléctrico con CE	Spray	Ventajas	Limitaciones
Sin flujo adicional	Recubrimiento conductor. Electrodo en el capilar de separación	Del capilar de separación (0-100 nL/min, nano-ESI)	Alta sensibilidad	Menos estable (recubrimiento inestable, obstrucción, etc.). Dependiente del EOF
Con flujo adicional	Líquido adicional	Líquido adicional (1-6 μ L/min)	Disponible comercialmente. Spray estable. Independiente del EOF (electrolito CE)	Baja sensibilidad
Unión líquida	Depósito con electrolito de separación entre el capilar de separación y el de transferencia	Del capilar de transferencia (nano-ESI)	Alta sensibilidad. Independiente del EOF. Más estable que ESI sin flujo adicional	Ensanchamiento de los picos. Menos estable que ESI con flujo adicional (Obstrucción del capilar de transferencia, etc.)

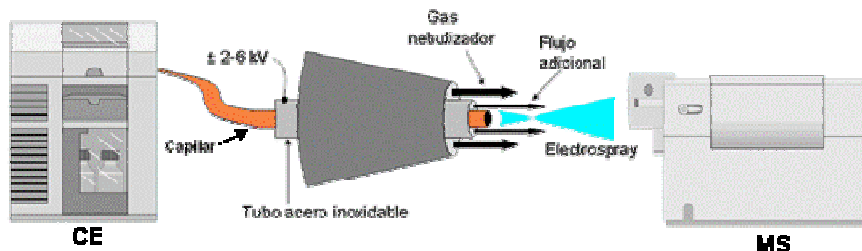


Figura 19. Esquema de la interfase ESI con flujo adicional.

Esta interfase es robusta, disponible comercialmente y de fácil uso aunque muestra ciertas limitaciones, fundamentalmente basadas en la disminución de sensibilidad debido a la dilución de la muestra por el líquido adicional. Para conseguir un óptimo acoplamiento CE-MS con este tipo de interfase que permita una satisfactoria cuantificación, es necesario considerar ciertos aspectos experimentales y variables a optimizar [56,115]:

- i) El capilar debe sobresalir con respecto al tubo concéntrico que lo rodea un tercio aproximadamente de su diámetro externo (por ejemplo, para un capilar de 360 μm de diámetro externo deberá sobresalir 120 μm).
- ii) El flujo adicional debe ser suficientemente conductor como para cerrar el circuito eléctrico con el interior del capilar de separación, pero con fuerza iónica no demasiado elevada para evitar descargas en la fuente de ionización. Además, concentraciones relativamente altas de tampón o flujo adicional pueden empeorar la detección por MS, ya que se produciría fundamentalmente la ionización en fase gaseosa de estas especies,

desplazando a los compuesto de interés o incluso originando la obstrucción de la interfase o del tubo de entrada al espectrómetro de masas.

- iii) El flujo adicional debe contener un porcentaje alto de disolvente orgánico (usualmente valores iguales o superiores al 50 %) y una pequeña cantidad de ácido o base para mejorar la ionización de las sustancias en estudio, en función de que se trabaje con ESI+ o ESI-. La optimización de este flujo adicional implica la elección de la cantidad y tipo de disolvente orgánico, pH y contenido salino. Normalmente se utilizan como disolventes orgánicos isopropanol o MeOH, en proporción 1:1 con agua. Es preferible el uso de isopropanol que de MeOH debido a su mayor eficacia en la ionización y sobre todo a la menor cantidad de impurezas. Un mayor contenido en disolvente orgánico puede incrementar la sensibilidad pero podría reducir la estabilidad del spray debido a la baja conductividad. Además, una baja cantidad de ácido volátil (normalmente ácido fórmico o ácido acético) ayuda a estabilizar el spray así como la corriente CE y además incrementa la eficacia de la ionización en modo positivo. Para el modo negativo se suele añadir una pequeña concentración de amoniaco.
- iv) Los flujos de líquido adicional y de gas nebulizador deben mantenerse en valores suficientemente bajos como para permitir un electrospray estable, evitando la generación del efecto de succión o excesiva dilución de los analitos, pero no excesivamente bajos como para producir inestabilidad del spray o ensanchamiento de picos.
- v) La presión del gas nebulizador tiene una importante influencia sobre la resolución y el tiempo de migración debido al efecto de succión. Así, deberían aplicarse valores bajos para conseguir condiciones estables, por ejemplo, previniendo la entrada de aire en el capilar durante el proceso de inyección y para evitar la pérdida de resolución. Esto es de gran interés cuando se utilizan disolventes no acuosos de baja viscosidad (por ejemplo ACN) o capilares cortos y anchos. De otro modo, una alta presión del gas

nebulizador puede influenciar positiva o negativamente en la formación del spray y en los perfiles de flujo en la cámara de spray, lo que potencialmente modifica la sensibilidad. De este modo, esta variable debe ser cuidadosamente optimizada con objeto de conseguir resultados reproducibles y de adecuada sensibilidad.

- vi) Otros parámetros como el flujo del gas de secado, la temperatura o el potencial ESI pueden ser igualmente optimizados aunque parecen ejercer una influencia menor sobre la estabilidad y sensibilidad.

3.2.2. ANALIZADORES DE MASAS

Una vez que se ha llevado a cabo la transferencia de los iones procedentes del capilar desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones se dirigen hacia el analizador de masas, que permite la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con alto grado de sensibilidad y selectividad, proporcionando información sobre la masa molecular. Existe una amplia variedad de equipos de MS que pueden ser utilizados en los acoplamientos CE-MS: los cuadrupolos (Q), las trampas de iones (IT), los sectores magnéticos (EBE), los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) o analizadores más complejos formados por combinación de los anteriores (q-TOF, IT-TOF o triple cuadrupolo (QqQ)). En la Tabla 6 se muestra una clasificación de estos analizadores en función de sus características.

Tabla 6. Comparación de los analizadores de masas usados en CE-MS.

Analizador	Rapidez de barrido	Sensibilidad Full scan (SIM)	Resolución	MS/MS	Cuantificación	Precio
Q	-	-(+)	0	-	+	Bajo
QqQ	-	-(+)	+	+	++	Alto
IT	+	+	+	++	+	Medio
TOF	++	+	++	(+)	+	Alto

El analizador IT (empleado en esta Memoria) es actualmente uno de los más usados en los acoplamientos CEM-MS, debido a su coste y fundamentalmente a la velocidad de barrido y a la posibilidad de realizar fragmentaciones sucesivas de los iones seleccionados, dando lugar a espectros MS_n, aunque la sensibilidad y la resolución no es la mejor. Este analizador consiste básicamente en un electrodo anular y dos electrodos laterales que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones, siendo los tres electrodos de geometría hiperbólica. Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro del analizador se puede llevar a cabo, en función del objetivo del análisis, tanto el análisis de las masas como el aislamiento de un ión precursor y la posterior fragmentación de este ión. Para llevar a cabo la determinación de todas las especies que entran o se forman en la trampa, se somete a los iones confinados a una rampa lineal de RF, de modo que son progresivamente expulsados como resultado de desestabilizaciones de la órbita que mantienen dentro de la trampa. Una vez que estos iones pasan al detector, la señal se procesa y da lugar a un espectro de masas. El espectro de masas constituye la representación gráfica de la abundancia relativa de los iones producidos en función de su relación m/z . Debido a que el flujo procedente del capilar de separación es continuo, se están continuamente registrando espectros de masas a intervalos de tiempo definidos. El conjunto de espectros de masas es lo que conforma el electroferograma de la separación.

3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

En los últimos años, para incrementar la eficacia de la separación, la sensibilidad de la detección y disminuir los tiempos de análisis con columnas convencionales de HPLC, se ha reducido el diámetro interno de las columnas así como el tamaño de partícula del material de empaquetamiento.

Considerando la ecuación de van Deemter, esta reducción produce una contribución menor del coeficiente de difusión de Eddy y de la transferencia de masa de la fase móvil (término A), así como una disminución en la longitud de los caminos de difusión (término C).

Ecuación de van Deemter: $H = A + (B/u) + Cu$
 $A = \lambda dp$ $B = \gamma DM$ $C = C_s + C_M$
Siendo: H, altura equivalente de plato teórico; A, término de difusión de Eddy y caminos desiguales; λ , constante que considera el intervalo de tamaño de partícula, la uniformidad del empaquetamiento y las dimensiones y geometría de la columna; dp, tamaño de partícula de la fase estacionaria; B, término de difusión longitudinal; γ , factor de obstáculo dependiente de las características del empaquetamiento; DM, difusión en la fase móvil; u; velocidad lineal de la fase móvil; C; término de resistencia a la transferencia de masa que engloba la difusión en la fase estacionaria (C_s), relacionada directamente con el espesor de la película de fase estacionaria, y la difusión en la fase móvil (C_M), directamente proporcional al diámetro de las partículas.

Como se puede observar en la ecuación anterior, la reducción del tamaño de partícula puede producir mayor eficacia de la columna por la disminución de la altura equivalente de plato teórico, y en consecuencia, del incremento del número de platos para una longitud determinada. Sin embargo, debido a los elevados gradientes de presión, no se han obtenido buenos resultados con partículas de tamaño inferior a 3 μm , por lo que ha sido necesario llegar a un compromiso entre la eficacia y caída de presión mediante el ajuste del tamaño de partícula, normalmente 3-5 μm , y de la longitud de la columna [117].

[117] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1275.

Para evitar el problema de la elevada sobrepresión con partículas pequeñas, también se han utilizado técnicas como CEC con flujo electroosmótico, cromatografía con columnas tubulares abiertas, con columnas a temperaturas elevadas y cromatografía de líquidos a alta presión (UHPLC). Esta última, ha permitido mejorar la eficacia y reducir los tiempos de análisis en columnas empaquetadas con partículas no porosas de sílice-ODS de 1.5 y 2.0 μm , trabajando a presiones de hasta 60000 psi [118, 119].

Por otro lado, los importantes avances que han tenido lugar en las tecnologías de fabricación de columnas, han permitido el desarrollo de columnas micro y capilares que respecto a las convencionales de diámetro interno 4.6 mm ofrecen considerables ventajas. Así, la combinación de columnas capilares y células de flujo de nanovolumen con gradiente de elución y temperatura, han permitido desarrollar sistemas de cromatografía líquida capilar de alta resolución, que presentan límites de detección comparables a los obtenidos mediante cromatografía de gases capilar.

La introducción de micro-columnas o columnas capilares en HPLC, término que se utiliza en general para referir columnas de pequeño diámetro, se debe a Horváth y col., quienes utilizaron en el año 1967 columnas empaquetadas de diámetro interno comprendido entre 0.5 y 1.0 mm para la separación de ribonucleótidos [120]. En la últimas dos décadas, la automatización y la miniaturización han sido muy importantes en el desarrollo de la cromatografía líquida, y en función del diámetro interno de la columna y de los caudales utilizados, las técnicas de HPLC se han clasificado en diversas categorías [36]. La terminología actualmente usada se muestra en la Tabla 7.

[118] J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 69 (1997) 983.

[119] J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 71 (1999) 700.

[120] J. P. C. Vissers, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1.

Tabla 7. Terminología usada en técnicas de cromatografía líquida

Nombre	Diámetro interno de la columna	Velocidad de flujo	Tamaño de partícula (µm)	Longitud (cm)
HPLC convencional	3.2-4.6 mm	0.5-2.0 mL/min	3-10	3-25
HPLC microbore	1.5-3.2 mm	100-500 µL/min	3-8	15-25
Micro-LC	0.5-1.5 mm	10-100 µL/min	3-5	5-15
LC capilar	150-500 µm	1-10 µL/min	3-5	5-15
Nano-LC	10-150 µm	10-1000 nL/min	3-5	5-15

Debido al diámetro interno reducido, los caudales de fase móvil utilizados con micro-columnas son muy pequeños, lo que produce una disminución considerable del consumo de reactivos y disolventes, y por ello de los desechos generados y del impacto medioambiental [121]

Además, por su posibilidad de trabajar con pequeños volúmenes de muestra y su reducida dilución cromatográfica [122], poseen una excelente capacidad de acoplamiento directo a técnicas de detección como la resonancia magnética nuclear, la espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier y la MS, que requiere la eliminación previa del disolvente [123]. En comparación con los sistemas convencionales de HPLC, este tipo de técnicas mejoran la detección y permiten obtener eficacias de separación elevadas.

[121] A. Braithwaite, F. J. Smith, *Chromatographic Methods*, 5th Edition, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996), p. 1.

[122] Y. Gou, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2774.

[123] T. Andersen, P. Molander, R. Trones, D. R. Hegna, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 221.

Teóricamente, el uso de micro-columnas aumenta la velocidad de la separación por la mayor velocidad lineal de la fase móvil. Estas mejoras cinéticas, junto con el pequeño caudal de fase móvil, permiten reducir la sobrepresión, conectar columnas en serie y conseguir eficacias de hasta 105-107 platos teóricos, que permiten la resolución de mezclas complejas. Por otra parte, el pequeño volumen en el que se eluyen los analitos proporciona mayor sensibilidad y mejoras de hasta 20 órdenes de magnitud en la respuesta del detector [121]. De acuerdo con el factor teórico de disminución de escala, las sensibilidades se pueden incrementar del orden de 200 veces en detectores másicos, al reducir el diámetro interno de la columna de 4.6 mm a 320 μm [120], de forma que las micro-columnas han sido muy utilizadas para aumentar la sensibilidad de la detección y la resolución cuando el volumen de muestra disponible para la inyección es limitado o los compuestos a determinar se encuentran presentes a bajas concentraciones en las distintas muestras [124].

3.3.1. COLUMNAS

La estabilidad de las columnas miniaturizadas y su vida media están afectadas por la estabilidad del empaquetamiento y de las fritas de retención. Además de las columnas capilares empaquetadas con las mismas fases típicas de cromatografía de líquidos convencional, se han utilizado columnas capilares tubulares abiertas con diámetros internos menores de 15 μm , donde la fase estacionaria se encuentra soportada en la pared interior de la columna. Teóricamente, las columnas tubulares abiertas poseen la geometría más adecuada para llevar a cabo separaciones mediante cromatografía de líquidos, permiten obtener eficacias elevadas en la resolución de mezclas complejas [125]

[124] P. Molander, A. Tomasen, L. Kristoffersen, T. Greibrokk, E. Lundanes, *J.Chromatogr. B* 766 (2002) 77.

[125] J. C. Kraak, *Pure & Appl. Chem.* 69 (1997) 157.

tiempos aceptables de análisis, ya que sus características favorables de flujo aumentan la velocidad de separación.

En este tipo de columnas la síntesis de la película de fase estacionaria en la pared interna del capilar resulta especialmente crítica. De esta forma, para conseguir materiales con suficiente retención y capacidad de carga se han utilizado procedimientos estáticos, de creación de estructuras porosas en el interior del capilar y de inmovilización química de una monocapa o una fase estacionaria polimérica.

Utilizando procedimientos con una fase inicial térmica de polimerización in situ, se han preparado películas de polimetacrilato enlazadas a un capilar de sílice fundida de 25 μm , cuya selectividad se puede ajustar con la concentración de monómero y entrecruzante, así como a través de los grupos funcionales incorporados en la matriz polimérica, lo que permite fabricar fases estacionarias para separaciones iónicas, quirales o de afinidad [126]. Sin embargo, las fases estacionarias enlazadas químicamente a la pared interna del capilar, presentan relaciones de fase muy bajas que conducen a retenciones pobres, y aunque las fases poliméricas, como los polisiloxanos y poliacrilatos entrecruzados proporcionan fases estacionarias estables, con elevada relación de fases y suficiente retención, suelen presentar baja eficacia debido a la lenta difusión de los solutos. Alternativamente, empleando un material híbrido de vidrio orgánico-inorgánico fabricado mediante el proceso sol-gel, se han preparado fases estacionarias en una sola etapa que combina la síntesis de una fase enlazada y una matriz de vidrio porosa, que han aumentado el área superficial de la columna capilar (13 μm I.D) y por ello la relación de fases [127].

[126] Z. J. Tan, V. T. Remcho, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 99.

[127] Y. Quo, L. A. Colón, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2511.

3.3.2. ENSANCHAMIENTO DE BANDA EXTRACOLUMNA

Puesto que el volumen de elución de los analitos se encuentra relacionado con el cuadrado del diámetro de la columna, el efecto de los parámetros que contribuyen al ensanchamiento de banda puede ser mayor con columnas de diámetro interno reducido y con volúmenes pequeños de inyección [128] Así, las columnas capilares empaquetadas son muy sensibles a los volúmenes muertos de las válvulas de inyección, de los tubos de conexión y de las células de flujo de detección, lo que implica necesariamente un control crítico de los procesos de ensanchamiento de banda para conseguir resoluciones y eficacias adecuadas [129].

La eficacia total de un sistema cromatográfico es función de la eficacia de la columna y de la contribución instrumental al ensanchamiento de banda. Considerando que todas las contribuciones a la variancia de pico son independientes, la variancia total (σ_2 tot) se puede expresar como suma de las siguientes contribuciones:

$$\sigma_2 \text{ tot} = \sigma_{2\text{col}} + \sigma_{2\text{cap}} + \sigma_{2\text{inj}} + \sigma_{2\text{det}} + \sigma_{2\text{otros}}$$

siendo: $\sigma_{2\text{col}}$, variancia de la columna; $\sigma_{2\text{cap}}$, variancia originada por los capilares de conexión; $\sigma_{2\text{inj}}$, variancia del volumen y del proceso de inyección; $\sigma_{2\text{det}}$, variancia producida por el volumen de la célula del detector y las contribuciones de su tiempo de respuesta; $\sigma_{2\text{otros}}$, contribuciones producidas por otros componentes como por ejemplo las uniones del sistema.

Para calcular el ensanchamiento de banda extracolumna se han utilizado diversos procedimientos como el acoplamiento directo sin columna entre el dispositivo de inyección y detección o el método de extrapolación lineal con columna, que basado en la correlación entre las varianzas de los picos y los

[128] A. Prüß, C. Kempter, T. Jira, J. Gysler, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 129.

[129] J. P. C. Vissers, A. H. de Ru, M. Ursem, J. P. Chervet, *J. Chromatogr. A* 746 (1996) 1.

factores de capacidad de una serie homóloga, tiene en cuenta la contribución de las fritas y el perfil del flujo a la entrada y salida de la columna. También se ha utilizado la medida de la dispersión del volumen inyectado de muestra con fotodiodos colocados a lo largo de una columna transparente, procedimiento que no es aplicable con la mayoría de las columnas de HPLC [128].

Estudios recientes, han demostrado que el ensanchamiento de banda en algunos sistemas capilares comerciales modificados es del mismo orden que en los sistemas convencionales de HPLC, aunque en columnas capilares, la influencia en la eficacia por cambios en la densidad del empaquetamiento cerca de la pared de la columna es más importante, debido a la mayor proporción de partículas cerca de la región central y de la pared [130]. Por otra parte, y puesto que los capilares utilizados para la conexión de la columna con el detector y el inyector pueden contribuir de forma considerable a la dispersión, su diámetro y longitud se debe elegir cuidadosamente, considerando la limitación de sobrepresión del sistema. Así, para caudales de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ se ha recomendado la utilización de capilares de 50 μm de diámetro interno, y en general, conexiones de volumen muerto cero que eviten el ensanchamiento de banda adicional y la pérdida de resolución. Puesto que el diámetro interno del bucle de inyección también contribuye a la dispersión de la muestra, Vissers y col. han sugerido un valor óptimo de 100 μm [130].

4. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Tras 70 años de uso clínico, los antibióticos β -lactámicos son los antimicrobianos más prescritos tanto en atención primaria como en hospitales, además de medicina veterinaria. A pesar de que no se dispone de ningún β -

[130] A. Prűß, C. Kempter, J. Gysler, T. Jira, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 167.

lactámico realmente nuevo desde hace más de dos décadas, el aumento incesante de las resistencias y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares han condicionado la existencia de una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos.

Los **antibióticos β -lactámicos** son compuestos muy útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, debido a su escasa toxicidad y amplio espectro de actividad. Todos comparten una estructura común, ya que están formados por un anillo β -lactámico constituido por cuatro átomos de carbono. Igualmente poseen un mismo mecanismo de acción: producen la inhibición de la síntesis de peptidoglucanos de la pared bacteriana [131].

Como se muestra en la figura 6, cuando la bacteria crece en presencia del antibiótico se produce el daño en la pared bacteriana y un sobrecrecimiento anómalo de la misma además de una menor división celular.

Su acción es principalmente bactericida y su efecto es lento y dependiente del tiempo. La mayoría de los antibióticos β -lactámicos se eliminan, sin cambios, a través del riñón, por ello están indicados en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario.



Figura 6. La foto de la izquierda muestra un cultivo de la bacteria *Bacillus cereus* en ausencia de antibiótico β -lactámico. A la derecha se muestra un cultivo de la misma bacteria en presencia del antibiótico

[131] K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* 490 (1989) 101.

Poseen un alto margen terapéutico, siendo el principal efecto adverso las reacciones alérgicas. Raramente producen anafilaxia. Se consideran seguros para su uso durante la gestación.

Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos, pero la progresiva aparición de microorganismos resistentes a éstas ha ido limitando su empleo y su eficacia en determinadas situaciones.

4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Todos los antibióticos β -lactámicos tienen un mecanismo de acción similar. Aunque éste no es completamente conocido, incluye: a) la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, que es esencial para la vida de la bacteria y b) la activación de sistemas autolíticos endógenos. Para ejercer su acción los β -lactámicos tienen que unirse a las proteínas fijadoras de penicilinas (PFP) con lo que se bloquea la síntesis del peptidoglicano o mureina, heteropolímero que constituye la estructura básica de la pared celular de las bacterias.

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (Gram negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (Gram positivos). Las penicilinas inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen estos antibióticos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados, a través de la membrana citoplasmática, al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas proteínas (**PBPs**, del inglés “*Penicillin Binding Proteins*”) fijan a las penicilinas y otros β -lactámicos. La función de las PBPs es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de las penicilinas poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (*D*-alanil-*D*-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa.

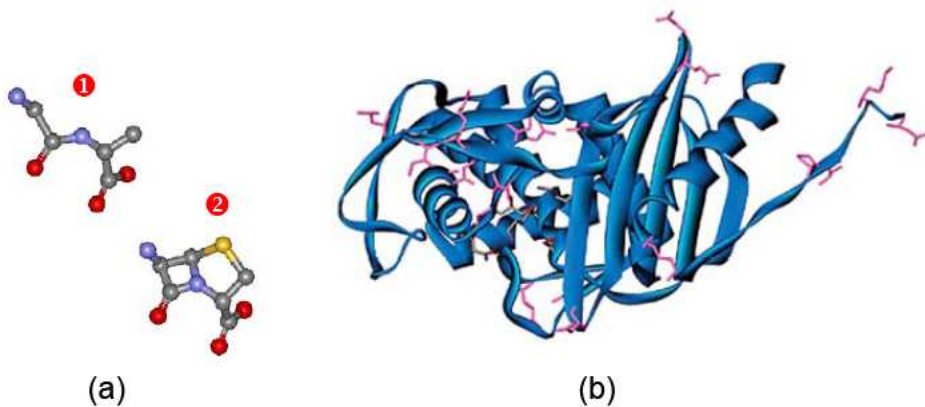


Figura 7. (a) Semejanza estructural entre el sistema β -lactámico (2) y la secuencia terminal *D*-alanil-*D*-alanina del peptidoglucano (1). (b) Estructura tridimensional de una proteína fijadora de penicilina (PBP).

Las penicilinas también activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas. **Son habitualmente bactericidas, destruyendo las bacterias que están en crecimiento activo, pero no a las que están en reposo.**

INTRODUCCIÓN

El péptidoglicano de todas las células bacterianas, es básicamente similar, aunque existen diferencias estructurales de este compuesto, entre gémenes Gram positivos y Gram negativos (Figura 8). En ambos tipos de microorganismos, la cadena macromolecular básica, consiste en N-acetilglucosamina, y alterna con su éter láctico, el ácido N-acetilmurámico. Cada unidad de ácido murámico, está unida a una pequeña cadena pentapeptídica, cuyo tercer aminoácido, es *L*-lisina en la mayoría de los cocos Gram positivos y ácido *M*-diaminopimélico en los bacilos Gram negativos. La pared celular (Figura 9) debe su rigidez y estabilidad a los enlaces cruzados entre este aminoácido y el penúltimo aminoácido de las cadenas adyacentes (el cual es siempre *D*-alanina).

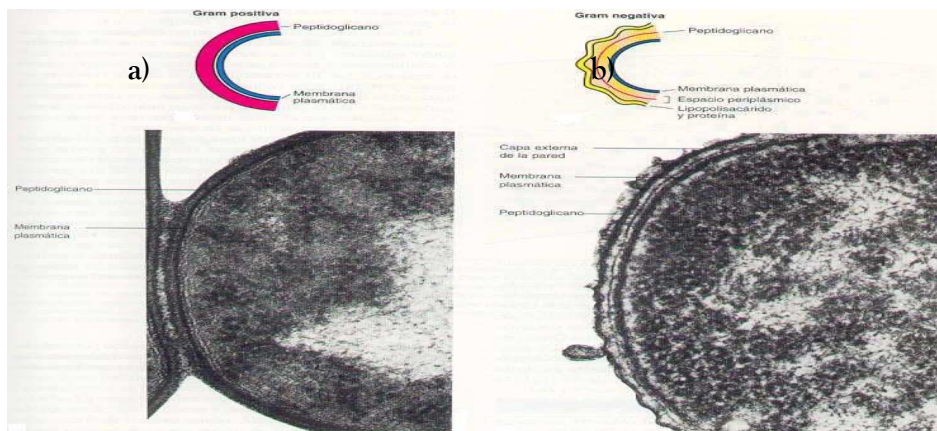


Figura 8. Esquema de las membranas celulares de bacterias Gram positiva (a) y Gram negativa (b) respectivamente.

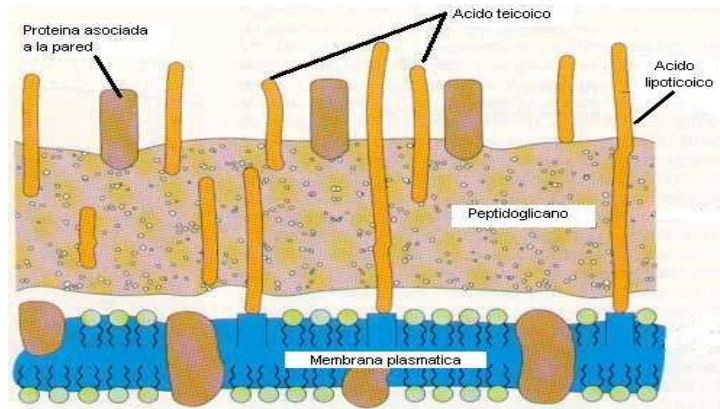


Figura 9. Detalle del peptidoglicano, constituyente de la pared celular.

Los bacilos Gram negativos, poseen una capa muy fina de peptidoglicano, con enlaces cruzados débiles, en contraste con los cocos Gram positivos, cuya capa de péptidoglicano es muy gruesa y sus puentes interpeptídicos están fuertemente enlazados. También se caracterizan las bacterias Gram positivas, por su alto contenido de fosfatos poliméricos de azúcares-alcoholes (ácidos teicoico y teicurónico), mientras que los Gram negativos están cubiertos por una envoltura externa que semeja una membrana compuesta de complejos lipopolisacáridos-lipoproteínas, la cual impide a muchos antibióticos penetrar la bacteria y alcanzar estructuras "diana" dentro de la célula.

El proceso de ensamblaje del péptidoglicano, es el punto de acción de diversos antibióticos en su acción terapéutica, los cuales inhiben o bloquean diversos pasos del proceso, como a continuación se detalla: El ácido N-acetilmurámico es un derivado de la N-acetilglucosamina por la adición de ácido láctico derivado del fosfoenolpirúvico, reacción ésta bloqueada por fosfomicina. Los primeros tres aminoácidos de la cadena pentapeptídica que se une al ácido murámico son añadidos secuencialmente, pero el terminal D-alanil D-alanina, se

añade como una sola unidad. Para formar esta unidad, la forma natural del aminoácido debe ser racemizada, paso catalizado por la enzima D-alanina sintetasa, que puede ser bloqueada por el antibiótico cicloserina. Inmediatamente que el complejo muramil-pentapéptido se forma en el citoplasma celular, pasa a unirse a una molécula transportadora de naturaleza lipídica situada en la membrana celular, allí se le adiciona una unidad de N-acetilglucosamina conjuntamente con el aminoácido necesario para formar el puente peptídico, entonces este armazón básico formado está listo para pasar a través de la membrana celular y completar la fase final del crecimiento de la macromolécula. Este transporte puede ser inhibido por los glicopéptidos teicoplanina y vancomicina. La molécula lipídica que sirve como vehículo es fosforilada en esta reacción y debe ser desfosforilada para recuperar su función de transporte, paso éste que es interferido por el antibiótico bacitracina. Finalmente las unidades del péptido preformadas se unen mediante enlaces cruzados para formar la macromolécula que le brinda estabilidad a la pared celular, este último paso puede ser abortado por las penicilinas y otros betalactámicos (Figura 9).

Los cocos Gram positivos y los bacilos Gram negativos y Gram positivos responden a las penicilinas de diferentes formas. En *Staphylococcus* expuestos a dosis superiores a la concentración inhibitoria mínima (CIM), se mantiene un ritmo normal de crecimiento hasta que la pared bacteriana está lo bastante debilitada y se destruye el microorganismo por lisis osmótica. La respuesta de una población bacteriana es heterogénea, muchas de las bacterias experimentan severos y extensos daños de la pared celular, pero otras sólo presentan pérdida de sustancia celular sin aparentar mayores lesiones. Las bacterias supervivientes a la exposición a la penicilina reanudan su crecimiento después de un período de inhibición o quietud al retirarse el antibiótico.

Concentraciones cercanas a la CIM detienen la división celular en bacilos Gram negativos pero continúa el crecimiento bacteriano con un ritmo cercano al normal de tal manera que los bacilos llegan a formar largos filamentos. En presencia de altas concentraciones del fármaco y en dependencia de la cepa bacteriana ocurre lisis celular espontánea, sin que sea posible distinguir ningún cambio morfológico evidente o puede ocurrir su transformación en esferoplastos, los cuales a veces son capaces de sobrevivir como formas celulares de pared deficiente o secundariamente lisarse en dependencia de la osmolaridad del medio u otros factores locales.

La variedad de estos cambios frente a las diversas penicilinas y dosis empleadas hizo pensar que podían existir otros puntos de acción de estos fármacos, y así en 1975 *Spratt* [132] demostró que las membranas aisladas de bacterias contienen cierto número de proteínas que son capaces de unirse a las penicilinas y otros β -lactámicos.

4.2. DESARROLLO Y ESTRUCTURA GENERAL DE LAS PENICILINAS

En este apartado nos centraremos específicamente en las penicilinas, ya que son los compuestos abordados en la presente Memoria. Aunque desde hace milenios el hombre usaba empíricamente en el tratamiento de heridas y otras enfermedades, tierra y vegetales que son fuentes de mohos y bacterias productores de antibióticos y ya en el siglo pasado varios investigadores hicieron notar la acción bactericida de diversos hongos, no es hasta 1928, con el descubrimiento fortuito en el St. Mary´s Hospital de Londres por Fleming de un hongo que contaminó y destruyó varios cultivos de *Staphylococcus*, que se inicia la

[132] B.G. Spratt, Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72 (1975) 2999.

era antibiótica en la medicina. Por tratarse de hongos del tipo *Penicillium Notatum*, Fleming llamó al compuesto que los producían *Penicilina*. No es hasta 10 años después, en 1938, cuando se logra desarrollar como agente terapéutico y sólo hacia 1941 es posible acumular suficiente compuesto como para iniciar ensayos clínicos en pacientes afectados de sepsis por *Streptococcus* y *Staphylococcus*. [133]

Desde 1942 se comienza la expansión y desarrollo del antibiótico en los Estados Unidos, se alcanzan grandes avances en su depuración y usos clínicos en estudios efectuados en la Universidad de Yale y en la Clínica Mayo: ya en 1943 se habían tratado 200 pacientes con el nuevo producto. Hacia 1950 se logra la producción masiva del fármaco en los Estados Unidos y se llega a 150 toneladas en ese año [134]. En la misma década se crea la primera penicilina semisintética, fenoximetilpenicilina y en 1959 se introduce la meticilina, primera de la generación antiestafilocócica. Hacia finales de los años 60 comienza a usarse la carbenicilina y así se da inicio a las penicilinas con propiedades antipseudomónicas y ya, desde 1984 se inicia el uso del ácido clavulánico asociado a las penicilinas, comenzando la era de los inhibidores de betalactamasas.

La estructura básica de las penicilinas está formada por un sistema cíclico β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico que origina el ácido 6-aminopenicilánico. Ésta estructura deriva de la condensación de una molécula de valina y otra de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. El propio núcleo de la penicilina es el elemento estructural fundamental para su actividad biológica; la transformación metabólica, o la alteración química, de esta parte de la molécula hacen que se pierda toda la acción bacteriana.

[133] G.L. Mandell, W.A. Petvi. *Agentes antimicrobianos penicilinas y cefalosporinas*. En: Goodman Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ªed. Mc GrawHill Interamericana, México DF, 1996, p. 1141.

[134] R. Cuesta, *Antimicrobianos betalactámicos. Manual de farmacología*. Segunda parte. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, 1988, p. 63.

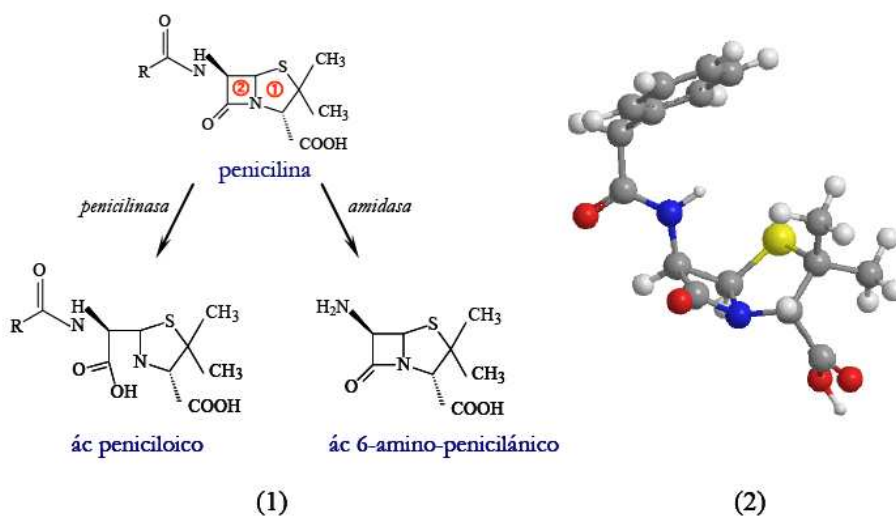


Figura 10. (1) Estructura básica de la penicilina, ácido 6-amino-penicilánico y ácido peniciloico. A) Anillo tiazolidínico, B) anillo β -lactámico. (2) Estructura tridimensional de la penicilina.

Productos análogos a la benzilpenicilina, se produjeron a partir de la introducción de precursores de cadenas laterales, en caldos de cultivo fermentados, pero el único compuesto terapéutico útil, obtenido por esta vía, fue la penicilina V (fenoximetilpenicilina).

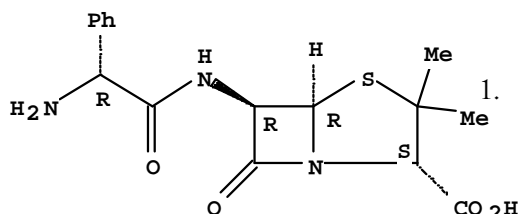
En 1959, el mismo ácido 6-aminopenicilánico, fue hallado en fermentaciones, en las cuales no se habían introducido precursores de cadenas laterales. Más tarde se vio que era posible la producción de cantidades significativas de benzilpenicilina, con la utilización de enzimas microbianas, conocidas genéricamente como amidasas, acilasas, o aciltransferasas o por procesos químicos que dan lugar a la aparición de los acilderivados del ácido 6-aminopenicilánico. Surgió así un gran número de variantes estructurales de la molécula original, como el mecillinam, en el cual, la cadena lateral está unida por un puente amidínico, u otros compuestos en los cuales se añadió al anillo β -lactámico, un grupo 6-metoxi, etc.

Así, con la modificación de la molécula de bencilpenicilina, aparecieron formas de acción prolongada y gracias al desarrollo de derivados semisintéticos, contamos ahora con nuevos compuestos con grandes ventajas sobre sus antecesores, como son: acción más prolongada, mayor absorción digestiva, estabilidad frente a β -lactamasas y espectro antimicrobiano ampliado.

4.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS ESTUDIADOS

A continuación se muestran las estructuras y propiedades físico-químicas de los antibióticos β -lactámicos de uso veterinario permitidos por la legislación europea, pertenecientes a la familia de las penicilinas, y que serán objeto de estudio en la presente memoria: ampicilina, amoxicilina, piperacilina, penicilina G, penicilina V, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y ácido clavulánico. Igualmente se detalla la dosis suministrada y los LMRs para las matrices en las que se han aplicado los métodos analíticos propuestos en esta tesis.

AMPICILINA



- Antibiótico en polvo cristalino transparente.

Fuente: *Semisintética*

- pK_{a1} 2.7, pK_{a2} 7.3

- Solubilidad: $2 \cdot 10^4$ mol/L a pH 1.
Soluble: agua, metanol, etanol, Acetona, DMF, DMSO.

Poco soluble: *cloroformo*.

Insoluble: éter, acetona y aceites no volátiles.

-Estable a pH 3.5-5.5 en disolución acuosa, 0.25% (p/v).

-Inactivación rápida en medio alcalino (pH 9-11).

-UV máx: (metanol) y (m. ácido): 257, 262 nm

- Número CAS: 69-53-4.

- Punto ebullición: 683,9 °C

- Punto fusión: 367,4 °C

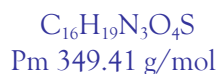
- Log P: 1.350

- Se utiliza principalmente en el ganado bovino, para el tratamiento de la mastitis, se puede administrar disuelto en el agua de bebida, o mediante inyecciones intramusculares. Se le administra una dosis única de 15 mg/Kg. En el caso de los pollos, se administra disuelto en el agua de bebida.

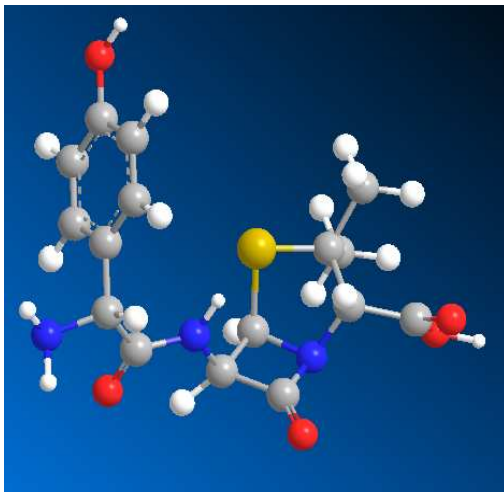
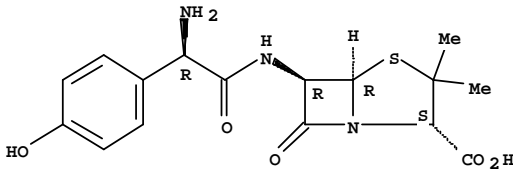
- LMR: 4 µg/L en leche de vaca y 50 µg/Kg en carne de pollo.

- ácido 6-(D[-]-α-aminofenilacetamido)

Penicilánico



AMOXICILINA



ácido 6-(p-hidroxi- a-aminofenilacetamido)
y penicilánico



Pm 365.41 g/mol

- Antibiótico en polvo cristalino transparente

Fuente: *Semisintética*

- pK_{a1} 2.44, pK_{a2} 6.90

- Solubilidad: $5.6 \cdot 10^4$ g/L a pH 1. Soluble: H₂O, metanol y etanol. Insoluble: hexano, benceno, acetato de etilo y acetonitrilo.

- Estable a pH 3.5-6.0 en disolución acuosa, 0.20% (p/v).

- UV max: (etanol): 230, 274 nm (ϵ 10850, 1400 L mol⁻¹ cm⁻¹). (0.1 N HCl): 229, 272 nm (ϵ 9500, 1080 L mol⁻¹ cm⁻¹). (0.1 N KOH): 248, 291 nm (ϵ 2200, 3000 L mol⁻¹ cm⁻¹).

- Número CAS: 26787-78-0

- Punto ebullición: 743.2 °C

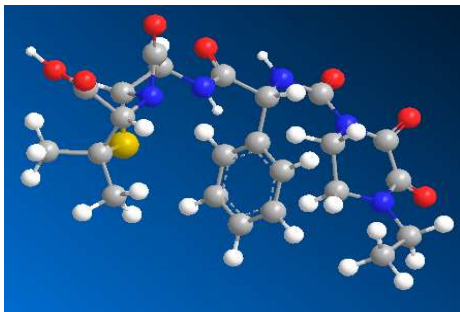
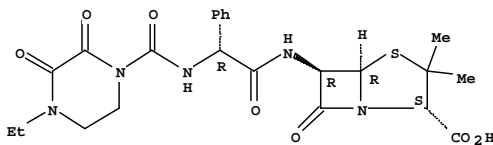
- Punto fusión: 403.3 °C

- Log P: 0.614

- Se administra disuelto en el agua de bebida. La amoxicilina es activa a concentraciones bajas (entre 0.02 y 3.12 µg/mL) frente a *Staphylococcus* y *Streptococcus*, mientras que la mayoría de cepas E.coli son inhibidas por concentraciones de amoxicilina iguales o menores a 12.5 µg/mL.

- LMR: 4 µg/L en leche de vaca
50 µg/Kg en carne de pollo.

PIPERACILINA



- Antibiótico en polvo
- cristalino transparente.
- pK_{a1} -1.44, pK_{a2} 2.44
- Solubilidad: $1.3 \cdot 10^{-5}$ g/L a pH1. Soluble: H_2O .
- Número CAS: 61477-96-1
- Punto ebullición: ~~~~~ °C
- Punto fusión: ~~~~~ °C
- Log P: 1.880
- No es de uso veterinario.
- LMR: No tiene establecido un LMR, ni para leche de vaca ni para carne de pollo.

4-Tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-acido

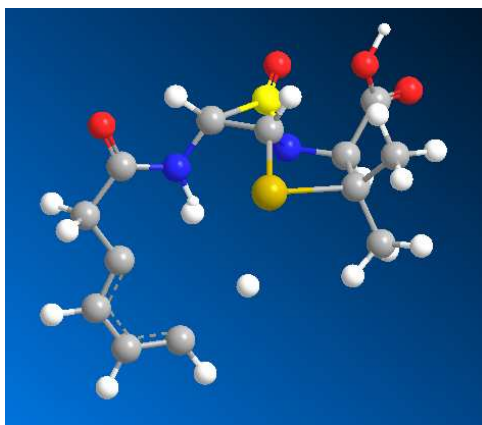
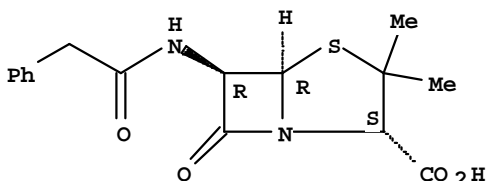
Carboxílico,6-[[("R)-2-[[4-etil-2,3-dioxa

1-piperacilil)



Pm 517.55 g/mol

PENICILINA G



ácido bencilpenicilánico

$C_{16}H_{18}N_2O_4S$

Pm 334.40 g/mol

-Antibiótico en polvo microcristalino e higroscópico de sabor amargo. Fuente: cultivo *Penicillium*.

- pK_{a1} -1.32, pK_{a2} 2.45

-Solubilidad: $1.9 \cdot 10^4$

Soluble: *agua, metanol, etanol, dioxanos*, Poco soluble: *hexano, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *tolueno, éter, cloroformo*.

- Mayor estabilidad a pH 6.5 y a +4 °C.

-Inactivación por ácidos, hidróxidos alcalinos y agentes oxidantes.

- Reducción de actividad por metales pesados, etanol, glicerina, yodo, ácido láctico, vitaminas B₁ y C.

- Número CAS: 61-33-6

- Punto ebullición: 663.3 °C

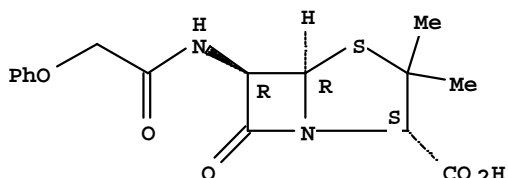
- Punto fusión: 355.0 °C

- Log P: 1.667

- Se administra oral en el agua de bebida, así como vía cutánea, para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel, tanto para el ganado bovino como para las aves. En el caso de ganado bovino en concreto también se puede aplicar vía intramuscular, administrando 1mL por cada 45 Kg de peso.

- LMR: 4 µg/L en leche de vaca
50 µg/Kg en carne de pollo

PENICILINA V



- Se encuentra en forma ácida y sales monobásicas, como la potásica. Fuente: cultivo *Penicillium*.

- pK_{a1} -1.68, pK_{a2} 2.44

- Soluble: *agua, metanol, DMF, DMSO*. Poco soluble: *etanol, éter, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *tolueno, hexano*.

- Ácido resistente a $pH < 5.0$. Inactivación rápida en medio alcalino (pH 9-11).

- Estable a $T < 37$ °C, relativamente estable a ácidos.

- UV max: 268, 274 nm

(ϵ 1330, 1100 L/mol cm).

- Número CAS: 87-08-1

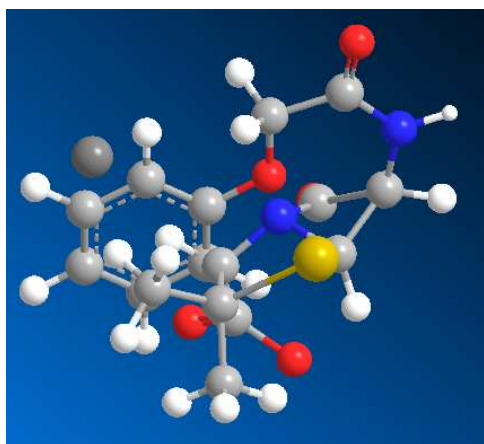
- Punto ebullición: 681.4 °C

- Punto fusión: 365.9 °C

- Log P: 1.875

- Administración oral en el agua de bebida.

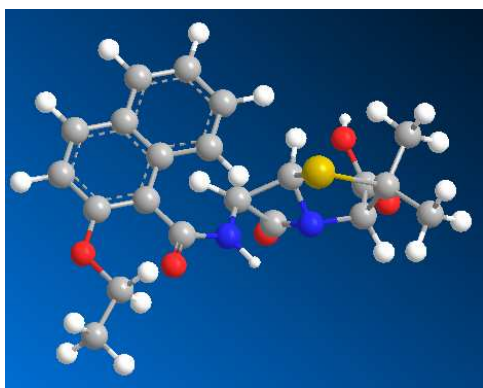
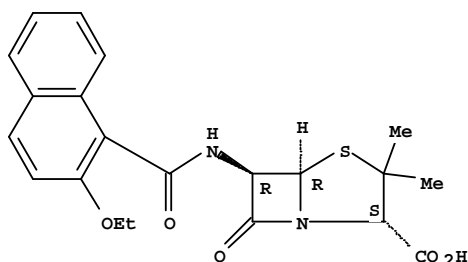
- LMR: No tiene LMR establecido en leche de vaca, 25 $\mu g/Kg$ en carne de pollo.



Ácido 6-fenoxiacetamidopenicilánico

$C_{16}H_{18}N_2O_5S$
Pm 350.40 g/mol

NAFCILINA



Ácido 6-(2-etoxi-1-naftamido)
penicilánico
C₂₁H₂₂N₂O₅S

Pm 414.48 g/mol

- Antibiótico en polvo cristalino. Fuente: *Semisintética*.

- pK_{a1} -2.63 , pK_{a2} 2.44

- Solubilidad: 5.7 · 10⁻⁶ mol/L a pH 1 Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO*. Poco soluble: *acetona*.

Insoluble: *hexano, benceno, isooctano, cloroformo*.

- Estable entre 2-8 °C

- Número CAS: 147-52-4

- Punto ebullición: 714.1 °C

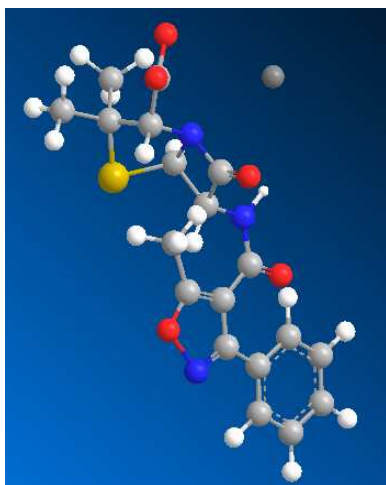
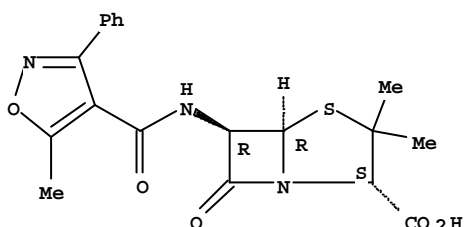
- Punto fusión: 385.7 °C

- Log P: 3.52

- Se usa en el ganado ovino, administrándose vía intramamaria, con un amplio espectro de acción incluyendo a *Staphylococcus* y *E.coli*.

- LMR: 30 µg/L en leche de vaca y 300 µg/Kg en carne de pollo.

OXACILINA



Ácido 6-(5-metil-3-fenil-2-isoxazolil-

4-Carboxamido) penicilánico.



Pm 401.44 g/mol

-Antibiótico en polvo cristalino.

Fuente: Semisintética

- pK_{a1} -2.90, pK_{a2} 2.44

- Solubilidad: $4.6 \cdot 10^{-5}$ mol/L a pH 1. Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO*. Poco soluble: *hexano, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *acetato de etilo, éter, cloroformo*.

- Estable a 24 °C (1 día) y a 4 °C (7 días).

- Inactivación del 36% a pH 2 (24 horas).

- UV máx: 232, 259 nm.

- Número CAS: 66-79-5

- Punto ebullición: 686.8 °C

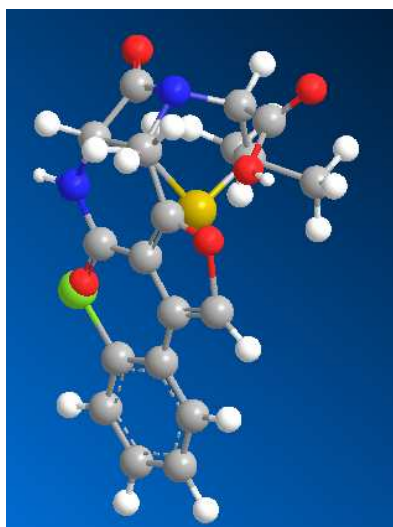
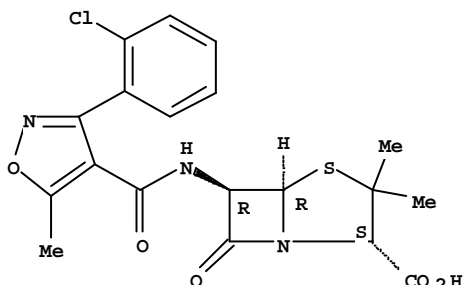
- Punto fusión: 369.2 °C

- Log P: 2.054

-Administración oral en el agua de bebida y en el caso del ganado bovino y caprino. Aplicación intramamaria, para el tratamiento y la prevención de la mastitis subclínicas.

- LMR: 30 µg/L en leche de vaca y 300 µg/Kg en carne de pollo.

CLOXACILINA



Ácido 6-(5-metil-4-0-clorofenil-4

Isoxazolilcarboxamido) penicilánico)

$C_{19}H_{17}ClN_3O_5S$

Pm 435.9 g/mol

- Antibiótico en polvo cristalino. Fuente: *Semisintética*.

- pK_{a1} -3.53, pK_{a2} 2.44

- Solubilidad: $1.5 \cdot 10^{-5}$ mol/L a pH 1. Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO, piridina, etilenglicol*.

Poco soluble: *hexano, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *acetato de etilo, éter, cloroformo*, - Estable a pH de 6.0-7.5 en disolución *isooctano*. acuosa al 1% (sal sódica).

- UV máx: 230, 261 nm.

- Número CAS: 61-72-3

- Punto ebullición: 689.7 °C

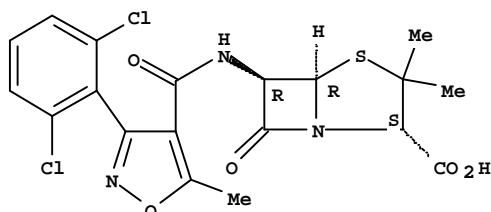
- Punto fusión: 370.9 °C

- Log P: 2.533

- Administración oral en el agua de bebida, y en el ganado bovino y caprino, aplicación intramamaria para el tratamiento y la prevención de las mastitis subclínicas.

- LMR: 30 μ g/L en leche de vaca y 300 μ g/Kg en carne de pollo.

DICLOXACILINA



-Antibiótico en polvo cristalino.

Fuente: *Semisintética*.

- pK_{a1} -3.73, pK_{a2} 2.44

- Solubilidad: $4.8 \cdot 10^{-6}$ mol/L a pH 1. Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO, acetona*. Poco soluble: *cloroformo, acetato de etilo*. Insoluble: *hexano, benceno, isooctano*.

- Estable a 24 °C (7 días) y a 4 °C.

- Inactivación del 12% a pH 2 (24 horas).

- Número CAS: 3116-76-5

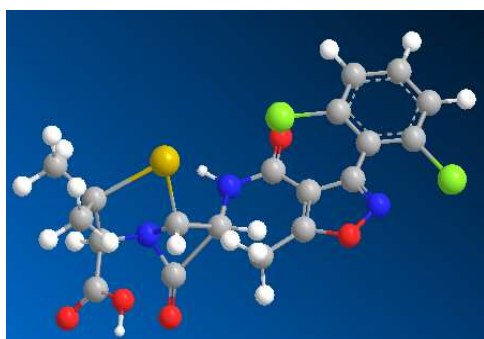
- Punto ebullición: 692.4 °C

- Punto fusión: 372.5 °C

- Log P: 3.023

- Administración vía oral en el agua de bebida, y aplicación intramamaria para el tratamiento de mastitis aguda, subaguda y crónica.

- LMR: 30 µg/L en leche de vaca y 300 µg/Kg en carne de pollo.

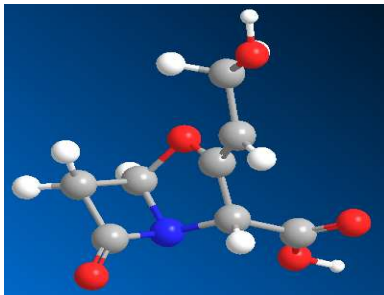
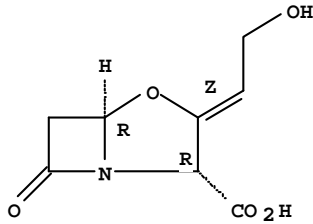


Ácido 6-(3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-4-isoxazolilcarboxamido) penicilánico

$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_5S$

Pm 470.33 g/mol

ÁCIDO CLAVULÁNICO



4-oxa-1-azabicyclo[3,2,0]heptano-2-Carboxilico,3-(2-hidroxietilideno)-7-oxo



Pm 199.16 g/mol

-Antibiótico en polvo cristalino.
Fuente: *Semisintética*.

- pK_{a1} -2.85, pK_{a2} 3.86

- Solubilidad: --- . Soluble: *agua, metanol, etanol*.

- Número CAS: 58001-44-8

- Punto ebullición: 545.8 °C

- Punto fusión: 283.9 °C

- Log P: -1.984

- Aplicación intramamaria para la prevención y tratamiento de mastitis en el ganado bovino y administración vía oral en el agua de bebida en el pollo.

- LMR: 200 µg/L en leche de vaca. No tiene LMR establecido de pollo.

4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

La metodología utilizada actualmente para la determinación de antibióticos β -lactámicos es muy variada e incluye la utilización de diferentes técnicas analíticas. Cada una de ellas aporta una serie de ventajas e inconvenientes que deben ser valoradas detenidamente a la hora de seleccionar el sistema de medida a utilizar en cada caso. No obstante, la determinación de estos antibióticos en alimentos de origen animal, a las bajas concentraciones permitidas por la legislación, implica la necesidad de desarrollar métodos de medida muy sensibles y selectivos.

Los métodos de análisis que se aplican hoy en día para la detección de antimicrobianos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental se pueden dividir en tres grandes grupos: métodos cromatográficos, métodos no cromatográficos, en donde se engloban los métodos basados en ensayos de barrido (del inglés “*screening methods*”), y métodos electroforéticos.

4.4.1. METODOS CROMATOGRÁFICOS

4.4.1.1. Cromatografía de Gases (GC)

El hecho de que la cromatografía de gases no sea una técnica muy utilizada para esta aplicación se debe a que los antibióticos β -lactámicos son compuestos poco volátiles, de elevada polaridad y termolábiles, lo que hace necesario recurrir a una derivatización precolumna para llevar a cabo la

determinación. Así, por ejemplo, Meetschen y Petz [135] han determinado penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y nafcilina en leche y penicilina G en músculo bovino, realizando una derivatización con diazometano. La detección se realiza mediante espectrometría de masas (MS) y los límites de detección alcanzados oscilan entre 0.1 - 0.4 µg/L. No obstante, el método desarrollado no puede aplicarse para el análisis de β-lactámicos anfóteros, como son la amoxicilina y ampicilina, pues la reacción de metilación utilizada sólo puede emplearse con penicilinas de cadena lateral neutra.

En GC se utilizan gran variedad de dispositivos de detección, tales como los de captura de electrones (**ECD**, *electron captured detector*), fósforo-nitrógeno (**NPD**, *nitrogen phosphorus detector*) o fotometría de llama (**FPD**, *flame photometric detector*). Empleando, éste último, H. Mineo y col. [136] han desarrollado un método para la determinación de siete penicilinas, tres tetraciclinas y otros antibióticos en músculo bovino con recuperaciones, para los 36 compuestos evaluados, por encima del 82%.

4.4.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es, sin duda alguna, la técnica de separación más utilizada para la determinación de antibióticos. La separación de estas sustancias se realiza generalmente mediante columnas de fase inversa, con diferentes tipos de soportes (octadecil-, octil-, fenil-, soportes poliméricos, etc.).

[135] U. Meetschen, M. Petz, *J. AOAC Int.* 73 (1990) 373.

[136] H. Mineo, *Vet. Hum. Toxicol.* 34 (1992) 393.

Los sistemas de detección acoplados a HPLC son, habitualmente, la espectrofotometría UV-Vis (normalmente mediante detector de diodos en fila, DAD), la fluorescencia y, más recientemente, la espectrometría de masas (MS).

La **absorción UV** proporciona en general una sensibilidad adecuada pero, para la mayoría de los análisis de fármacos, no permite obtener información estructural y está sujeta a múltiples interferencias, lo que hace necesario una etapa previa de limpieza de muestra o bien, una derivatización de los compuestos. No obstante, el uso del detector **DAD** ha permitido mejorar la selectividad del método ya que permite la medida a distintas longitudes de onda, lo cual facilita la minimización del efecto matriz mediante un sistema de compensación de los efectos de la misma. Utilizando este tipo de detección es posible la determinación fiable de ciertos tipos de antibióticos en una gran variedad de matrices biológicas y medioambientales. Sin embargo, no es posible tampoco en este caso obtener información estructural sobre los antibióticos de una misma clase, como es el caso de los β -lactámicos, debido a la similitud que presentan los espectros de absorción UV de los mismos.

La **detección fluorimétrica** no se ha utilizado tan extensamente como la de absorción UV, ya que la mayoría de estos antimicrobianos no presenta fluorescencia intrínseca. Sin embargo, este sistema de detección se ha aplicado ampliamente al análisis de amino penicilinas, como amoxicilina y ampicilina, previa reacción de derivatización precolumna. Los reactivos derivatizantes más ampliamente utilizados son *formaldehído* [137], *salicilaldehído* [138], *4-bromometil-7-metoxicumarina* [139] y *dansilhidrazina* [140].

[137] C.Y.W. Ang, W. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 389.

[138] W. Luo, E.B. Hansen, C.Y.W. Ang, J. Deck, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1264.

Algunos grupos de investigación han descrito procedimientos basados en el acoplamiento de **detectores electroquímicos** a HPLC para el análisis de antibióticos β -lactámicos. Estos dispositivos responden a sustancias electroactivas y son muy sensibles, simples y con una extensa aplicabilidad. Kirchmann y col. [141] han empleado un detector amperométrico de pulso integrado (**IPAD**, *integrated pulsed amperometric detector*) para la determinación de ocho penicilinas en leche, alcanzando unos límites de detección de 70 $\mu\text{g/L}$ para penicilina. En el año 1994, Carson y col. [142] evaluaron distintos métodos basados en GC y LC utilizando detectores comerciales para el análisis de antibióticos β -lactámicos en leche y concluyeron que ninguno de los procedimientos ensayados resultaba adecuado como método confirmatorio. De hecho, la directiva 93/256/CEE establece que: “los métodos basados solamente en el análisis cromatográfico, sin el uso de detección espectrométrica molecular, no son adecuados para su uso como métodos confirmatorios”, concepto que se ha reforzado con la directiva 2002/657/CE. Esta normativa ha generado un gran impulso en el desarrollo de métodos de LC acoplados a **espectrometría de masas (MS)** para la determinación de antibióticos en una gran diversidad de matrices ya que, entre otros aspectos, este sistema de detección ofrece, el mejor sistema de análisis de compuestos polares, no volátiles y/o termolábiles en términos de sensibilidad y, sobretudo, especificidad. En la actualidad, el 80% de las técnicas empleadas para la determinación de residuos veterinarios están basados en LC-MS.

[139] K. Berger, M. Petz, *Sensitive confirmatory method for determination of seven penicillins in bovine tissues and milk*, en N. Haagsma, A. Ruiter (eds.) EuroResidue Conf., Utrecht (Holanda), 1990.

[140] R.K. Munns, W. Shimoda, J.E. Roybal, C. Vieira, *J. AOAC Int.* 68 (1985) 968.

[141] E. Kirchmann, R.L. Earley, L.E. Welch, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 1755.

[142] M.C. Carson, R.F. Righter, D.D. Wagner, *Wageningen Press* 76 (1994) 80.

En las Tablas 8 y 9 se resumen los métodos propuestos para la determinación de antibióticos β -lactámicos usando cromatografía líquida con detección UV-vis y MS, respectivamente, aplicados a diversas matrices de muestras alimentarias y ambientales. Igualmente en la Tabla 10 se recogen otros métodos de HPLC en los que se emplean otras detecciones menos frecuentes

Tabla 8. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección UV-Vis

Muestra	Análitos	Tratamiento de muestra	Características LC/detección	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Plasma de rata	E-1100	Añadir MeOH-0.2% HClO_4 Vortex y Centrifugación	C_{18} LC-UV ACN- H_2O - HClO_4 60%- NaClO_4 156:844:1:5 (v/v/v/w)	100.9-96.2	nd	143
Sangre, suero	CFM, CFPM, MPM	Añadir ACN igual vol., Centrifugación	C_{18} LC-UV ACN-1-heptano-ácido sulfónico	97.8-100.23 ^c	0.8 mg/L CFM y CFPM 2.0 mg/L MPM	144
Suero humano, orina	CFX, CMZ, CMNX	Suero: añadir MeOH igual vol., Centrifugación Orina: Dilución, Filtración	C_{18} RF LC-UV K_3PO_4 (pH 6)-ACN, C_{18} IP LC-UV HTAB ion-pairing agent K_3PO_4 (pH 6)-ACN. Zorbax IEK ₃ PO ₄ (pH 6)	>95	< 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suero < 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ orina	145
Preparados farmaceuticos, suero sanguíneo humano, orina	CLX, CDX, CCL, CTX	Suero: Añadir ACN, Vortex, Centrifugación, Evaporación, SPE Orina: Dilución y Filtración	C_{18} LC-UV tampón acetato (pH 4.0)-MeOH	76.3-112.0	0.01 ng/ μL CDX y CLX 0.005 ng/ μL CTX y CCL	146

[143] T. Tokumuara, T. Horie, *J. Chromatogr.* 620 (1993) 153.[144] M. Ip, C. Au, S.W. Cheung, C.Y. Chan, A.F. B. Cheng, *J. Antimicrob. Chemoth.* 42 (1998) 121.[145] J.C. García-González, R. Méndez, J. Martín-Villacorta, *J. Chromatogr. A*, 812 (1998) 197.[146] V.F. Samanidou, E.A. Hapeshi, I.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B*, 788 (2003) 147.

Tabla 8. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección UV-Vis

Muestra	Analytos	Tratamiento de muestra	Técnica de detección	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Suero, secreciones bronquiales	CAZ, MPM	HPLC-ISP: C ₈ or C ₁₈ cartucho y filtro en línea. Suero: Inyección directa Espudo: Añadir tampón NaH ₂ PO ₃ (pH 5.0), Homogeneizar, Centrifugar	C ₁₈ LC-UV ACN- tampón NaH ₂ PO ₃ (pH 5.0)	Esputo: 56.7-73.4 MPM 49.3-56.9 CAZ Suero: 105.2-89.4 MPM 109.0-95.8 CAZ	<0.5µg/mL	147
Suero de conejo, fluidos biológicos	TIPC, clavulanato	Añadir CAN, Centrifugación Añadir DCM, Centrifugación	C ₁₈ Ion-pair LC-UV ACN-tampón fosfato pH 4.1 (TBAS), gradiente	76.81 µg/mL suero 79.93 µg/mL TCF	1 µg/mL (LOQ)	148
Orina humana	Ciprofloxacina, CLOX, ibuprofeno	Dilución	C ₁₈ RF LC-UV Formico/formiato (pH 3)-ACN-MeOH	92-110	0.41 µg/mL CLOX	149
Leche bovina	AMOX, CEP, PENG, AMPI, CLOX,CTF, procaina	Añadir igual vol ACN 50%, Vortex, ultracentrifugación	Ph Ion-pair LC-UV ACN-S8-S12-Tetraetil amonio	69.2-95.1	100 ppb	150

[147] M. Ehrlich, F.D. Daschner, K. Kummerer, *J. Chromatogr. B*, 751 (2001) 357.

[148] C. Li, Q. Geng, D.P. David, C.H. Nightingale, *J. Chromatogr. B*, 974 (2003) 227.

[149] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. González-Gómez, F. Canadá-Canadá, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1969.

Tabla 8. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección UV-Vis

Muestra	Analitos	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Leche	Desconocido	Extracción ACN-TEA, Concentración, Filtración, HPLC Fraccionación: C ₁₈ LC 0.01 M KH ₂ PO ₄ - ACN, gradiente	Test screening rápido leche C ₁₈ LC-UV H ₃ PO ₄ bf-CAN	nd	nd	151
Leche	AMPI, PENG, CLOX, DICLOX, NAFCI	Extracción ACN, C ₁₈ SPE,	C ₁₈ LC-UV ACN-MeOH-KH ₂ PO ₄ -sodio 1-decanosulfonato (pH 3.5)	79.8-89.4	0.03-0.05 µg/mL	152
Aguas residuales	PECG, AMOX, AMPI, PENV, OXA, CLOX, DICLOX, NAFCI	Intercambiador aniónico SPE	C ₁₈ LC-UV-DAD H ₂ O/TFA-ACN/TFA, gradiente	^a 46-91 industrial ^a 28-91 influente STP ^a 39-114 effluente STP	^b 2.9-25.6 µg/l industrial ^b 2.5-12.4 µg/L influente STP ^b 2.2-12.7 µg/L effluente STP	153
Muestras de agua MQ	CFZN, CDX, CLX, CDN, AMPI	Dilución con 1% de disolución de NaCl	C ₁₈ RF LC-UV 10% ácido acético-IPSR-H ₂ O	nr	^d (50 CFZN; 20 CDX; 40 CLX; 20 CDN; 10 AMPI) ng/mL	154

[150] K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, R.F. Straub, A.L. Aronson, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1122.

[151] W.A. Moats, R.D. Romanowski, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 237.

[152] K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 205.

[153] E. Benito-Peña, A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 415.

[154] S.A. Farag, *J. AOAC International*, 81 (1998) 381.

Tabla 8. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección UV-Vis

Muestra	Analitos	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Medio agar	CAZ	Calor, añadir NaHCO ₃ , Centrifugación, Filtración	C ₁₈ RF LC-UV K ₂ HPO ₄ (pH 6.5)-EtOH	104	1.4 µg/mL	155
Preparados farmacéuticos	AMOX, AMPI, CLX	nd	FIA-Monolitico C ₁₈ - UV MeOH-acetico/acetato (pH 6.2)	101.4 AMOX	nd	156
Muestras de agua medioambiental	PENG, PENV, AMPI, AMOX, NAFCl, OXA, CLOX, DICLOX	MIP con PENG SPE	C ₁₈ RF LC-UV H ₂ O TFA-ACN TFA	93-100 agua grifo 90-100 agua río	^a 0.38-0.98µg/L Milli Q ^b 0.9-2.9 µg/L agua grifo ^c 1.3-5.8 µg/L agua río	157

Acrónimos: HTAB, Bromuro de hexadeciltrimetilamonio; IE, Intercambio iónico; IP, Par iónico; ISP, preparación muestras integradas; ISPR, isopropanol; MIP, polímero impronta molecular; nd, no disponible; RF, fase reversa; S8, octanosulfonato; S12, dodecanosulfonato; STP, estación depuradora de aguas residuales; TBAS, hidrogeno sulfato tetrabutilamonio; TEA, tetraetilamonio; TFA, ácido trifluoroacético ; TrEA, trietilamina.

^aMuestras fortificadas con todos los antibióticos entre 25 y 75 µg/L. ^b Usando muestras de agua de 250 mL. ^cUna concentración de fármacos entre 0.78 y 100 mg/L.

^d LOQs, ^e Percolación de 50 mL de agua.

[155] C. Arcelloni, M. Basile, R. Vaiani, P. Bonini, R. Paroni, *J. Chromatogr. A* 742 (1996) 121.

[156] H.M. González-San Miguel, J.M. Alpizar-Lorenzo, V. Cerdá, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 663.

[157] J.L. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, A.J. Hall, B. Sellergrén *Anal. Chem.* 79 (2007) 695.

Tabla 9. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analitos	Tratamiento de muestra	Técnicas de detección	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Leche de vaca, riñón y tejidos vivos	AMPI, CLOX, PENV, PENG	SLM n-undecano: di-n-hexil eter	C ₁₈ LC-PI-ESI-MS Ácido acético-MeOH-H ₂ O	34-66 leche ^a 47-85 riñón, tejidos vivos ^a	PENG, PENV: 1ng/kg en riñón, tejidos vivos; 0.7 en leche AMPI: 1.4 µg/kg en riñón, tejidos vivos 1.7 µg/L en leche	158
Leche bovina	PENG, AMPI, OXA, AMOX, DICLOX, CLX, CEP	Añadir 10% ácido acético, vortex, centrifugar, filtrar	C18 LC-PI-ESI-MS H ₂ O-0.1 % ácido fórmico/ACN-0.1% Ácido fórmico, gradiente	(PENG:52, AMPI:76, OXA:43.5, AMOX:52, DICLOX:28.5, CLOX: 82, CEP:78.5) ^b	PENG,CLOX,CEP:1µg/L, AMPI:2 µg/L, OXA:5 µg/L, AMOX:<1 µg/L, DICLOX:4 µg/L	159
Leche bovina	AMPI, AMOX, PENG, PENV, CLOX, CEP, CTF	Añadir ACN, vortex, Centrifugar, añadir tampón fosfato, vortex, SPE limpieza con Oasis HLB®	C18 LC-IT-MS-MS H ₂ O-1 % ácido acético/MeOH-1% ácido acético, gradiente	115-85 ^a	(0.2 AMPI, 0.4 CTF, 0.8 CEP, 1 AMOX and PENG, 2 CLOX and PENV) ^c ng/mL	160

[158] T.A.M. Msagati; M.M. Nindi, *Food Chem*, 100 (2006) 836.[159] S. Ghidini, E. Zanardi, G. Varisco, R. Chizzolini, *Food Additives Contaminants* 20 (2003)528.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analitos	Tratamiento de muestra	Técnicas de detección	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Leche bovina	CLOX, PENG, AMOX, AMPI, OXA	Añadir $d\gamma$ -PEN (IS), centrifugar, añadir tampón fosfato (pH 9.2), añadir n-hexano, centrifugar, SPE limpieza con C18, eluir con ACN-tampón fosfato 50%, evaporar, reconstituir con ácido fórmico y agua, filtrar	LC-ESI/MS/MS	76-94 ^a	(0.40 OXA, 0.42 AMOX, 0.52 AMPI, 0.53 PENG, 1.10 CLOX) $\mu\text{g}/\text{Kg}$	161
Leche bovina	AMOX, CEP, CPL, AMPI, CTF, PENG, PENV, OXA, CLOX, DICLOX, NAFCI	SPE con CarboGraph 4, elución con MeOH, metileno cloruro/MeOH/ácido fórmico, Evaporación, Reconstitución, Filtración	C ₁₈ LC-PI/NL-ESI-MS	70-108	(0.4 CPL, 0.5 AMPI y PENG, 0.6 CEP y CLOX, 0.7 AMOX y OXA, 1 CTF, 2 NAFCI, 3 DICLOX) ^d ng/mL	162
Leche bovina	AMOX, CEP, PENG, AMPI, CLOX, CTF	Añadir igual vol ACN-H ₂ O 50%, Vortex, ultracentrifugación	RP-LC-PI-ESI-MS 40%ACN-1% ácido acético	nd	nd	150
Leche bovina	PENG, AMPI, AMOX, CEP, CLOX, CTF	Añadir igual vol ACN/H ₂ O, Vortex, Centrifugación	PPC-ESI-MS H ₂ O-ACN gradiente	Aprox. 85-115	nd	163

[160] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *J. Agr. and Food Chem.* 50 (2002) 406.

[161] S.Riediker, J-M. Diserens, R.H. Stadler, *J. Agr. and Food Chem.* 49 (2001) 4171.

[162] F. Bruno, R. Curini, A. di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *J. Agr. Food Chem.* 49 (2001) 3463.

[163] R. Straub, M. Linder, R.D. Voyksner, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3651.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
β -lactámicos no farmacéuticos	CMZ, CPDXPR	Disolver H ₂ O-ACN, Sonicar, Centrifugación, Filtración	RP-LC-PI-ESI-MS H ₂ O-ACN- ácido fórmico	96.7-102.2 CMZ 88.9-94.2 CPDXPR	0.002 ppm	164
Huevos	Sulfonamidas, tetraciclinas, fluorquinolonas y β -lactamas (AMOX, CEP, AMPI, PENG, CLOX)	Mezclar, Añadir tampón succinato sódico, Homogeneizar, Centrifugación, SPE con Oasis HLB	Phenyl-LC-ESI-MS/MS 0.1% ácido fórmico-ACN, gradiente	AMOX CEP < 25%; AMPI, PENG, CLOX: 30-50 %	Limites Screening approx. 50 ppb	165
Aguas naturales y residuales	AMOX, AMPI, OXA, CLOX, CEP	SPE con Oasis HLB [®] , evaporación, añadir fase móvil	C ₁₈ -LC/MS/MS con ESI 0.1 % ácido fórmico-ACN- MeOH gradiente	>75% excepto AMOX <40%	8-10 ng/L superficie agua 13-18 ng/L influente 8-15 ng/L efluente	166

[164] N. Fukutsu, Y. Sakamaki, T. Kawasaki, K. Saito, H. Nakazawa, *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 1469.

[165] D.N. Heller, C.B. NOchetto, N.G. Rummel, M.H. Thomas, *J. Agr. Food Chem.* 54 (2006) 5267.

[166] J.M. Cha, S. Yang, K.H. Carlson, *J. Chromatogr. A*, 1115 (2006) 46.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Riñón bovino, tejidos	DECEP, AMOX, DCCD, AMPI, CFZN, PENG, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX	Homogeneizar, Extracción Agua-ACN, dispersiva SPE limpieza con C ₁₈ , centrifugación, evaporación, filtración	C ₁₈ -LC/MS/MS A: 0.1% ácido fórmico; B: 50% ACN-50% MeOH	70% excepto DCCD 58%	nd	167
Leche bovina	AMOX, AMPI, CLOX, OXA, PENG	Centrifugación, extracción con tampón fosfato 100mM pH 9.2, extracción líquido-líquido con hexano, SPE con C ₁₈ , vol reducción, filtración	C ₁₈ -LC-ESI MS/MS A:0.1% ácido fórmico B: 65% ACN, 35% H ₂ O , 0.1 % ácido fórmico, gradiente	Estudios de estabilidad en leche y extractos de leche a 4, -20 y -76°	nd	168
Leche cruda bovina	DCFA (ceftiofur-metabolito relacionado)	Centrifugación, añadir solución de extracción (0.4% DTE en tampón borato), vortex, derivatización con iodacetamida, vortex, pH ajustado a 3.5, centrifugación, SPE con Oasis HLB, evaporación, centrifugación	Fenileter LC-ESI MS/MS 0.005% ácido fórmico-MeOH, gradiente	87.0-95.2%	96.1 µg/Kg	169

[167] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Steven, *Anal. Chem*, 77 (2005) 1473.

[168] S. Riediker, A. Rytz, R. H. Stadler, *J. Chromatogr. A*. 1054 (2004) 359.

[169] M. Becker, E. Zittlau, M. Petz. *European Food Research and Technology* 217 (2003) 449.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Sangre humana	CCL	Derivatización piridina/CIPIC a 80°C, centrifugación, filtración	C ₁₈ -LC/APCI/MS 40% ACN-10% 0.1 Trietilamina	nd	10 nm/50 μ L	170
Tejido riñón ternera	DECEP, AMOX, CEP, DCCD, AMPI, CFZN, PENG, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX	Homogeneización, extracción H ₂ O-ACN, vortex, centrifugación, evaporación, ACN, SPE con C ₁₈ , evaporación	C ₁₈ -LC/MS/MS con ESI 0.1% ácido fórmico en agua-0.1% ácido fórmico en MeOH, gradiente	nd	(DECEP: 10-50 ; AMOX: 50-100 ; CEP: 10 ; DCCD: 500; AMPI:10 ; CFZN: 10 ; PENG:10 OXA:10 ; CLOX:10 ; NAFCl:10 ; DICLOX:100-500) ng/g	171
No muestra	Cefalosporinas: CTX, CPZ, CMX, CPM, CTRX, CPIZ, CMNX, CZX, CFX, CMZ, CTM, CXM, LOMX Penicilinas: AMPI, PENG, CBPC, SBPC, PIPC, ASPC, AMOX, TIPC		Identificación por FIA C ₁₈ LC-APCI-MS A: ACN-1% ácido acético, B: ACN-Bromoformo como solvente de aceleración de ionización	nd	nd	172

[170] M. Kai, H. Kinoshita, K. Ohta, S. Hara, M.K. Lee, J. Lu, *J. Pharm. & Biomed. Anal.* 30 (2003) 1765.

[171] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17 (2003) 660.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Músculo bovino y riñón	AMPI, CEP, CLX, CQM, CFZN, PENG, PENV, OXA, CLOX, DICLOX, NAFCI	Extracción ACN, limpieza mediante extracción liq-liq con hexano o SPE	Fenileter LC/MS-MS con ESI. CID con argón Ácido fórmico MeOH, gradiente	nd	nd	173 ^e
Leche	AMOX, AMPI, CLOX, OXA, PENG	Centrifugación, añadir igual vol. 0.1M tampón fosfato (pH 9.2), Vortex, Extracción con hexano, C ₁₈ SPE, Evaporación, Filtración	LC-ESI-MS/MS A: agua; B: 0.1% ácido fórmico ACN-agua	76-94%	(AMOX: 0.42, AMPI:0.52, CLOX:1.05, OXA:0.40, PEN G:0.53) $\mu\text{g/Kg}$	174

[172] S. Horimoto, T. Mayumi, K. Aoe, N. Nishimura, T. Sato, *J. Pharm. & Biomed. Anal.* 30 (2002) 1093.[173] M. Becker, S. Stier, M. Petz, *Biologically-Active Phytochemicals in Food*. Special Publication- Royal Society of Chemistry 269 (2001) 267.[174] S. Riediker, R.H. Stadler, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1614.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Plasma humano	Un candidato β -lactámico (comp I) y su producto de transformación en anillo abierto (comp II)	Añadir igual vol. IS in 0.5M NH ₄ Ac (pH 4), Vortex, Centrifugación	Flujo alto LC-ESI-MS/MS Oasis HLB para extracción online C ₁₈ como columna analítica A: 1mM ácido fórmico en agua; B: 1mM ácido fórmico en MeOH; C: 1mM ácido fórmico en MeOH-H ₂ O	70% comp I 95% comp II	0.980 ng/mL ^d	175
Riñón de vaca, tejidos vivos, carne y plasma	PENG, PENV, CLOX, DICLOX	Extracción acetona/TCA, Homogeneización, centrifugación, evaporación, añadir 0.5M Na ₂ HPO ₄ (pH 6), SPE con LMS, centrifugación	C ₁₈ LC-API-MS MeOH-H ₂ O/NH ₄ Ac-H ₂ O	Plasma: 95-98%; Riñón: 85-98%; Carne: 58-97% Tejidos vivos: 58-97%	Riñón, tejidos vivos, carne: 7, 10, 15, 20 ng/f para PENG, PENV, CLOX, DICLOX. Plasma: 30, 40, 50, 80 ng/mL para PENG, PENV, CLOX, DICLOX	176

[175] M. Jemal, Z. Ouyang, Y-Q, Xia, M.L. Powell, *Rapid Commun. Mass Sp.* 13 (1999) 1462.[176] V. Hormazabal, M. Yndestad, *J. Liquid Chromatogr. & Related Technol.* 21 (1998) 3099.

Tabla 9 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con detección mediante MS

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Suspensión que contiene una nueva síntesis de β -lactámicos	Cuatro potenciales productos de degradación		Multi-etapa LC-ESI-MS C ₁₈ : NH ₄ PO ₄ -CTAB-ACN-MeOH-THF SCX: NH ₄ Ac-ACN C ₁₈ :NH ₄ Ac-CAN-MeOH-THF	nd	nd	177
Leche, tejidos	β -lactámicos		Haz de partículas LC-MS		Aprox. 100 ng	178 ^e

Acrónimos: APCI, Ionización química a presión atmosférica; Bl, mezclar; CID, disociación inducida por colisión; CTAB, bromuro de cetiltrimetilamonio; DTE, Ditioeritritol; ESI, Ionización por electrospray; IT, trampa de iones; PI, ion positivo; PPC, cromatografía líquida de perfusión; Py, Piridina; RP, fase reversa; SLM, membrana soporte líquida; TCA, ácido tricloroacético; TrEA, trietilamina; nd, no disponible.

^a El rango de recuperaciones abarca todos los analitos y todas las concentraciones. ^b Recuperaciones promedio. ^c Para un tamaño de muestra de 5 mL.

^d Correspondiente al límite de cuantificación.

^e Abstract

[177] L. Rovatti, M. Garzotti, A. Casazza, M. Hamdan, *J. Chromatogr. A*, 819 (1998) 133.

[178] R.D. Voyksner, C.S. Smith, P.C. Knox, *Biomed. & Environmental Mass Spectrometry* 19 (1990) 523.

Tabla 10. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con otras técnicas de detección

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Leche cruda	AMOX	Derivatización, TCA-formaldehído a 100°C Extracción phosphato-ACN	LC-FL	100.6	20 μ g/L	179
Sangre humana	CCL	Derivatización Piridina/CIPIC a 80°C Centrifugación, Filtración	C ₁₈ LC-FL 34% ACN-10% 0.1M Trietilamina CL detección H ₂ O ₂ , tampón borato (pH 9.5), ACN	94-106	10 pmol/25 μ L 1.0 pmol/25 μ L	180, 181
No muestra	PENG, PENV, DICLOX		C ₁₈ LC-CL 35% MeOH-0.01M NaH ₂ PO ₄ PDr: 10 ⁻⁴ M Luminol en 0.001M NaOH, 0.03% H ₂ O ₂ en 0.001M NaOH	nd	nd	182

[179] L. Suntornsuk, A. Lekbumroong, W. Suntornsuk, *Warasan Phesatchasat* 30 (2003) 19.

[180] M. Kai, H. Kinoshita, M. Morizono, *Talanta* 60 (2003) 325.

[181] M. Kai, H. Kinoshita, K. Ohta, S. Hara, M.K. Lee, J. Lu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1765.

[182] J.H. Miyawa, S.G. Schulman, J.H. Perrin, *Biomed. Chromatogr.* 11 (1997) 224.

Tabla 10 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC con otras técnicas de detección

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Leche de vaca	PEN, CDN, CDX, CLOX	Añadir 20% TCA-H ₂ O, Vortex, Filtración	MFS-CL MeOH-H ₂ O 50% PDr: luminol-K ₃ Fe(CN) ₆	96.5-103 ^a	(0.5 PEN, 0.04 CDN, 0.08 CDX, 0.1 CLX) μ g/L	183
Leche cruda	AMPI, CEP	Centrifugación, solidificación capa de grasa, añadir ACN, Filtración, Evaporación, C ₁₈ SPE, Filtración	C ₈ LC-IPAD ACN-tampón acetato (pH 3.75)-agua	67-80 ^a	5 μ g/L	184

Acrónimos: CL, quimioluminiscencia; FL, fluorescencia; CIPIC, 4-(2'-cianoisoindolil)fenilisotiocianato; IPAD, detección pulsos amperométricos; MFS, sistema micro-flujo; nd, no disponible; PDr, derivatización postcolumna; TCA, Ácido tricloroacético; TrEA, trietilamina;

^a Las recuperaciones abarcan todos los analitos y concentraciones.

[183] W. Liu, Z. Zhang, Z. Liu, *Anal. Chim. Acta* 592 (2007) 187.

[184] C.O. Dasenbrock, W.R. LaCourse, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2415.

4.4.1.3. *Cromatografía en Capa Fina*

Entre los métodos desarrollados para llevar a cabo el análisis múltiple de antibióticos de diversa polaridad en concentraciones ultratraza, destaca la cromatografía en capa fina (TLC, *thin layer chromatography*) y su análogo, la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, *high performance thin layer chromatography*). Abjean y Lahogue [185] desarrollaron un método basado en TLC para la determinación cuantitativa de residuos de ampicilina en músculo y leche. Después de la extracción, derivatización, purificación y preconcentración de la muestra, ésta se inyecta en una placa de gel de sílice de HPTCL empleándose acetato de etilo como fase móvil. El analito se detecta espectrofotométricamente a 365 nm y los límites de detección alcanzados para la ampicilina en leche y músculo son de 4 µg/L y 50 µg/kg, respectivamente. Otro ejemplo es el trabajo de Ramírez y col. [186] que determinan ampicilina, penicilina G y dicloxacilina en leche de vaca mediante HPTLC con detección mediante bioautografía. Este sistema de detección está basado en la localización y cuantificación de la actividad antibacteriana en cromatografía, en este caso, plana. El microorganismo utilizado para la detección es el *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Este método presenta un límite de detección comprendido entre 0.007 – 0.027 µg/mL para los tres antibióticos y porcentajes de recuperación entre 90 – 100%.

4.4.2. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

Aunque como se ha comentado anteriormente la cromatografía líquida ha sido ampliamente usada para la determinación de estos compuestos,

[185] J.P. Abjean, V. Lahogue, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1171.

[186] A. Ramírez, R. Gutiérrez, G. Díaz, C. González, N. Pérez, S. Vega, M. Noa, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 322.

fundamentalmente en alimentos y muestras ambientales, el empleo de la CE ha se incrementado considerablemente en los últimos años.

Debido a que estos compuestos son neutros o debilmente iónicos, MEKC es la modalidad más frecuentemente empleada para su separación, aunque existen algunos métodos que utilizan CZE, como se muestra en las Tablas 11, 12 y 13, donde se recoge un resumen de todos los métodos propuestos usando CE para la determinación de estos compuestos, así como sus características y aplicaciones.

En el caso de muestras ambientales, como las aguas, considerando el bajo nivel de residuos y la falta de sensibilidad que caracteriza a la detección UV/Vis en CE, se han comparado dos alternativas para mejorar la sensibilidad en la determinación de ceftiofur [187], una basada en la aplicación de una técnica de preconcentración on-line (stacking), tal como el LVSS y otra basada en una técnica *in-line* de extracción en fase sólida, usando un microcartucho de fabricación casera relleno con un sorbente de SPE (C18), acoplado en el interior del capilar cerca del extremo de salida. En ambos casos fue necesaria una etapa previa de SPE con objeto de conseguir mejorar los LOD.

Para incrementar la sensibilidad en la determinación de algunos antibióticos β -lactámicos (ampicilina, amoxicilina, cefradina, cefalexin) en aguas naturales, se ha usado MEKC con detección por fluorescencia inducida por laser (LIF), incluyendo un paso previo de derivatización con sulfoindocianina succinimidil ester (Cy5) [188]. La preconcentración de los analitos en las muestras se realizó mediante SPE usando una columna de cambio catiónico,

[187] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Anal Chim Acta* 587 (2007) 208.

[188] J.M. Serrano, M. Silva, *Electrophoresis* 28 (2007) 3242.

INTRODUCCIÓN

Amberita IRA-93. Las micelas de SDS desarrollan una importante función en los pasos experimentales implicados en el proceso analítico ya que favorecen el aumento de sensibilidad y la cinética de la reacción de derivatización, eluyendo los antibióticos retenidos del sorbente de SPE y permitiendo la resolución electroforética de los Cy5-derivados en aprox. 15 min, con muy bajos LODs. También se ha usado MEKC para el análisis de al menos 6 penicilinas en muestras de aguas de granja [189]. Igualmente, con objeto de conocer la cantidad de Penicilina G administrada a un animal (como sales de procaina o benzatina) se propuso un método alternativo para separar ambas sales usando otro tampón (hidrógeno fosfato sódico 0.3 M, pH 5) distinto al óptimo para la determinación multiterresiduo.

[189] L. Nozal, L. Arce, A. Rios, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 21.

Tabla 11. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Electroforesis capilar zonal (CZE)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnicas de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Drogas de inyección	IPM, PAPM, MPM, CTM, CTX, LOMX, PIPC	Disolución en solución salina	CZE-UV (210, 280,300) nm 100 mM fofato (pH 8.0) Capilar 47 cm x 25 μ m; 30kV; 25°C	nd	(IPM: 176; PAPM: 165; MPM: 128; CTM: 94 CTX: 117 LOMX: 50 PIPC: 208) fmol	190
No muestra	CDN, CLX, CCL, CPZ, CSL, CTX, CEP, CMD, CXM, CFZN, CLT, CTRX		CZE-UV (214 nm) 100 mM fosfato (pH 6.2), 20 kV, 40 mM citrato o 260 mM MES (pH 6.2); 30kV Capilar 57cm x 50 μ m; 25°C			191
Plasma de cerdo	AMOX	C ₁₈ SPE	FASI-CZE-UV (210 nm) 20 mM tetraborato (pH 9) Capilar 70cm x 75 μ m; 15 kV; 30°C	90	280 μ g/L	192
Plasma	CDZM, CXM, CFPM, CTX	Disolución con agua 1:5	CZE-UV (200, 270 nm) 20 mM citrato (pH 6.0) Capilar 48.5cm (40 cm det) x 50 μ m; 25 kV; 30°C	nd	(CDZM: 4, CXM: 2, CFPM: 6, CTX: 2) μ g/mL	193

[190] S. Taniguchi, K. Hamase, A. Kinoshita, K. Zaitu, *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 219.

[191] C-E. Lin, H.-W., Chen, E.C. Lin, K.-S. Lin, H.-C. Huang, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 197.

Tabla 11 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Electroforesis capilar zonal (CZE)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Plasma humano	CTX, DCTX	Añadir igual vol. ACN, Vortex, Centrifugación a 11000g	CZE-UV (254 nm) 40 mM tetraborato (pH 9.2) Capilar 57cm (50 cm det) x 75 μ m; 15 kV; 25°C	nd	2 mg/L	194
Plasma de vaca	CPZ, CTF	Añadir 10% ácido perclórico, Vortex, Centrifugación On-line SPE con C ₁₈	CZE-UV (254 nm) 25mM acetato amónico (pH 7.5) Capilar 123 cm (65 cm det) x 75 μ m; -25 kV; 25 °C	90 CPZ; 57 CTF	100 ng/mL	195
Agua río	CTF	C ₁₈ SPE	C ₁₈ in-line SPE-CZE-UV (254 nm) LVSS-CZE-UV (254 nm) 25mM acetate sódico (pH 5) Capilar 55 cm (46.5 cm det) x 75 μ m; 25 kV; 25 °C	90 74	10 ng/L 100 ng/L	196
Preparación veterinaria multiantibiótico	Procaina, DHS, PENG	Dilución con agua	CZE-UV (185 nm) 0.08 M tetraborato (pH 8) Capilar 60 cm x 75 μ m; 15 kV; 35 °C	Procaina: 73.78; DHS: 163.33; PENG: 103.22	(Procaina: 0.03; DHS: 0.020; PENG: 0.0035) mg/mL	197

[192] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 309.

[193] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Schiewe, A. Härtl, *J. Chromatogr. B* 692 (1997) 321.

Tabla 11 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Electroforesis capilar zonal (CZE)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Estudios de estabilidad	OXA	Dilución con agua	CZE-UV (214 nm) 20 mM fosfato sódico (pH 6.5) Capilar 40 cm x 50 μ m; 30 kV; 25 °C	nd	0.4 μ g/mL	198
Caldo de fermentación	PENV con impurezas y productos de degradación		CZE-UV(210 nm) CZE-ESI-MS Líquido adicional: 0.1% amoniacado en 8:2 v/v 2-propanol/agua a 4 μ L/min Gas secado: nitrogeno a 150°C 1.4 L/min 20 mM acetate amónico (pH 6.5) Capilar 70 cm x 50 μ m; -20 kV; 25°C	nd	nd	199
Tejidos de aves de corral y porcinos	AMOX , siete antibióticos de distintas clases y nifursol	Añadir ACN, Agitar, Homogeneización, Macerar, Centrifugación Extracción etil acetato	CZE-UV(200 nm) 30 mM NaH ₂ PO ₄ Capilar 67 cm x 75 μ m; 25 kV; 25°C	66	15 μ g/Kg	200

[194] G. Castañeda-Peñalvo, M. Nelly, H. Maillols, H. Fabre, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1364.

[195] P. Puig, F.W.A. Temples, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, G.W. Soasen, G.J. de Jong, *J. Chromatogr. B.*, 856 (2007) 365.

[196] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Anal. Chim. Acta.* 587 (2007) 208.

[197] K. Michalska G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. B* 800 (2004) 203.

[198] S. Druart, H. Kopelent-Frank, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 28 (2005) 27.

[199] E.F. Hilder, C.W. Klampfl, W. Buchberger, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 23 (2002) 414.

[200] P. Kowalski, I. Oledzka, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937.

Tabla 11 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Electroforesis capilar zonal (CZE)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Proceso de monitorización en la manufactura de penicilinas semisintéticas	PENG, 6-APA, PAA	Dilución con agua	CZE-UV (210 nm) 30 mM tetraborato (pH 9.2) Capilar 43 cm (24 cm det) x 50 μ m; 15 kV; 30 °C	nd	nd	201
β -lactamas sintetizados enzimáticamente	CLX, PG, PGM, 7-ACA, 7-ADCA, TET-ACA	Filtración	CZE-UV (191, 265 nm) 20 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 8.50) 30 kV 40 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 7.85) 10 kV, después de 8.25 min 30 kV 40 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0) 15 kV Capilar burbuja 48.5 cm x 50 μ m; 20 °C		10 μ M	202
Leche	OXA, CLOX, DICLOX	Extracción etil acetato, secar con N ₂ , Disolver con agua, enjuagar con hexano	LVSEP-CZE-UV (206 nm) 50 mM ácido fosfórico (pH 3.6) + 5.2mM HP- β -CD Capilar 49 cm (39 cm det) x 75 μ m; - 30 kV; 25 °C	OXA: 72, CLOX: 74, DICLOX: 83	2 μ g/L	203

[201] H.B. Wan, J. Liu, K.C. Ang, S.F.Y. Li, *Talanta* 45 (1998) 663.

[202] V.A. Nierstrasz, C.G.P.H. Schroen, R. Bosma, P.J. Kroon, H.H. Beeftnik, A.E.M. Janssen, *J. Tramper, Biotechnology Techniques* 11 (1997) 899.

[203] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis*. 24 (2003) 3089.

Tabla 11 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Electroforesis capilar zonal (CZE)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Cefradina para inyección	CDN, L-arginina, CLX	No tratamiento de muestra	CZE-UV (195 nm) 50 mM hidrogeno fosfato disódico (pH 6.5) Capilar 49.5 cm (41 cm det) x 50 μ m; 20 kV; 25°C	CDN: 98.3, L-arginina: 99.75, CLX:100.0	(CDN: 5.0, L-arginina: 3.5 CLX: 1.7) μ g/mL	204
No muestra	12 β -lactámicos racémicos		CZE-UV (214 nm) 5 mM fosfato sódico (pH8.0)+154 mg/mL SAC; 6 kV 5 mM fosfato sódico (pH 8.0)+60mM SBC; 7 kV 5 mM tampón fosfato sódico (pH 8.0)+20mM CMBC; 10 kV. Capilar 37 cm (30 cm det) x 50 μ m	nd	nd	205
Peces y ganado	Cuatro sulfonamidas; cuatro β -lactámicos: AMOX, AMPI, OXA, PENV, cuatro quinolonas	Añadir ACN, SPE-dispersiva, limpieza con C ₁₈	CZE-ESI-MS, líquido adicional: 50% MeOH/agua + 1% ácido fórmico 60mM acetato amónico (pH 8)+10% methanol. Capilar 75 cm x 75 μ m; 25 kV; 20°C	71-83	(AMOX: 10, AMPI: 5, OXA: 2, PENV:10) μ g/kg	206

[204] Y. Shen, H. Liu, S. Rong, Y. Li, C. Hu, *Anal. Letters* 39 (2006) 569.

[205] C. Jiang, D.W. Amstrong, A. Peter, F. Fulop, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech* 30 (2007) 1709.

[206] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *Electrophoresis* 28 (2007) 4180.

Tabla 11 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Electroforesis capilar zonal (CZE)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Leche de vaca	AMPI, AMOX, CLOX, PENG, tetracycline, chloramphenicol	Añadir ácido tricloroacético, Vortex, Centrifugación, limpieza por SPE con C ₁₈	CZE-UV (210 nm) 2.7×10 ⁻² M KH ₂ PO ₄ , 4.3×10 ⁻² M Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 8); Capilar 58.5 cm (50 cm det) x 75 µm; 18 kV; 25 °C	AMPI: 47.35, AMOX: 11.65, CLOX: 65.65, PENG: 65, tetraciclina: 70.0, cloranfenicol: 95.7	(AMPI: 0.48, AMOX: 0.94, CLOX: 0.93, PENG: 1.09, tetraciclina: 0.78, cloranfenicol: 0.72) µg/mL	207
Farmacocinéticos en orina humana	AMOX	Añadir etilacetato, Centrifugación, secar, Disolver con agua	CZE-ECL 12 mM fosfato (pH 9.5) 5mM Ru(bpy) ₃ ²⁺ + 50mM fosfato (pH 7.5) en celda ECL, 1.2V (versus Ag/AgCl) potencial aplicado Capilar 40 cm x 75 µm; 10 kV;	95.77	0.31 ng/mL	208

Acrónimos: CMBC, carboximetil β -ciclodextrina; Dp, desproteinización; ECL, electroquimioluminiscencia; FASI, inyección de muestra de campo amplificado; HP- β -CD, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; LVSEP, apilamiento de muestra de gran volumen impulsado por flujo electrosmótico; LVSS, apilamiento de muestra de gran volumen; M, macerar; MES, 2-(N-morfolino)etanosulfonato; nd, no disponible.; R, reconstituir; Ru(bpy)₃⁺², Tris(2,2'-bipyridyl) rutenio(II); S, agitar; SAC, α -ciclodextrina sulfato; SBC, β -ciclodextrina sulfato; Tris, tris(hidroximetil)aminometano.

[207] S.M. Santos, M., Henriques, A.C., Duarte, V.I., Esteves, *Talanta* 71 (2007) 731.

[208] B. Deng, A. Shi, L. Li, Y. Kang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 1249.

Tabla 12. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Inyectables	PIPC, tazobactam	No tratamiento de muestra	MEKC-UV (214 nm) Na ₂ HPO ₄ (pH 6.2)+ 7g/L SDS Tetraborato sódico (pH 8.7) + 7g/LSDS Capilar 60cm x 75 μ m; 18 kV; 25°C	95.4- 96.3	0.01 mg/mL	209
Plasma humano	CTX, DECTX	Dilución con agua, Vortex	MEKC-UV (254 nm) 30 mM Dihidrógeno fosfato (pH 8.0) +165 mM SDS Capilar 57cm (50 cm det) x 75 μ m; 15 kV; 25°C	95.3 CTX; 96.5 DECTX	1 mg/L	210
No muestras	CLX y compuestos semisintéticos y productos de degradación		MEKC-UV (254 nm) 50 mM acetate sódico (pH 5.25)+50 mM SDS Capilar 44 cm (36 cm det) x 50 μ m; 20 kV; 25°C	nd	13.4 pg	211
Estabilidad de CAZ inyección después reconstitución	CAZ y productos de degradación	Dilución con agua	MEKC-UV (254 nm) 25 mM tetraborato sódico (pH 9.2)+150 mM SDS Capilar 64.5 cm (56 cm det) x 50 μ m; 20 kV; 25°C	nd	nd	212

[209] G. Pajchel, S. Tyski. *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 223.

[210] G. Castaneda Penalvo, M. Nelly, H. Maillols, H. Fabre, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1364.

[211] Y.M. Li, Y. Zhu, D. Vanderghinste, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Electrophoresis* 20 (1999) 127.

[212] A. Farina, R. Porrà, V. Cotichini, A. Dolbo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 251.

Tabla 12 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Microdialisis y plasma humano	CFPM	ulC (37 °C, 14000 g, 30 min) para muestras de plasma	MEKC-UV (270 nm) 20 mM citrato (pH 2.8)+ 50 mM SDS Capilar (56 cm det) x 50 μ m; 20 kV; 25°C	ulC: 95-86 adsorción unidad filtro; 88- 80 proteínas de unión plasma	0.2 μ g/mL	213
No muestra	AMPI y productos de degradación		MEKC-UV (215 nm) 40 mM dihidrógeno fosfato sódico (pH 7.5) + 100mM SDS Capilar 44 cm (36 cm det) x 50 μ m; 15 kV; 25°C	nd	3.4 pg	214
Suero humano	CXM	Centrifugación a 1350 g durante 10 min	MEKC-UV (274 nm) 20 mM fosfato y borato (pH 9)+ 150 mM SDS Capilar 57 cm x 75 μ m; 15 kV; 20°C	98-101	0.28 μ M	215
No muestra	sulfonamidas, inhibidores dihidrofolato reductasa y antibióticos β -lactámicos		MEKC-UV (205 nm) 20 mM tetraborato sódico (pH 8.5) + 100 mM SDS+ 0.5 mM EDTA Capilar 60 cm (47 cm det) x 50 μ m; 15 kV; 25°C	nd	nd	216

[213] B.X. Mayer, U. Hollenstein, M. Brunner, H.-G. Eichler, M. Müller, *Electrophoresis* 21 (2000) 1558.

[214] Y. Zhu, C. Hoogmartens, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* 22 (1999) 1403.

[215] O.-K. Choi, Y.-S. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1265.

[216] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 97.

Tabla 12 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Lotes de fármacos	PENG, AMOX, AMPI, PENV, 6-APA, CLIPHOS, LINC, CLIND, ERYTHST		MEKC-UV (205 nm) 0.10 M NaH ₂ PO ₄ +0.05 M Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 8.0) + 0.050 M SDS Capilar 80 cm (75 cm det) x 50 μ m; 18 kV;	nd	nd	217
No muestra	CDX en presencia de diez sustancias relacionadas		MEKC-UV (254 nm) 50 mM acetato (pH 5.25)+ 110 mM SDS Capilar 44 cm (36 cm det) x 50 μ m; 18 kV; 15°C	nd	7 pg	218
Preparación intravenosa timentin	TIPC, ácido clavulánico	Disolver con agua	MEKC-UV (214 nm) 0.02 M borato+ 0.02 M fosfato (pH 8.66)+ 1.44% SDS Capilar 60 cm x 75 μ m; 18 kV; 25°C	nd	0.003 mg/mL ácido clavulánico; 0.0025 mg/mL TIPC	219
Muestras comerciales de sales de sodio y potasio de PENV	PENV en presencia de sustancias relacionadas	Dilución	MEKC-UV (225 nm) 40 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.0) + 100 mM SDS Capilar 44 cm (36 cm det) x 50 μ m; 15 kV; 25°C	nd	11.8 pg	220

[217] C.L. Flurer, K.A. Wolnik, *J. Chromatogr. A* 674 (1994)153.

[218] Y.-M. Li, D. Vanderghinste, D. Pecanac, A. Van Schepdaeil, E. Roets, J. Hoogmartns, *Electrophoresis* 19 (1998) 2890.

[219] G. Pajchel, S. Tyski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 59.

[220] Y. Zhu, A. Van Schepdaeil, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 417.

Tabla 12 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Muestras comerciales de sales de sodio y potasio de PENG	PENG y sustancias relacionadas	Dilución	MEKC-UV (225 nm) 40 mM NaH ₂ P0 ₄ (pH 6.5)+150 mM SDS Capilar 44 cm (36 cm det) x 50 μ m; 12 kV; 25°C	nd	10 pg	221
No muestras	AMOX y sus impurezas		MEKC-UV (230 nm) 70 mM NaH ₂ P0 ₄ (pH 6.0) +125 mM SDS +5% ACN Capilar 44 cm (36 cm det) x 50 μ m; 15 kV; 25°C	nd	3.3 pg	222
Preparaciones de Cefalosporinas para inyección	CPZ, CAZ, CTX,CXM, CFZN, CTRX	Dilución	MEKC-UV (214 nm) 3.12 g/L hidrogenofosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)+ 7.63 g/L borato sódico (pH 6.5) +10 g/L SDS +17.4 g/L ácido pentanosulfónico Capilar 60 cm x 75 μ m; 18 kV; 25°C	nd	nd	223

[221] Y. Zhu, J. Dalle, A. Van Schepdaeil, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 83.

[222] Y.-M. Li, A. Van Schepdaeil, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 227.

[223] G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 27.

Tabla 12 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Validación del método CE en comparación con HPLC	CDN, CLX		MEKC-UV (214 nm) 0.02 M borato-phosphato (pH 9.0) +0.05 M SDS+0.1% Brij 35 Capilar 57 cm (50 cm det) x 75 μ m; 20 kV; 25°C	nd	0.526 μ g/L CLX	224
Fármacos orales	Sultamicilina	Disolver con fase mobil	MEKC-UV (214 nm) 0.02 M borato-phosphato (pH 8.7) +1.4% SDS 0.02 M borato-phosphato (pH 7) +1% SDS Capilar 60 cm x 75 μ m; 18 kV; 25°C	nd	0.01 mg/mL	225
Fármacos para inyecciones	AMOX y ácido clavulánico AMPI y Sulbactam	nd	MEKC-UV (214 nm) 0.02 M borato-phosphato (pH 8.66) +1.44% SDS Capilar 60 cm x 75 μ m; 18 kV; 25°C	AMOX: 74.39, AMPI: 63.82 Ácido clavulánico: 13.90, Sulbactam: 30.45	(AMOX, AMPI:0.4, ácido clavulánico: 0.3, Sulbactam: 0.7) μ g/mL	226

[224] P. Emaldi, S. Fapanni, A. Baldini, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 339.

[225] G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 315.

[226] G. Pajchel, K. Pawlowski, S. Tyski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 75.

Tabla 12 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Fármacos	PENV y sus impurezas		MEKC-UV (214 nm) 0.02 M phosphato-borato (pH 6.3)+ 69 mM SDS+12.5 mM PS Capilar 60 cm (52 cm det) x 75 μ m; 15 kV; 25°C	nd	2 μ g/mL	227
Muestras de agua de una granja de cerdos	AMOX, AMPI, PEN G, OXA, PEN V, CLOXA	Filtración	MECK-UV (210 nm) 40mM borato sódico (pH 8.5)+100 mM SDS Capilar 57cm (50 cm det) x75 μ m;10 kV; 20 °C.	96-112	0.14- 0.27 μ g/ml	228
No muestras	AMOX, AMPI, PENG,PENV, NAFCl, OXA, CLOX, DICLOX		REPSM-MECK-UV (210 nm) 20 mM borato sódico (pH 8.0) +60 mM SDS Capilar 64 cm x 75 μ m; 15 kV; 25°C	nd	(AMOX: 25, AMPI, NAFCl: 15, PENG, OXA, PENV, CLOX, DICLOX: 5) μ g/L	229
Agua ambiental	AMPI, AMOX, CDN, CLX	SPE con Amberlite IRA-93 Derivatización con sulfoindocianina succinimidil ester	MECK-LIF (635 nm) 35 mM borato sódico (pH 9.3) +15 mM SDS Capilar 57 cm (50 cm det) x 50 μ m; 15 kV;25°C	AMPI: 97.1; CLX: 97.9; AMOX: 96.4 CDN: 99.4	AMPI, CDN: 30 ng/L AMOX, CLX: 45 ng/L	230

[227] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, *J. Chromatogr A.* 1087 (2005) 197.

[228] L. Nozal, L. Arce, A. Rios, M. Valcarcel, *Analytica Chimica Acta* 523 (2004) 21.

[229] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis* 26 (2005) 954.

[230] J.M. Serrano, M. Silva, *Electrophoresis* 28 (2007) 3242.

Tabla 12 (Cont.). Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de detección	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Secreción bronquial	CFZN, CMD, CXM, CAZ, CTRX, CFM	Liofilización Disolver metanol-agua (1:1), Centrifugación	MEKC-UV (270 nm) 25 mM borato (pH 9.1)+ 50mM SDS Capilar 48 cm (40 cm det) x 50 μ m; 20 kV; 14°C	97.8	0.42-0.84 μ g/mL	231
No muestras	PENG, procaína, benzatina, clemizol		MEKC-UV (214 nm) 3.12 g/L hidrogenofosfato di-sódico (Na ₂ HPO ₄)+ 7.64 g/L borato sódico (pH 8.7) +14.4 g/mL SDS Capilar 60 cm (52 cm det) x 75 μ m; 18 kV; 25°C	PENG: 98.73 Procaína: 96.92 benzatina: 99.94; clemizol:	(PENG: 0.001; Procaína y benzatina: 0.02; clemizol: 0.0004) mg/mL	232

[231] M. Andrasi, A. Gaspar, A., Klekner, J. *Chromatogr. B* 846 (2007) 355.

[232] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, J. *Chromatogr. A* 1032 (2004) 265.

Tabla 12 (Cont.). *Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)*

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de detección	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Fármacos	Ertapenem, impurezas y productos de degradación		NSM-MEKC-UV (214 nm) 60 mM dihidrógeno fosfato sódico-20 mM ácido bórico (pH 6.0)+80 mM SDS Capilar de sílice no recubierto 60 cm (52 cm det) x 75 μ m SRMM-MECK-UV (214 nm) 40 mM dihidrogeno fosfato sódico-20mM ácido bórico (pH 6.0)+50 mM SDS Capilar con recubrimiento neutro 40 cm (32 cm det)x75 μ m			233

Acrónimos: Dt, detección; DTAB, bromuro de dodeciltrimetilamonio; GDC, glicodeoxicólico; LIF, Fluorescencia inducida por laser; MC, micelar; ME, microemulsión; NSM, apilamiento en modo normal; PS, ácido pentanosulfónico sal sódica; REPSM, apilamiento de muestra con polaridad inversa; SDS, dodecil sulfato sódico; SRMM, apilamiento de muestra con migración inversa de micelas; ulC, ultracentrifugation.

[233] K. Michalskaa, G. Pajchela, S. Tyskia, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2934.

Tabla 13. Otros modos de separación de antibióticos β -lactámicos

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
No muestra	CFZN, CPZ, CLX		REPSM (alto pH)-MEECK-UV (254 nm) SRMP (bajo pH)-MEECK-UV (254 nm) 0.5% etil acetato, 1.2% 1-butanol y 0.6% SDS (10 mM tetraborato a pH 9.4 y 5 mM phosphato a pH 2) Capilar 45 cm (36.5 cm det)x 75 μ m, 25 $^{\circ}$ C; 8 kV alto pH; -20 kV bajo pH	nd	REPSM (CFZN, CPZ: 30, CLX: 40) μ g/L SRMP (CFZN, CPZ: 40, CLX: 50) μ g/L	234
No muestra	nitroimidazoles, CEP, tetraciclinas.		MEEKC-UV (280 nm) 50 mM acetate amónico (pH 8.5)+150 mM SDS+ 10% hexano Capilar 37cm x 75 μ m, 12 kV, 25 $^{\circ}$ C	nd	nd	235
Fármacos con AMOX	AMOX, AMPI, PENG,PENV, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX	Disolver, Dilución, Filtración	REPSM-MEEKC-UV (210 nm) 0.5% etil acetato, 1.2% 1-butanol, 2% Brij 35, 10% 2-butanol y 86.3% 10 mM tampon borato (pH 10) Capilar 45cm (36.5 cm det)x75 μ m; 10 kV, 25 $^{\circ}$ C	103	AMOX, PENG, DICLOX: 25 μ g/L AMPI, PENV, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX: 10 μ g/L	236

[234] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Chromatographia*, 62 (2005) 603.

[235] L. Nozal, L., Arce, B.M. Simonet, A., Rios, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 27 (2006) 4439.

[236] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 196.

Tabla 13 (Cont.). *Otros modos de separación de antibióticos β -lactámicos*

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
No muestra Caracterización de la partición	CFM, CFPM, CLR, CLX, CCL, CXM, CTX		MEKC/MEEKC-UV (265 nm) MC: 10 mM fosfato (pH 7.0)+SDS o GDC o DTAB ME: 10 mM fosfato (pH 7.0)+1-butanol/n-heptano+SDS o GDC o DTAB Capilar 48.5 cm (40 cm det) x 50 μ m; 30 kV; 25°C	nd	nd	237
Leche cruda	AMPI, tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, y eritromicin	Añadir ácido fosfórico 85%, Agitar,Centrifugación,Filtración, después de 30 min Filtración, Centrifugación a 10000g	CEC-UV (210 nm) 0.03 M ácido acético (pH 4.41)+ 0.0375 M γ ácido aminobutírico OTC capilar modificado químicamente con cristal líquido CPB, 50 cm (25 cm det) x50 μ m; 20 kV	nd	nd	238

[237] Y. Mrestani, N- E-Mokdad, H.H. Rüttinger, R. Neubert, *Electrophoresis* 19 (1998)2895.

[238] J. Pesek, M. Matyska, T., Bloomquist, G. Carlon, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 28 (2005) 28 3015.

Tabla 13 (Cont.). Otros modos de separación de antibióticos β -lactámicos

Muestra	Analito	Tratamiento de muestra	Técnica de determinación	Recuperaciones (%)	LODs	Ref.
Muestras terapéuticas comerciales	PENG, PENV, AMPI, AMOX, OXA, CBPC, CPLC, CTX, CFZN, CFX, 6-APA, 7-ACA, PAA, POA	Disolver con agua / agua-etanol (1:1, v/v)	ITP-UV(254 nm)/ Conductividad <i>Systema A:</i> Electrolito frontal 5 mM HCl (pH 7.0) por adición de Tris, y 0.25 g % HPMC. Electrolito terminal 10 mM fenol (pH 10.0) por la adición de hidróxido de bario <i>Systema B:</i> Electrolito frontal 10 mM HCl (pH 4.0) por adición de 13-alanina, y 0.25 g % HPMC. Electrolito terminal 10 mM ácido hexanoico. Capilar 23 cmx 0.5 mm;	>95%	nd	239

Acrónimos: CEC, electrocromatografía capilar; CPB, 4-ciano-4'-n-pentoxi-1-1'-bifenil; Dt, detección; DTAB, bromuro dodeciltrimetilammonio; GDC, glicodeoxicólico; ITP, Isotacoforesis capilar; MC, micelar; ME, microemulsión; MEEKC: Cromatografía electrocinética microemulsión; OTC, columna abierta tubular; REPSM, Modo stacking con polaridad reversa; SDS, dodecil sulfatosódico; SRMP, stacking con migración pseudoestacionaria reversa.

[239] D. Tsikas, A. Hofrichter, G. Brunner, *Chromatographia* 30 (1990) 657.

Si se encuentra un pico perteneciente a penicilina G al analizar una muestra real usando el método multirresiduo, entonces la misma muestra se vuelve a analizar usando el método alternativo con objeto de discernir entre las sales de procaina o de benzatina. La determinación de penicilinas en muestras ambientales se llevó a cabo sin ningún paso previo de preconcentración ya que el objetivo fue proponer un método en CE de barrido para penicilinas. Los LODs para este método podrían mejorarse mediante la incorporación de una etapa previa de SPE con objeto de preconcentrar los analitos.

En relación al análisis de alimentos, residuos de algunas isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina) a niveles traza se han detectado en muestras de leche por CZE-UV/Vis [240]. Este método implica la aplicación de un proceso de preconcentración on-line denominado “apilamiento de muestra de gran volumen usando el impulso del flujo electrosmótico” (large volume sample stacking using the EOF pump, LVSEP) y el uso de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) como aditivo del tampón para formar complejos de modo selectivo. LVSEP mejoró considerablemente la sensibilidad. Considerando la relación entre la concentración de CD y el tiempo de migración, se calcularon las constantes de asociación para las isoxazolilpenicilinas enlazadas con HP- β -CD, siendo 27.3, 34.9, y 48.5 M⁻¹, para oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina, respectivamente.

Como puede observarse en las Tablas, el acoplamiento CE-MS ha sido escasamente usado en la determinación de antibióticos β -lactámicos, pudiendo encontrar algunos métodos multirresiduo que incluyen otros compuestos de distintas familias.

[240] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.

4.4.3. MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS

Como ya se ha indicado en el apartado anterior, las técnicas cromatográficas se aplican extensamente para el análisis de antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes. En general, los métodos desarrollados se caracterizan por la complejidad de todo el proceso analítico involucrado, que supone disponer de laboratorios con personal técnico cualificado. Además, la realización de análisis *in situ*, tanto en campo como en una línea de fabricación, es complicada. A ello se han de añadir los elevados costes del sistema y su mantenimiento. Por otro lado, el proceso de análisis es lento, ya que se requiere una etapa previa de tratamiento de muestra que limita la utilidad práctica de las técnicas cromatográficas en grandes explotaciones ganaderas y estaciones de control medioambiental en las que se requieren procedimientos que permitan garantizar el cumplimiento de las normativas vigentes en el menor tiempo posible.

Para llevar a cabo este control, se requieren métodos sensibles, selectivos, rápidos, automatizables, económicos y fáciles de usar. Todo ello ha generado la necesidad de poner a punto métodos alternativos para la detección de residuos de antibióticos, como son los clásicos ensayos de inhibición microbiana e inmunoensayos [241] y otros desarrollados más recientemente como los sensores [242], “*kit*” de ensayos químicos y equipos de laboratorio miniaturizados.

4.4.3.1. Métodos basados en Ensayos de Barrido (Test de Screening)

La importancia y el potencial de estos ensayos se ponen de manifiesto en el considerable incremento de trabajos científicos relacionados con estas metodologías analíticas en los últimos veinte años.

[241] W.A. Moats, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1.

[242] G.E. Pellegrini, G. Carpico, E. Coni, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 13.

INTRODUCCIÓN

El interés de estos métodos analíticos es doble: en primer lugar, por la necesidad de abaratar los costes de los programas de vigilancia y control; en segundo lugar, por la necesidad de conocer el origen, vías de distribución y destino de los contaminantes que pueden ser perjudiciales para la salud y el medio ambiente. Un **ensayo de barrido** o **test de screening** se define como “*aquel método analítico que es capaz de llevar a cabo la selección de aquellas muestras cuyo contenido es similar o mayor que uno previamente establecido como umbral*” [243]. Por lo tanto, la aplicación de estos métodos permite identificar las muestras que probablemente están contaminadas las cuales serán sometidas a un análisis más exhaustivo permitiendo determinar la presencia cualitativa y cuantitativa fiable del residuo mediante un método analítico validado que, en la mayoría de los casos, es cromatográfico. En la Figura 20 se muestra el esquema de funcionamiento de los ensayos de barrido.



Figura 20. Esquema de aplicación de los ensayos de barrido.

[243] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.

4.4.1.3.2. *Características de los Ensayos de Barrido*

Entre las ventajas de los ensayos de barrido cabe destacar su rapidez, simplicidad y minimización de errores debido a la ausencia o aplicación de procedimientos sencillos de tratamiento de muestra. Otros factores son el ahorro de tiempo y dinero, ya que sólo las muestras que proporcionan una respuesta positiva al ensayo necesitarán ser confirmadas con otra técnica más sofisticada. Las características fundamentales que diferencian los análisis convencionales de los ensayos de barrido se resumen en los siguientes puntos:

- La respuesta que proporciona el ensayo permite tomar una decisión inmediata.
- Los resultados obtenidos mediante estos métodos a menudo necesitan ser confirmados mediante técnicas convencionales.
- Suelen proporcionar respuestas, fundamentalmente, cualitativas aunque, en menor medida, también pueden suministrar medidas cuantitativas.
- Requieren un escaso o nulo pretratamiento de muestra.
- Son ensayos rápidos.

No obstante, no es necesario que los métodos puestos a punto presenten todas estas características. Tan sólo es necesario definirse por tres de ellas para que un método analítico pueda ser considerado un ensayo de barrido. Asimismo, una de las características más relevantes de estos procedimientos es el tipo de respuesta binaria que proporcionan, esto es SI/NO, que resalta su carácter cualitativo. No obstante, hay que considerar que muchos de estos ensayos, como sucede para la mayoría de los sensores, poseen la capacidad de proporcionar resultados cualitativos y también cuantitativos con óptimos valores de precisión y exactitud. Por otro lado, del mismo modo que los resultados obtenidos mediante los métodos convencionales llevan asociados una incertidumbre debida al proceso de análisis, los ensayos que proporcionan respuestas binarias también se encuentran sometidas a errores, denominados:

- **Falsos negativos.** Se producen cuando el resultado del test es NO pero debería ser SI. Ejemplo de esta circunstancia sería que una muestra de leche que contuviera residuos de antibióticos produjera una respuesta negativa en el ensayo, considerándose por tanto apta para consumo.
- **Falsos positivos.** Se producen cuando el resultado del test es SI pero debería ser NO. Ejemplo de ello sería una muestra de leche que no contuviera ningún antimicrobiano y sin embargo el ensayo confirmase la presencia de dichos analitos.

4.4.1.3.3. *Clasificación de los Ensayos de Barrido*

Los ensayos de barrido o “*test de screening*” pueden ser clasificados atendiendo a una gran variedad de criterios, que se recogen en la Tabla 14. Además de en función de estos criterios, los ensayos de barrido también pueden clasificarse:

- En función del tipo de **sistema de detección**: ópticos, electroanalíticos, de masas, etc..
- Según el **formato de ensayo**, podemos encontrar “*kits*”, sensores de ensayo, etc..

Tabla 14. Clasificación de los ensayos de barrido (test de screening) [244].

TIPO DE RESPUESTA BINARIA	Ensayos discriminatorios Proporciona información individualizada de un analito o grupo de analitos
	Ensayos globales Proporciona información de varias especies considerándola como un único Conjunto
RELACIÓN SEÑAL-ANALITO	Ensayos directos La señal analítica esta directamente relacionada con el analito
	Ensayos indirectos La señal analítica esta relacionada con el producto de una reacción química, bioquímica o inmunológica
ESTADO AGREGACIÓN DE LAS MUESTRAS	Ensayos para muestras líquidas
	Ensayos para muestras gaseosas
	Ensayos para muestras sólidas
TRATAMIENTO DE MUESTRA	Ensayo directo El más simple y la que mejor se ajusta a la definición de ensayo de barrido ya que no se realiza tratamiento previo de la muestra
	Ensayo con pretratamiento simple Se realiza un pretratamiento de muestra pero es rápido y simple
	Ensayo con pretratamiento exhaustivo Su aplicación sólo está justificada en el caso de que los métodos convencionales de análisis supongan un coste económico excesivo
SISTEMA DE DETECCIÓN	Ensayo con detección idéntica La más simple y la que mejor se ajusta a la definición de ensayo de barrido ya que no se realiza tratamiento previo de la muestra
	Ensayo con detección diferente Se realiza un pretratamiento de muestra, pero es rápido y simple

[244] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.

4.4.1.3.4. *Ensayos de Barrido para Antibióticos β -Lactámicos*

La necesidad de establecer normativas con LMRs cada día más bajos, así como la existencia de programas de vigilancia y control de residuos más rigurosos, ha originado una demanda creciente de métodos para la detección de antimicrobianos en muestras medioambientales y, especialmente, en productos alimentarios. Para satisfacer estas necesidades, se han desarrollado distintas metodologías basadas en ensayos de barrido, algunas de las cuales se han comercializado, que presentan suficiente sensibilidad para el análisis de antibióticos β -lactámicos en tejidos biológicos, miel, pescados, orina, huevos, leche, agua, etc.. Los métodos basados en ensayos de barrido para la determinación de antibacterianos se pueden dividir en dos grandes grupos: **métodos microbiológicos y métodos inmunoquímicos.**

4.4.1.3.4.1 *Métodos Microbiológicos*

4.4.1.3.4.1.a. *Ensayos de inhibición microbiana*

Fueron los primeros métodos utilizados para la detección de antimicrobianos. Se basan en la inhibición del crecimiento bacteriano debido a la presencia de antibióticos. Las principales ventajas de estos dispositivos es su capacidad de adaptación al análisis de un gran número de muestras, su facilidad de manejo y sus bajos costes. Sin embargo, poseen la desventaja de ser poco selectivos y de respuesta poco rápida (tiempos de incubación de más de dos horas). Algunos de estos kits comerciales basados en esta respuesta biológica son:

- **Delvotest-P®** (DCM-Gist Brocades), introducido en los años 70 por Os y col. El sistema emplea un microorganismo, *Bacillus stearothermophilus*, que se encuentra encapsulado en un medio de cultivo agar que contiene un indicador de pH; el nutriente y la muestra se adicionan simultáneamente en el momento

de la medición. La ausencia de antibiótico implica un cambio de color del indicador ya que con el crecimiento bacteriano se produce una disminución del pH del medio. La sensibilidad para penicilina G es de 3 µg/L.

- **Delvotest-SP®** (DSM-Gist Brocades), de desarrollo más reciente, se diferencia de su predecesor en que es capaz de detectar un mayor espectro de antibacterianos, en especial las sulfonamidas. La sensibilidad de este ensayo para penicilina G se encuentra establecido en 2.5 µg/L. La última versión del dispositivo Delvotest es el **Delvotest® MCS** (DSM-Gist Brocades) que en Francia es utilizado, desde el año 2001, como método oficial para la detección de residuos de antibióticos en leche de vaca.

Aunque Delvotest es el ensayo de inhibición microbiana más empleado, existen otros muchos sistemas de detección comercializados: **Charm AIM-96** y **BsDA** (Charm Sciences Inc.), **Brilliant Black Reduction Test** (BR-test, 1967), mejorado por Müller en 1990, **Valio T101-test** (1990), **CMT – Copan Milk Test** (Copan Diagnosis Inc.) y **Premi®test** (DSM-Gist Brocades), desarrollado para el análisis de antibióticos de amplio espectro en muestras de pescado, huevos, miel, orina, etc..

En la Tabla 15 se muestran los límites de detección alcanzados por algunos ensayos de inhibición microbiana para antibióticos β-lactámicos. La posibilidad de desarrollar sistemas automáticos basados en ensayos de inhibición microbiana es muy limitada y, actualmente, es difícil encontrar un dispositivo de estas características [245].

[245] S. Stead, M. Sharman, J.A. Tarbin, E. Gibson, S. Richmond, J. Stark, E. Geijp, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 216.

Tabla 15. Límites de detección ($\mu\text{g/L}$) declarados por las casas comerciales de algunos ensayos de inhibición microbiana para antibióticos β -lactámicos en leche.

Ensayo	Antibiótico β -lactámico						
	Penicilina G	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Nafcilina
Delvotest P (2½ h)	3	5 – 6	5	10 – 15	25	20	10
Delvotest SP (2¾ h)	2.5	3 – 4	3 – 4	10	15 – 25	10 – 15	5 – 8
Delvotest MCS	2.4	-	-	-	-	-	-
Charm AIM - 96	4	4	6	30	50	30	-
Charm Farm V/MV	3 – 4	4	4	-	-	-	-
BsDA	4	-	5	-	35	-	-
Valio T101	2 – 4	30 – 50	10 – 30	150 – 200	100 – 150	-	-
CMT	1 – 2	2 – 4	< 2	5 – 10	10 – 15	10 – 15	5 – 10
BR-test	1	-	1	-	40	-	-

4.4.1.3.5. Ensayos de receptores

En los últimos quince años y paralelamente a los ensayos tradicionales de inhibición microbiana, se ha producido un incremento notable en el desarrollo de métodos basados en la utilización de receptores proteicos para la determinación de antibióticos.

Estos ensayos se basan en la unión del antibiótico a una proteína específica alojada en la matriz de una membrana o situada en células microbianas. Se trata de métodos más versátiles que los ensayos de inhibición microbiana y, en principio, se pueden aplicar a la determinación de diferentes residuos de antibióticos en una gran variedad de matrices. Al igual que en el caso anterior, también existe una gran diversidad de dispositivos comerciales basados en este tipo de reconocimiento: **Charm I test** (Charm Sciences Inc.) permite la detección exclusiva de antibióticos β -lactámicos, fue el primer test de ensayo rápido reconocido por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, del inglés “*The Association of Official Analytical Chemists*”), con un tiempo de ejecución de quince minutos. Con el tiempo, Charm I se ha ido mejorando con nuevas versiones como son **Charm II test**, que permite la detección de tetraciclinas, sulfonamidas, amfenicoles además de los β -

lactámicos y, la última versión, **Charm SL β -lactam test** [246], que se caracteriza por ser un dispositivo robusto, estable, selectivo y, prácticamente, sin problemas de interferencias.

En una encuesta realizada en cuatro países europeos: España, Suecia, Suiza y Francia, en el marco del proyecto CREAM (Ref. QLK-1999-00902), se ha encontrado que los ensayos más utilizados en granjas de producción láctea son el **Delvotest-SP®** y el **Charm AIM-96**. Otro ensayo disponible hoy en día para la detección de antibióticos es el **Betastar® test** (UCB Bioproducts) que emplea un receptor específico para β -lactamas que se encuentra unido a partículas de oro. El análisis se realiza mediante tiras reactivas detectando penicilinas y cefalosporinas con alta sensibilidad tras ocho minutos de incubación.

El **Delvo-X-Press** y **SNAP β -lactam** (IDEXX Laboratories) son ensayos de receptores en donde la detección se realiza gracias a una reacción enzimática. El método está basado en un ensayo heterogéneo con formato competitivo indirecto (“*enzyme-linked receptor-binding assay*”) en el que los residuos β -lactámicos compiten con penicilina G, ligada a un soporte, por una proteína fijadora de penicilina (PBP) marcada con la enzima peroxidasa de rábano (**HRP**, del inglés “*horse radish peroxidase*”).

Paralelamente al desarrollo de estos dispositivos comerciales, se han descrito numerosos sensores que utilizan el mismo sistema de reconocimiento debido al gran interés que suscita la aplicación analítica de métodos automáticos de análisis. Los avances en estas líneas de investigación han sido posibles debido a la rapidez con la que se realiza la unión del inhibidor a la

[246] R.S. Salter, D. Legg, N. Ossanna, C. Boyer, J. Scheemaker, R. Markovsky, S.J. Saul, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 29.

proteína específica (< 20 min), que contrasta con los tiempos necesarios para la obtención de resultados en los ensayos de inhibición microbiana (> 120 min). Varios autores han descrito en los últimos años biosensores basados en los ensayos de receptores. En este sentido, Gustavsson y col. [247] han desarrollado un biosensor para el análisis de antibióticos β -lactámicos en leche usando como proteína fijadora de β -lactámicos la enzima *DD*-carboxipeptidasa (R39).

4.4.1.3.6. *Ensayos enzimáticos*

Aunque también están basados en la unión del antibiótico a un receptor proteico, se denominan ensayos enzimáticos a aquellos basados en la medida de la inhibición, por parte de los antibióticos, de la enzima *DD*-carboxipeptidasa, involucrada en la síntesis de la pared bacteriana. Entre los dispositivos comerciales basados en este tipo de ensayos, el más utilizado es el **Penzym**[®] (SmithKline Beecham). Actualmente, se encuentran en el mercado los dispositivos **Penzym**[®]100 y **Penzym**[®] S 100 que permite alcanzar menores límites de detección y tiempos de análisis inferiores a 20 minutos.

En la Tabla 16 se recogen los límites de detección de algunos receptoensayos y ensayos enzimáticos para antibióticos β -lactámicos.

[²⁴⁷] E. Gustavsson, P. Bjurling, J. Degelaen, Å. Sternesjö, *Food Agric. Immunol.* 14 (2002)121.

Tabla 16. Límites de detección ($\mu\text{g/L}$), declarados por los fabricantes de algunos receptoensayos y ensayos enzimáticos para antibióticos β -lactámicos en leche.

Ensayo	Antibiótico β -lactámico						
	Penicilina G	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Nafcilina
Betastar [®]	2 – 4	2 – 4	2 – 5	5 – 10	5 – 10	5 – 10	8 – 20
Charm SL β -L	2	5	4	30	30	20	30
Delvo-X-Press	2 – 4	4 – 8	4 – 8	-	30 – 40	-	-
SNAP β -lactam	≤ 4	-	-	-	-	-	-
Penzym 100	4 – 6	4 – 6	4 – 7	30 – 50	60 – 100	-	-
Penzym S 100	2 – 4	3 – 4	3 – 4	20 – 30	30 – 70	-	-

Hasta el momento no se han publicado muchos trabajos sobre el desarrollo de sensores basados en este mismo principio de medida. No obstante, Gustavsson y col. [248] han descrito un biosensor basado en medidas SPR para la determinación de β -lactámicos en leche basado en la medida del grado de inhibición producido en la reacción de hidrólisis del tripéptido (Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) en el dipéptido (Ac-L-Lys-D-Ala) por parte de la enzima DD-carboxipeptidasa en presencia del antibiótico (ver Figura 13c). Este biosensor presenta un límite de detección de $2.6 \mu\text{g/Kg}$, con una incertidumbre entre 7.3 – 16% ($n = 3$). Alternativamente a los ensayos enzimáticos basados en la inhibición de la D-carboxipeptidasa, se han descrito otros métodos enzimáticos utilizando como elemento de reconocimiento biológico β -lactamasa (penicilinasas) o penicilina G-amidasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces amida del antibiótico generando los ácidos penicilínico y 6-aminopenicilánico (6-APA), respectivamente. El principio de medida de este tipo de dispositivos está basado en cuantificar el cambio de pH producido por los ácidos formados mediante los transductores de pH adecuados: sensores electroquímicos, sensores ópticos, capacitivos, etc...

[248] E. Gustavsson, P. Bjurling, Á. Sternesjö, *Anal. Chim. Acta.* 468 (2002) 153.

4.4.1.4. Métodos Inmunoquímicos

Engloban todas aquellas herramientas analíticas que utilizan como principio básico de medida la interacción anticuerpo-antígeno (Ab-Ag).

Los **inmunoensayos** o **técnicas inmunoanalíticas** tienen su origen en química clínica. El primer método inmunoanalítico cuantitativo, un radioinmunoensayo (**RIA**) para el análisis de insulina humana a niveles de picogramos, fue descrito por Yalow y col. en 1959 [249].

Los métodos inmunoquímicos son muy selectivos, gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo y, además, presentan otras ventajas como son la rapidez de análisis, su facilidad de ejecución, sensibilidad así como el bajo coste necesario para su aplicación. El principal inconveniente de este tipo de ensayos es la baja estabilidad de los reactivos biológicos empleados y la disponibilidad limitada de algunos de ellos.

Recientemente, se ha incorporado un nuevo dispositivo comercial basado en un inmunoensayo fluorescente con formato competitivo denominado **Parallux™ Beta Lactam Assay System** (IDEXX). El sistema ha sido aplicado satisfactoriamente a la determinación de penicilina G, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cepapirina y ceftiofur en muestras de leche caracterizándose por su alta sensibilidad (límites de detección para los seis β -lactámicos comprendidos entre 2.9 - 33.8 $\mu\text{g/L}$), y ausencia de interferencias derivadas de la presencia de células somáticas (1.10^6 cel./mL).

En la Tabla 17 se recogen los límites de detección que se obtienen con algunos dispositivos inmunoquímicos que actualmente se pueden encontrar en el mercado.

[249] R.S. Yalow, S.A. Berson, *Nature* 184 (1959) 1648.

Tabla 17. Límites de detección ($\mu\text{g/L}$) declarados por los fabricantes de algunos inmunoensayos comerciales para el análisis de antibióticos β -lactámicos en leche.

Ensayo	Antibiótico β -lactámico						
	Penicilina G	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Cefapirina	Ceftiofur
Beta-sreen®	2	12	4	25	25	-	-
CiteProbe	5	10	10	-	100	5	10
CTII test	2.5	5	5	-	20	5	5
LacTek	5	4	5	4	10	10	100
EZ-Screen	-	-	-	-	-	-	-
Spot test	3.7	-	-	-	62.5	15	-

Finalmente cabe destacar que, aunque la mayoría de los ensayos de barrido desarrollados están orientados a la determinación de residuos de antibióticos en muestras de leche, algunos de ellos se han adaptado al análisis de otras matrices (miel, carne, aguas, etc.).

CAPÍTULO I

“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA
MICELAR EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS”

1. INTRODUCCIÓN

El presente capítulo tiene como principal objetivo poner de manifiesto las posibilidades de la electroforesis capilar (CE) en la determinación de antibióticos β -lactámicos para control de calidad de productos farmacéuticos. Para ello, se propone un método para la cuantificación de nueve compuestos de gran aplicación en medicina humana y veterinaria: Penicilina G (PENG), Penicilina V (PENV), Ampicilina (AMPI), Piperacilina (PIPE), Amoxicilina (AMOX), Cloxacilina (CLOXA), Oxacilina (OXA), Dicloxacilina (DICLOX) y Nafcilina (NAFCI) pertenecientes a la familia de las penicilinas, los cuales son susceptibles de ser detectados en la región UV-visible, siendo la metodología empleada en este capítulo la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC). La optimización de variables se llevará a cabo combinando las estrategias univariante y multivariante; en este último caso, para el estudio de algunas variables que pudieran presentar ciertas interacciones, tales como el pH o la concentración de disolución tampón, concentración del medio micelar o el voltaje y la temperatura de separación. El método se caracterizará mediante los correspondientes parámetros de calidad y se aplicará al análisis de estos antibióticos en preparados farmacéuticos.

Para el desarrollo de este método se siguieron las siguientes etapas:

- Optimización de la separación electroforética
- Optimización de los parámetros en modo MEKC
- Establecimiento de las rectas de calibrado y parámetros de calidad

- Aplicación del método al control de calidad de preparados farmacéuticos.

2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL y MUESTRAS

Todos los reactivos y disolventes usados fueron de grado analítico. El hidróxido sódico y el tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) fueron suministrados por Panreac-Química (Barcelona, España), el ácido clorhídrico por Scharlaub (Barcelona, España) y el dodecil sulfato sódico (SDS) por Sigma (St.Louis, MO, EEUU).

Los analitos: amoxicilina, ampicilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, piperacilina, penicillina G y penicillin V y el patrón interno, el ácido p-aminobenzoico (PABA) fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU).

El agua utilizada (18.2 MΩ/cm) se desionizó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

Las disoluciones patrón (1000 mg/L) de cada analito se prepararon disolviendo la cantidad adecuada en agua desionizada. Estas disoluciones se almacenan en refrigerador en frasco de vidrio color topacio, preservándolas de la luz. Bajo estas condiciones fueron estables durante al menos dos meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon antes de la medida diluyendo alícuotas de las anteriores con agua desionizada.

En cuanto a las muestras seleccionadas para comprobar la veracidad del método, los preparados farmacéuticos cápsulas *Orbenin*, comprimidos

Britapen e inyectables *Veterín-Micipen*, fueron adquiridos en una farmacia local (Granada, España).

3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Los experimentos de CE se realizaron en un instrumento HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) equipado con detector de diodos en fila que operó a 220 nm con un ancho de banda de 16 nm. La separación se llevó a cabo en capilares de sílice fundida con una longitud total de 64.5 cm y un diámetro interno de 50 μm y de 75 μm , comprados a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

Los datos se trataron con el programa HP ChemStation, versión A.09.01.

Se utilizaron los programas Excel (Microsoft) y StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD) [250] para procesar los datos.

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España).

4. PROCEDIMIENTO ELECTROFORÉTICO PROPUESTO

Los analitos se monitorizaron a 220 nm con un ancho de banda de 16 nm. La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida 64.5 cm \times 75 μm i.d. (longitud efectiva 56.5 cm) en modo normal y aplicando un voltaje de 20 kV.

La inyección de la muestra se hizo hidrodinámicamente aplicando 50 mbar durante 5 s. La temperatura del capilar fue de 30°C.

[250] *STATGRAPHICS 5.0* Statistical Graphics Corporations, Rockville, MD, 2000.

Los capilares nuevos se acondicionaban con una disolución de NaOH 1 M durante 20 minutos, seguido de agua Milli-Q durante otros 20 min. y finalmente con tampón electroforético por 30 min. Al principio de cada día, el capilar se pre-acondicionaba durante 5 minutos con una disolución de NaOH 0.1 M, 5 min. con agua Milli-Q y 5 min. con tampón electroforético. Después de cada análisis, el capilar se acondicionaba durante 2 min. con NaOH 0.1 M, 2 min. con agua Milli-Q y 2 min. con tampón electroforético para mantener una adecuada repetibilidad entre análisis.

El tampón electroforético, una vez optimizado, consistía en una disolución acuosa 26 mM de tetraborato sódico con 100 mM de SDS, ajustado a pH 8.5 con ácido clorhídrico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES

La optimización de parámetros instrumentales consiste en la selección de los valores de estos parámetros que generen la mejor respuesta para cada compuesto, en relación a una adecuada resolución de los picos electroforéticos correspondientes a los diferentes analitos en estudio y mayor sensibilidad. El estudio se realizó empleando inicialmente un capilar de 50 μm de diámetro interno y longitud total de 64.5 cm (longitud efectiva hasta el detector = 56.5 cm).

5.1.1.1. Inyección de la muestra

Para la inyección de muestra se seleccionó el modo de inyección hidrodinámica, que es el más empleado, porque no hay diferencias en la inyección en función de la concentración de moléculas que presenten diferentes movilidades, como ocurre en la inyección electrocinética. Por otra parte, la inyección hidrodinámica es el modo que menor volumen de muestra requiere para llevar a cabo el análisis.

La presión se fijó en 50 mbar (máxima presión posible en el equipo), y se fue variando el tiempo desde 1 a 10 s. Se observó que se producía un aumento de las áreas cuando aumentaba el tiempo de inyección; en cambio, en las alturas de los picos se observó que el aumento era gradual hasta llegar a los 5 segundos, pero a partir de ese tiempo se mantenían o incluso decrecían. Esto es debido a que la altura es sensible a la sobrecarga de muestra en el capilar mientras que el área no, es decir, a partir de los 5 segundos ocurre el fenómeno conocido como “ensanchamiento de bandas” que consiste en que los picos no aumentan tanto su altura como su anchura lo que redundaría en una pérdida de resolución y de eficacia. Por esta razón, se eligió, finalmente, un tiempo de inyección de 5 segundos.

5.1.1.2. Selección del voltaje

Siguiendo con la optimización de todas las variables instrumentales que afectan a una metodología electroforética, continuamos con la optimización del voltaje de separación. Para ello, una vez fijado el tiempo de inyección en 5 segundos y utilizando como variables instrumentales: temperatura (30°C), longitud de onda (220 nm), longitud del capilar (64.5

cm), se varió el voltaje de separación entre 10 y 25 kV. Para este estudio se empleó una disolución mezcla de los nueve compuestos conteniendo 30 mg/L de PIPE, AMPI y PEN G; 5 mg/L de NAFCI, 10 mg/L de DICLOX, CLOX y OXA, y 20 mg/L de PENV y AMOX.

En la Figura I-1 se muestran los resultados de este estudio. El voltaje elegido para la separación electroforética fue de 20 kV, porque era el que proporcionaba mayores señales y mejor resolución en el menor tiempo posible, con un valor de corriente aceptable (116 μ A).

A partir de los 20 kV, se observa un cierto aumento en la altura, pero se observaba una considerable pérdida de resolución, hasta llegar al solapamiento de los picos.

Para identificar los analitos se empleó tanto el tiempo de migración como el espectro de absorción correspondiente.

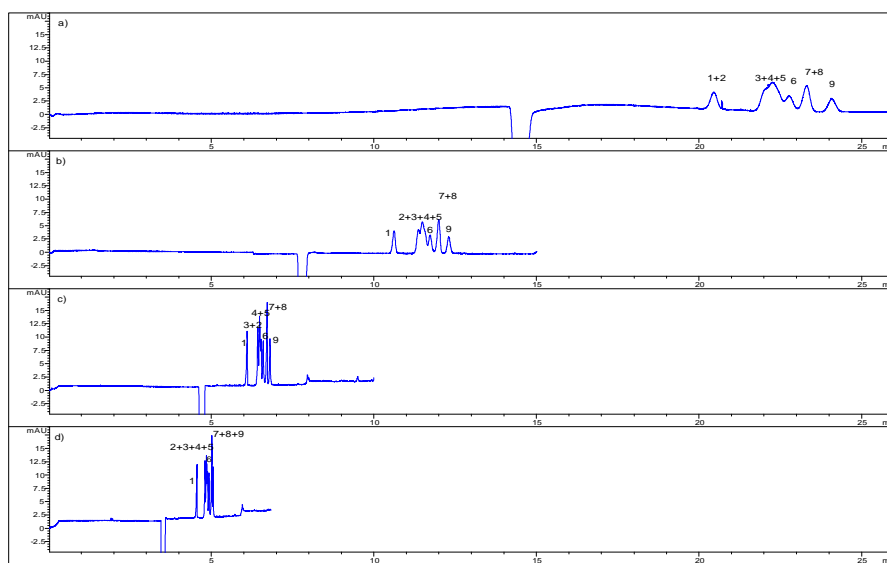


Figura I-1. Electroferogramas obtenidos a: (a) 10 kV, (b) 15 kV, (c) 20 kV y (d) 25 kV. 1.AMPI, 2. AMOX, 3. PENG, 4. PIPE, 5. OXA, 6. PENV, 7. CLOXA, 8. DICLOX, 9. NAFCI

Los estudios realizados se llevaron a cabo usando un capilar de sílice fundida de una longitud total de 64.5 cm, 50 μm de d.i. y aplicando un voltaje de 20 kV y una temperatura de 30°C.

La disolución mezcla de los nueve antibióticos utilizada para llevar a cabo el estudio, fue la misma en todos los casos, presentando una concentración de 100 mg/L para cada analito, introduciéndose en el sistema mediante inyección hidrodinámica durante 5 segundos a una presión de 50 mbar.

Dada la estructura de los antibióticos β -lactámicos y teniendo en cuenta los valores de pKa (pK_{a1} =2.70, para AMPI, 2.44 para AMOX, -1.44 para PIPE, -1.32 para PENG, -1.68 para PENV, -2.63 para NAFCl, -2.96 para OXA, -3.53 para CLOXA y -3.73 para DICLOX, pK_{a2} =7.30 para AMPI, 6.90 para AMOX, 2.45 para PENG y 2.44 para PIPE, PENV, NAFCl, OXA, CLOXA y DICLOX), se puede concluir que todos ellos presentan carácter neutro a un pH inferior a 2, y por encima de éste empiezan a desprotonarse y a presentar carga negativa, facilitándose de esta forma su separación electroforética. Por ello, se seleccionó un intervalo de pH comprendido entre 2 y 10, para llevar a cabo el estudio del pH de separación.

Las disoluciones tampón empleadas fueron las siguientes: tampón acetato amónico/ácido acético para estudiar el rango de pH comprendido entre 2 y 6 y tampón tetraborato sódico para el rango comprendido entre 7 y 10. La concentración de todas las disoluciones tampón fue de 50 mM y las variaciones de pH se realizaron en intervalos de una unidad.

Como resultado del estudio se observó que, a pH por debajo de 5 no aparecía ningún pico. A valores de pH superiores a 5, los compuestos comienzan a separarse parcialmente. El mayor número de picos resueltos se consiguió a pH 9, dentro del intervalo estudiado. Por ser el pH un valor tan influyente en la separación electroforética, se llevó a cabo un segundo estudio más preciso, para el rango de pH comprendido entre 8 y 10, empleando como disolución tampón tetraborato sódico y usando intervalos de 0.5 unidades. A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó finalmente un pH de 9.5 porque es el valor de pH al cual aparece un mayor número de picos resueltos en el electroferograma y el área de los mismos es mayor, aunque aún no se consigue la separación completa de los mismos (ver Figura I-2).

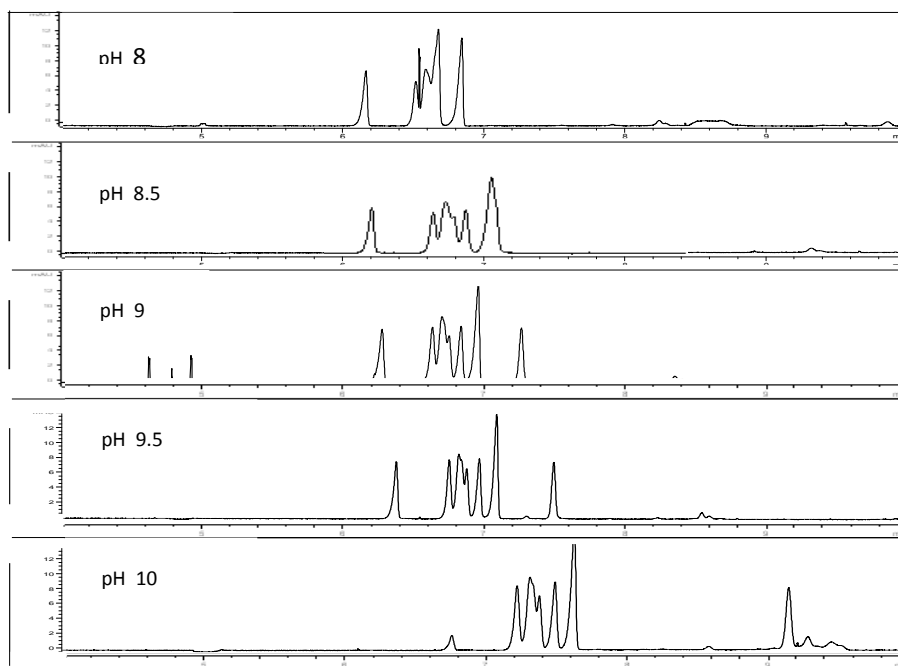


Figura I-2. Electroferogramas obtenidos en el estudio de pH, usando como disolución tampón tetraborato sódico/NaOH.

5.1.2.2 Optimización de la naturaleza y concentración de la disolución tampón.

Una vez optimizado el pH y fijado el valor de 9.5 se optimizó la naturaleza de la disolución tampón, usada como electrolito de separación. Las distintas disoluciones tampón elegidas para este estudio fueron: tetraborato sódico/NaOH, carbonato amónico/NH₃, glicina/NaOH, citrato/NaOH y carbonato sódico/NaOH. La concentración empleada para todas las disoluciones fue de 50 mM. Las demás condiciones de medida son las descritas en el apartado 3.2.1. Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura I-3.

Los resultados muestran que el empleo del tetraborato sódico como tampón de separación proporciona mejores resultados en cuanto a resolución de los picos y mayor altura de los mismos, por lo que se seleccionó esta disolución tampón para el resto del trabajo experimental.

La concentración del tampón de separación fue el siguiente parámetro en estudio, y el criterio adoptado para seleccionar la más adecuada fue conseguir la mejor resolución de los analitos, puesto que éste es el parámetro en el que presenta una mayor influencia esta variable.

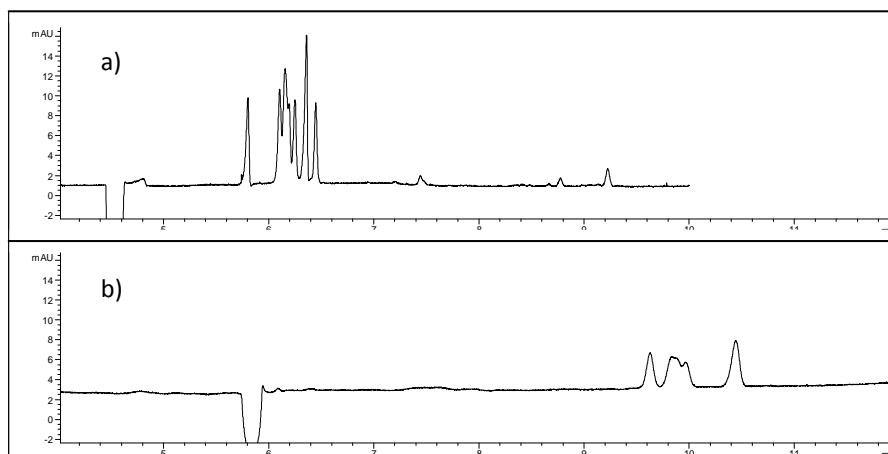


Figura I-3 . Electroferogramas obtenidos en la optimización de la naturaleza de la disolución tampón a pH 9.5. (a) Glicina/NaOH, (b) Carbonato sódico/NaOH

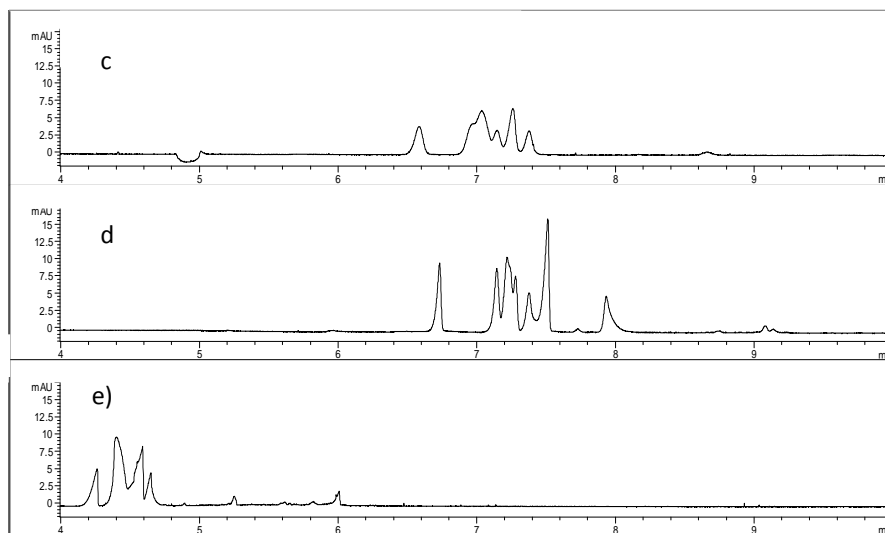


Figura I-3 (cont.) Electroferogramas obtenidos en la optimización de la naturaleza de la disolución tampón a pH 9.5. c) Citrato/NaOH, d) Tetraborato sódico/NaOH, e) Carbonato amónico/NH₃.

Se impusieron dos limitaciones para la selección del valor óptimo: (i) que el tiempo de análisis no fuera excesivamente largo; y (ii) que la corriente generada en el capilar se mantuviera por debajo de 120 μ A. El rango de concentraciones en las que se realizó el estudio fue de 20-60 mM.

En esta parte de la optimización se modificó el diámetro interno del capilar empleado. Hasta ahora el capilar usado era de 50 μ m de d.i. y de 64.5 cm de longitud pero a partir de esta experiencia se cambió el capilar por otro de la misma longitud, pero de 75 μ m de d.i., lo que permite ganar sensibilidad aunque al mismo tiempo puede producir una pérdida de resolución y un aumento de la corriente.

En este estudio se probaron diferentes niveles de concentración de la disolución tampón (20, 30, 40 y 60 mM) y se observó que los compuestos que presentaban más problema en cuanto a su separación y detección fueron las tres oxacilinas (CLOXA, DICLOX y OXA) que presentaban una resolución muy baja, y las dos penicilinas (PENV y PENG), que no se separaban. Los electroferogramas correspondientes se muestran en la Figura I-4. A la vista de estos resultados se seleccionó una concentración de 40 mM, ya que la corriente era menor que la que producía la de 60 mM y la resolución del resto de los picos (exceptuando los 5 comentados anteriormente) era adecuada.

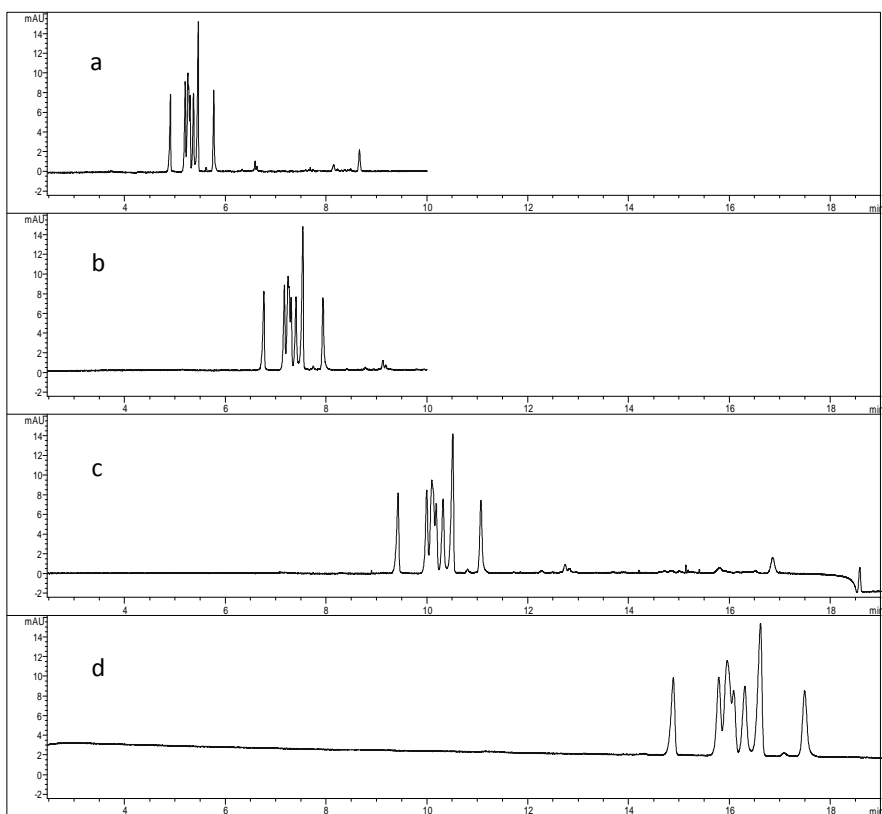


Figura I-4. Electroferogramas obtenidos en la optimización de la concentración de la disolución tampón tetraborato sódico a pH 9.5. (a) 20 mM, (b) 30 mM, (c) 40 mM, (d) 50 mM.

5.1.2.3. Empleo de medios organizados

Una vez definida la naturaleza, concentración y pH del medio electroforético usando CZE, y considerando que no se producía una separación aceptable de los compuestos en estudio para fines analíticos, se probó la adición de un surfactante aniónico, como es el dodecil sulfato

sódico (SDS), a dicho medio electroforético con objeto de mejorar la resolución entre los picos.

El hecho de que la disolución tampón contenga micelas y, como en este caso, que las micelas tengan carga negativa, hace que sean atraídas por el ánodo, aunque globalmente migran hacia el cátodo impulsadas por el flujo electrosmótico, favoreciendo de este modo la separación de los analitos. Así, se estudiaron concentraciones crecientes de SDS en el tampón de separación, por encima de la concentración micelar crítica ($cmc = 8.2 \text{ mM}$ en agua pura; $25 \text{ }^\circ\text{C}$) concretamente 50, 75, 100 y 150 mM.

De este estudio se puede deducir que la presencia del medio micelar aumenta la viscosidad del medio, incrementando el tiempo de migración de los nueve antibióticos pero mejorando significativamente la resolución de los picos debido a la presencia de micelas, como puede comprobarse en los electroferogramas que se presentan en la Figura I-5.

A la vista de esta figura se observa que el primero en migrar es AMPI y el último DICLOX, apareciendo solapados los picos correspondientes a PENG y PIPE, NAFCl y DICLOX, respectivamente cuando se emplea una concentración de SDS 50 mM, permaneciendo aun solapados tanto PENG y PIPE al aumentar la concentración de SDS a 75 mM. A una mayor concentración de surfactante (100 mM) se consiguió la separación de estos dos compuestos (3 y 4), como se observa en la Figura I-5.

Para concentraciones superiores a 100 mM se obtiene igualmente la separación total de todos los analitos, pero los picos disminuyen en altura y se produce ensanchamiento de bandas, además de un aumento considerable

del tiempo de análisis, por lo que se concluyó que la concentración óptima de SDS es de 100 mM.

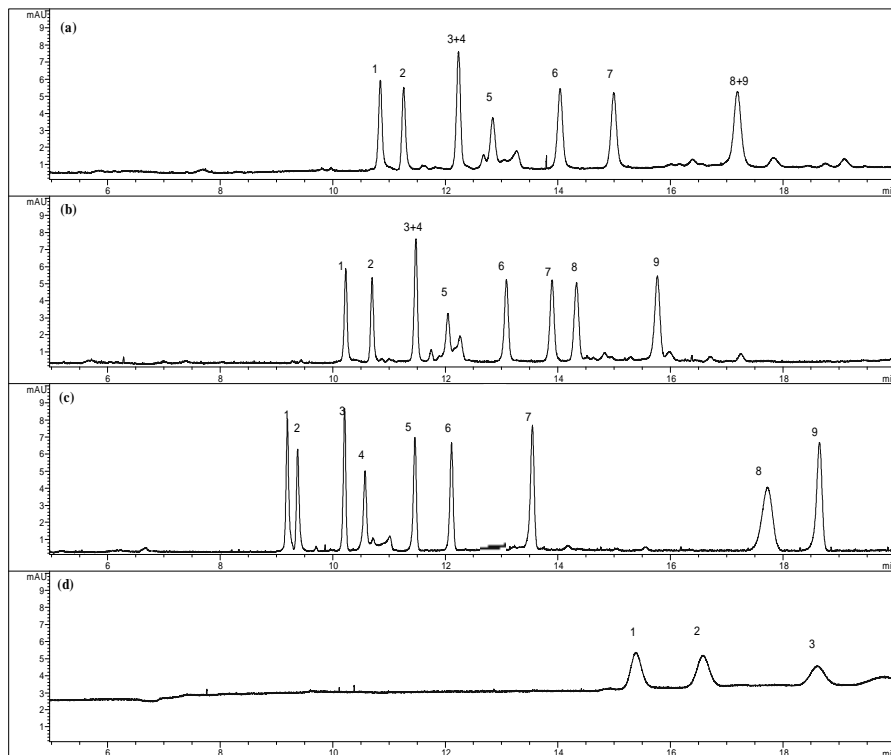


Figura I-5. Electroferogramas obtenidos empleando como disolución tampón tetraborato sódico 40 mM a pH 9.5 y distintas concentraciones de SDS, (a) 50 mM, (b) 75 mM, (c) 100 mM (d) 150 mM. 1. AMPI, 2. AMOX, 3. PENG, 4. PIPE, 5. OXA, 6. PENV, 7. CLOXA, 8. NAFCI, 9. DICLOX

5.1.3 SELECCIÓN DEL PATRÓN INTERNO

Como es sabido, suele ser conveniente emplear un patrón interno en el proceso de cuantificación mediante CE para solventar posibles incidencias que puedan ocurrir durante el proceso de análisis, como pueden ser

[251,252]: variación en la viscosidad, tiempo de inyección, tiempo de migración variable, efecto matriz, tensión superficial, variación de temperatura, inapropiado procedimiento de inyección, variación de presión, etc.

Un patrón interno debe cumplir una serie de características como son: dar lugar a un pico bien definido y distinguido del resto de analitos pero al mismo tiempo no aparecer muy distante de ellos, ser estable, presentar alta pureza, ser soluble en el disolvente de trabajo, tener buena definición a la longitud de onda de trabajo, ser barato, no ser tóxico, etc. Para este estudio se probaron diferentes patrones internos (ácido β -naftoixiacético (NOXA), ácido p-aminobenzoico (PABA) y ácido benzoico), usando una disolución patrón mezcla de los analitos de concentración 20 mg/L e incluyendo una concentración de patrón interno de 10 mg/L en el caso del PABA y ácido benzoico y 3 mg/L para el NOXA. Se empleó como medio electroforético tampón tetraborato sódico/NaOH 40 mM a pH 9.5 y 100 mM de SDS. Los mejores resultados se obtuvieron con el PABA, por cumplir las características citadas anteriormente, ser muy parecido a los analitos en estudio y migrar en el electroferograma en una zona muy próxima a ellos, como se observa en la Figura I-6, donde el pico del PABA aparece a la mitad del electroferograma, a un tiempo de 13 minutos, y con una adecuada resolución y altura de pico. Por ello, se decidió emplearlo como patrón interno en el resto del trabajo experimental.

[251] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo. *J. Chromatog. B.* 709 (1998) 310.

[252] K.D. Altria, S.M. Bryant, T.A. Hadgett. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1091.

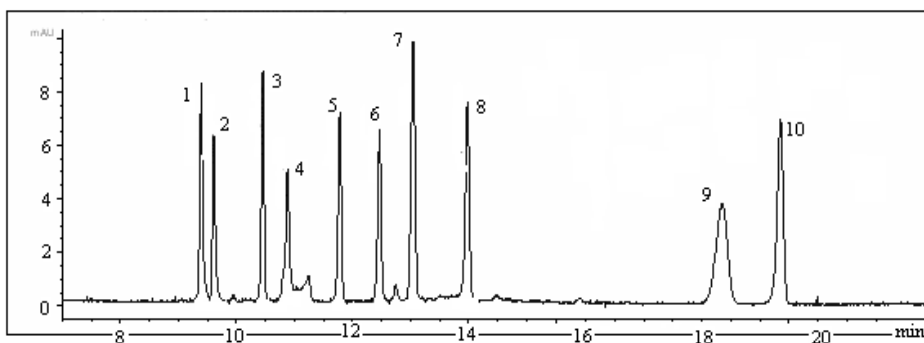


Figura I-6. Electroferograma de la mezcla de penicilinas estudiadas junto con PABA como patrón interno. 1. AMPI, 2. AMOX, 3. PENG, 4. PIPE, 5. OXA, 6. PENV, 7. PABA, 8. CLOXA, 9. NAFCI, 10. DICLOX.

5.1.4 OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EN MODO MEKC

Una vez llevada a cabo la optimización del apartado anterior, y considerando que se adoptó la modalidad MEKC con objeto de conseguir una mejor resolución de los compuestos en estudio para establecer el método analítico, se decidió realizar un estudio de reoptimización de aquellas variables que demostraron ser más influyentes en la sensibilidad alcanzada, esta vez en presencia de medio micelar: pH y concentración de la disolución tampón, concentración de SDS y voltaje aplicado.

Teniendo en cuenta la posible interacción entre estas variables, se decidió aplicar la metodología de optimización multivariante mediante el uso del diseño de experimentos. En nuestro caso decidimos emplear un diseño Draper-Lin compuesto centrado en las caras, con cuatro puntos centrales (réplicas distribuidas temporalmente para evaluar la variabilidad del sistema durante el tiempo que duraba el estudio) y un total de 20 experiencias. Aunque este diseño se ha empleado escasamente en Química Analítica

[253,254,255], se seleccionó como el más adecuado porque el número de niveles a considerar para cada factor (variable) es adecuado para un estudio riguroso de los intervalos experimentales de estudio de las variables seleccionadas y porque su eficacia es superior a la de otros diseños como el diseño compuesto completo Box-Wilson o el diseño compuesto fraccionado Box-Hunter. La estrategia del diseño Draper-Lin reduce el número de puntos del diseño factorial, obteniendo lo que se denomina “pequeño diseño compuesto”, en el que se requiere un mínimo trabajo experimental para calcular los coeficientes de la función matemática de la superficie de respuesta.

Como variable respuesta se seleccionó la suma de las áreas de pico de todos los compuestos, con objeto de seleccionar los valores óptimos de las variables para los que se consigue una mayor sensibilidad. Para el establecimiento de la región experimental se hizo uso de los resultados obtenidos en el anterior estudio univariante en modo CZE, limitando el rango entre aquellos valores en los que la resolución era aceptable. Se consideraron como puntos centrales los valores de las variables para los que se obtuvieron mejores señales y mayor resolución en los estudios previos.

El estudio se realizó empleando una disolución patrón mezcla de las penicilinas seleccionadas a las siguientes concentraciones: AMPI (30 mg/L), AMOX (20 mg/L) PENG (30 mg/L), PIPE (30 mg/L), OXA (10 mg/L),

[253] L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, E. Almansa-López, J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, *Talanta*, 60 (2003) 523.

[254] F.J. Lara, A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, J.M. Bosque Sendra. *Anal. Chim. Acta*, 535 (2005) 101.

[255] J.J. Soto Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz Gracia, L. Cuadros Rodríguez, J.L. Martínez Vidal. *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 235.

PENV (20 mg/L), CLOXA (10 mg/L), NAFCl (5 mg/L) y DICLOX (10 mg/L). La concentración del patrón interno PABA fue de 10 mg/L.

En la Tabla I-1 se muestra la matriz del diseño, incluyendo los valores reales de las variables así como los codificados (entre paréntesis) para cada experimento.

El gráfico de Pareto obtenido (Figura I-7) muestra los efectos de las variables sobre la respuesta seleccionada (suma de áreas de todos los picos). La línea vertical muestra el límite de decisión para considerar los efectos significativos (se basa en el efecto normalizado = efecto estimado/error estándar, valor $P = 0.05\%$ a un nivel de confianza del 95 %). Como puede observarse, todas las variables así como ciertas interacciones entre éstas son significativas, y afectan a la señal analítica, por tanto deben ser optimizadas posteriormente mediante la metodología de superficies de respuesta.

La Figura I-8 muestra las superficies de respuesta obtenidas. El coeficiente de determinación (r^2) fue del 91 %, lo que demuestra un ajuste satisfactorio de los datos experimentales al modelo teórico. Los valores óptimos finales obtenidos para las variables estudiadas, considerando las interacciones fueron: pH=8.5, concentración de tampón tetraborato 26 mM, concentración de SDS 100 mM y voltaje de separación 20 kV. En estas condiciones se obtuvieron elevadas sensibilidades y adecuadas resoluciones (superiores a 1.5), además de un tiempo de análisis aceptable.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA
CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR

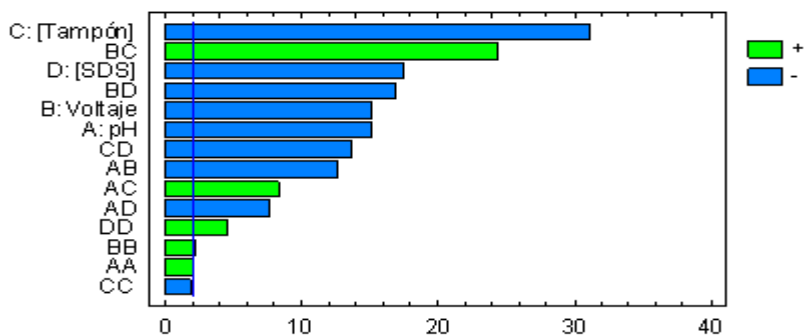


Figura I-7. Gráfica de Pareto.

Tabla I-1. Matriz del diseño Draper-Lin para la optimización del método MEKC de determinación de antibióticos β -lactámicos.

Experiencia	pH	Voltaje (kV)	[Tampón] (mM)	[SDS] (mM)
1	10.25 (1)	22.5 (1)	50 (1)	75 (-1)
2	8.75 (-1)	22.5 (1)	50 (1)	125 (1)
3	8.75 (-1)	17.5 (-1)	50 (1)	75 (-1)
4	10.25 (1)	17.5 (-1)	30 (-1)	125 (1)
5	8.75 (-1)	22.5 (1)	30 (-1)	125 (1)
6	10.25 (1)	17.5 (-1)	50 (1)	125 (1)
7	10.25 (1)	22.5 (1)	30 (-1)	75 (-1)
8	8.75 (-1)	17.5 (-1)	30 (-1)	75 (-1)
9	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
10	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
11	8.44 (-1.41)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
12	10.56 (1.41)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
13	9.5 (0)	16.5 (-1.41)	40 (0)	100 (0)
14	9.5 (0)	23.5 (1.41)	40 (0)	100 (0)
15	9.5 (0)	20 (0)	26 (-1.41)	100 (0)
16	9.5 (0)	20 (0)	54 (1.41)	100 (0)
17	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	64.75 (-1.41)
18	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	135.3 (1.41)
19	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
20	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)

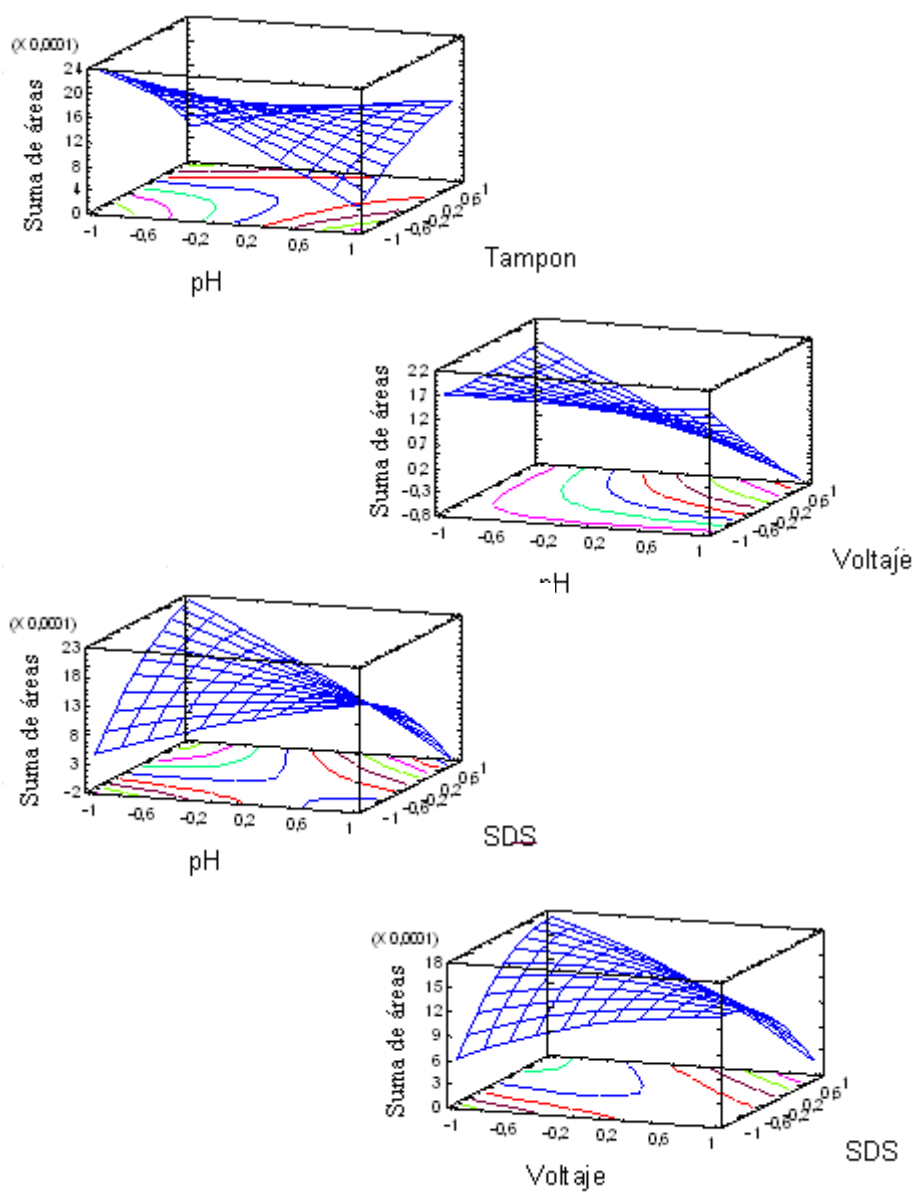


Figura I-8. Superficies de respuesta obtenidas en el proceso de optimización multivariante en modo MEKC.

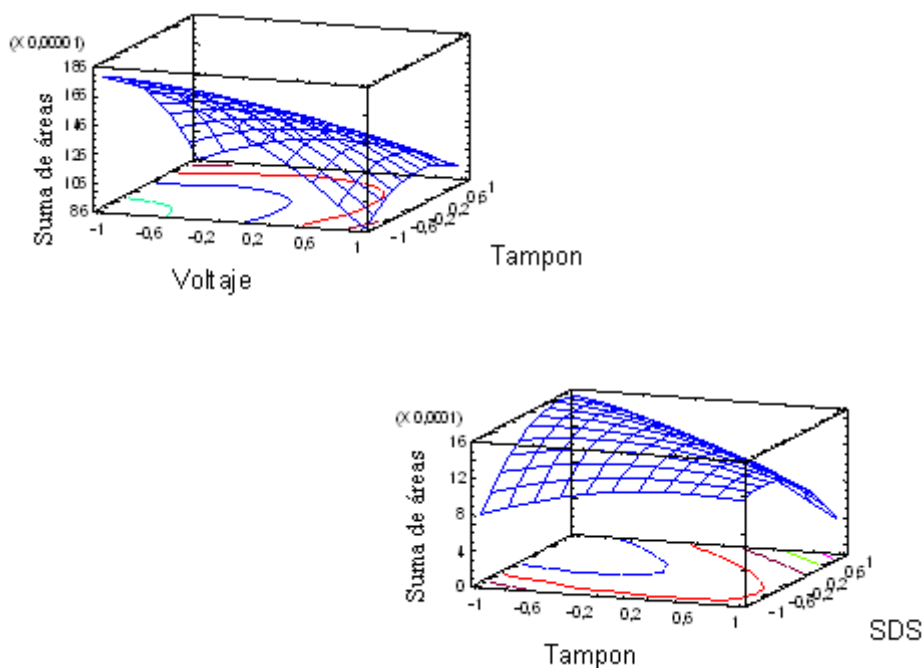


Figura I-8 (cont.). Superficies de respuesta obtenidas en el proceso de optimización multivariante en modo MECK.

La Tabla I-2 muestra el resumen de las condiciones optimizadas del método propuesto para la determinación de los antibióticos β -lactámicos seleccionados y la Figura I-9 muestra un electroferograma correspondiente a la separación de estos compuestos en las condiciones óptimas.

Tabla I-2. *Tabla de condiciones óptimas del método.*

Capilar	64.5 cm. de longitud, 75 µm de d.i., longitud efectiva hasta el detector, 56.5 cm
Tampón de separación	Tetraborato sódico 26 mM
Surfactante	SDS, 100 mM
pH	8.5
Voltaje de separación	20 kV
Temperatura	30°C

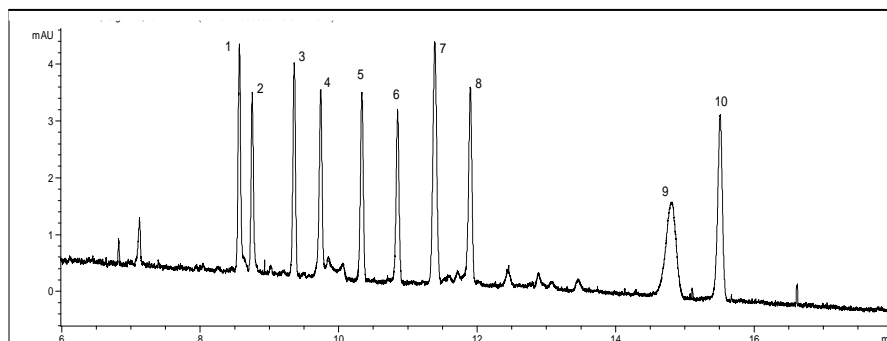


Figura I-9. *Electroferograma obtenido en condiciones óptimas para una disolución mezcla conteniendo 30 mg/L de AMPI (1), PENG (3) y PIPE (4), 20 mg/L de AMOX (2) y PENV (6) y 10 mg/L de OXA (5), CLOXA (8) y DICLOX (10) y 5 mg/L de NAFCI (9). Como patrón interno 10 mg/L de PABA (7).*

5.2. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO

5.2.1. RECTAS DE CALIBRADO

Con objeto de comprobar la adecuación del método propuesto al control de calidad de fármacos se realizó una caracterización del mismo en términos de rango lineal, linealidad, límites de detección y cuantificación y precisión.

En primer lugar se establecieron rectas de calibrado para cada uno de los analitos en estudio (PIPE, PENG, AMPI, AMOX, PENV, NAFCl, CLOXA, OXA y DICLOX). Para ello se prepararon seis disoluciones patrón conteniendo distintos niveles de concentración para cada uno de los analitos: 1.5, 4, 8, 12, 16 y 20 mg/L para AMOX; 1, 5, 10, 15, 20 y 30 mg/L para AMPI; 0.8, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/L para CLOXA, DICLOX y OXA; 0.8, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L para NAFCl; 1.5, 5, 10, 15, 20 y 30 mg/L para PENG y PIPE y 1, 4, 8, 12, 16 y 20 mg/L para PENV.

Todas las disoluciones contenían una concentración de patrón interno (PABA) de 10 mg/L. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración y cada réplica fue inyectada por triplicado.

Las rectas de calibrado se establecieron, considerando como respuesta las áreas relativas de pico corregidas, es decir, la razón: (área de pico de analito/tiempo de migración)/(área de pico patrón interno/tiempo de migración del patrón interno), en función de la concentración de analito (Figura I-10).

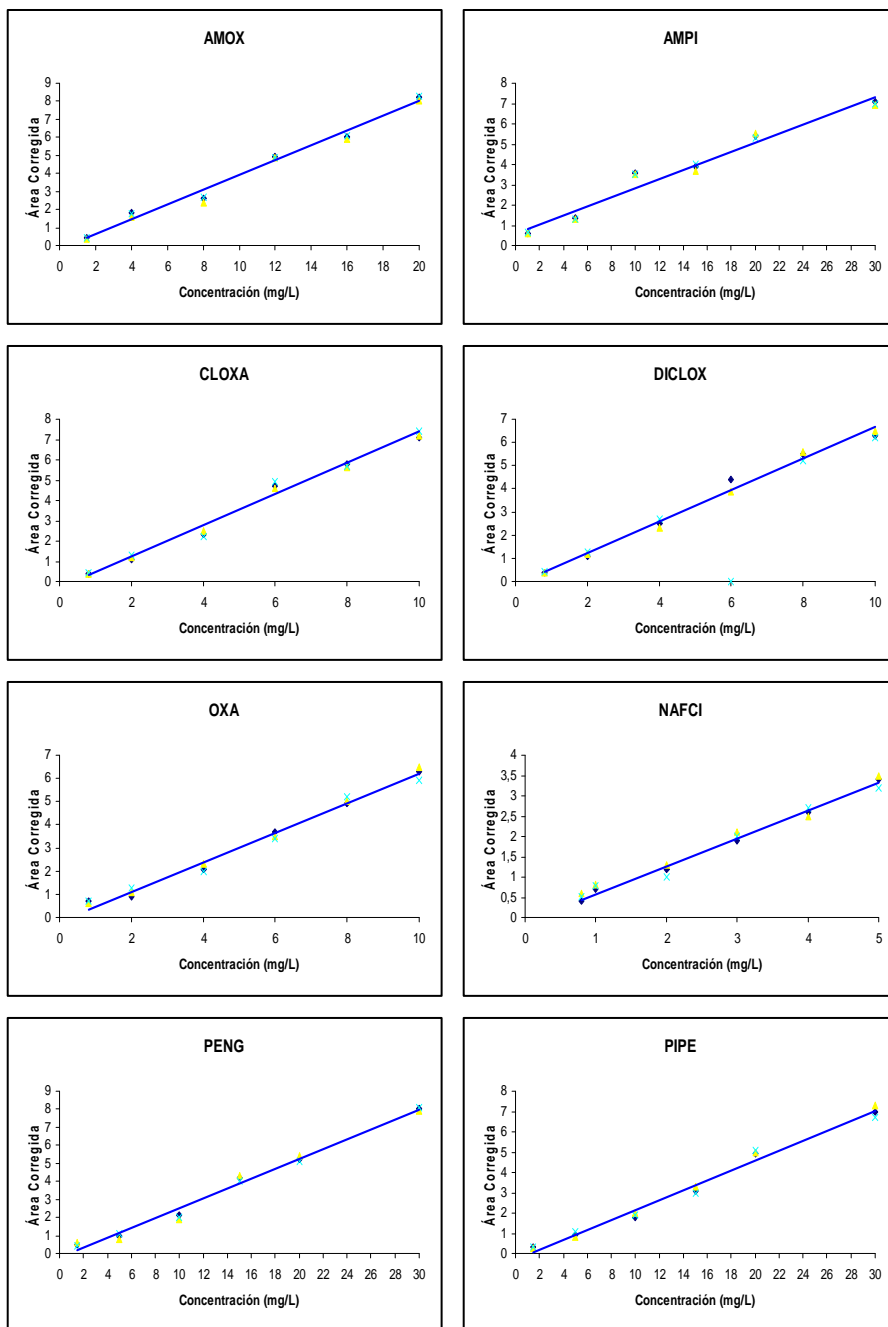


Figura I-10 . Rectas de calibrado

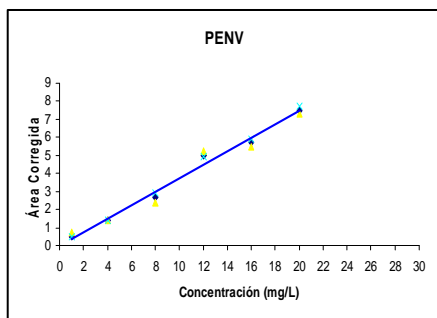


Figura I-10 (cont.) . Rectas de calibrado.

La Tabla I-3 muestra los parámetros del calibrado obtenidos mediante regresión por mínimos cuadrados así como los parámetros de calidad calculados para el método propuesto. Los límites de detección y cuantificación fueron calculados considerando la mínima concentración de analito que proporciona una relación señal/ruido igual a 3 y 10 veces, respectivamente.

5.2.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

La precisión, en términos de áreas relativas corregidas, se estimó para una disolución patrón mezcla de los antibióticos β -lactámicos a una concentración 10 mg/L para AMOX, AMPI, PENG, PENV y PIPE, 5 mg/L para DICLOX, OXA y CLOXA y 3 mg/L para NAFCl, se realizaron 3 réplicas y se inyectaron por triplicado en un mismo día, en condiciones de repetibilidad. Los resultados, expresados como desviación estándar relativa (DER) (%), se muestran en la Tabla I-3.

Tabla I-3. *Parámetros de calidad del método propuesto para el análisis por MECK de nueve antibióticos β -lactámicos.*

Analito	Rango lineal (mg/L)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	DER (%)
AMOX	0.82-20	-0.19	0.40	99.3	0.82	2.73	1.7
AMPI	0.93-30	0.34	0.23	99.2	0.93	3.10	1.7
CLOXA	0.36-10	-0.28	0.73	99.3	0.36	1.18	1.7
NAFCI	0.38-5	-0.10	0.62	99.1	0.38	1.27	1.5
DICLOX	0.35-10	-0.01	0.65	99.6	0.35	1.18	1.7
OXA	0.37-10	-0.14	0.65	99.1	0.37	1.23	1.7
PENG	0.91-30	-0.16	0.27	99.2	0.91	3.03	1.5
PENV	0.81-20	0.08	0.32	98.9	0.81	2.69	1.5
PIPE	1.42-30	-0.21	0.24	99.2	1.42	5.74	1.6

Tabla I-4. *Estudio de precisión para el método propuesto referido a un nivel de concentración (10 mg/L para AMOX, AMPI, PENG, PENV y PIPE, 5 mg/L para DICLOX, OXA y CLOXA y 3 mg/L para NAFCI) y a los tiempos de migración.*

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOX	DICLOX	PENV	PIPE
	(n=9)								
DER (%) Conc.	5.3	4.3	4.7	5.2	4.8	4.1	5.2	5.5	5.0
Tiempo migración (min)	14.8	8.7	9.3	8.4	10.2	12.0	15.7	10.8	9.6
DER (%) t. migr.	1.3	1.9	2.1	1.4	1.7	1.4	2.0	1.9	1.7

5.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO AL CONTROL DE CALIDAD DE PREPARADOS FARMACÉUTICOS.

Con objeto de demostrar la validez del método propuesto se procedió a su aplicación en preparados farmacéuticos. Se realizó la determinación de algunos de los antibióticos β -lactámicos estudiados, tales como CLOXA, AMPI y PENG, en diversos fármacos de uso humano o veterinario, empleando en todos los casos PABA como patrón interno a una concentración de 10 mg/L en la disolución de medida. A continuación se describe el procedimiento llevado a cabo en cada uno de los casos:

▪ *Determinación de Cloxacilina como principio activo, en cápsulas Orbenin (GlaxoSmithkline, S.A)*

Composición: Cloxacilina (500 mg/cápsula). Puede utilizarse administrado por vía oral o parenteral.

Tratamiento de muestra: Se tomaron tres cápsulas, de masa: 520, 523 y 518 mg, respectivamente que se trituraron conjuntamente, homogeneizando la mezcla. Posteriormente se tomó una porción de 500 mg de esta mezcla y se disolvió en aproximadamente 75 mL de agua desionizada y tras sonicar durante 20 min, la disolución resultante se filtró a través de un papel de filtro y el filtrado recogido se completó hasta un volumen final de 100 mL. Con objeto de que la concentración de CLOXA se encontrara en la parte central de la recta de calibrado establecida para la misma, es decir, aproximadamente 5 mg/L, se llevó a cabo una dilución tomando 10 μ L de la disolución anterior, y llevando hasta un volumen final de 100 mL con agua desionizada y añadiendo la cantidad necesaria de patrón interno para alcanzar una concentración final de 10 mg/L. Se repitió el proceso para tres cápsulas distintas que, a su vez, fueron inyectadas por triplicado.

▪ *Determinación de Ampicilina como principio activo en comprimidos Britapen (Reig Jofré, S.A.)*

Composición: Ampicilina trihidrato (1 g/comprimido).

Tratamiento de muestra: Se tomaron tres comprimidos de masa: 988, 992 y 1002 mg, respectivamente. Se trituraron conjuntamente obteniendo una masa homogénea y posteriormente se tomó una porción de 1 g de esta mezcla y se disolvió en aproximadamente 75 mL de agua desionizada. Tras sonicar durante 20 min se filtró la disolución a través de un papel de filtro y el filtrado recogido se completó hasta un volumen final de 100 mL. Con objeto de que la concentración de ampicilina se encontrara en la parte central de la recta de calibrado establecida para la misma, es decir, aproximadamente 12 mg/L, se llevó a cabo una dilución tomando 12 µL de la disolución anterior, llevándolos hasta un volumen final de 100 mL con agua desionizada, incluyendo el patrón interno a una concentración final de 10 mg/L. Se repitió el proceso para tres comprimidos distintos que fueron inyectados por triplicado.

▪ *Determinación de PENG como principio activo en inyectable Veterín-Micipen (Intervet Laboratory, S.A.)*

Composición: Bencilpenicilina potásica (50.000 UI), Bencilpenicilina procaína (200.000 UI), Dihidroestreptomicina (sulfato) (250 mg). Ampollas (1 mL)

Tratamiento de muestra: Se tomaron 3 inyectables de volumen 1 mL, se mezclaron y se obtuvo una mezcla homogénea de la que posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se disolvió en aproximadamente 75 mL de agua desionizada, completando hasta un volumen final de 100 mL. Se pipetearon 18 µL de la disolución anterior y se diluyeron hasta 100 mL con agua desionizada con objeto de que la concentración de penicilina G quedara en la parte media del calibrado, conteniendo el patrón interno a una concentración de 10 mg/L. Se procedió a inyectar por triplicado la disolución de medida.

La Figura I-11 muestra los electroferogramas obtenidos al aplicar el método MEKC propuesto a los fármacos comentados anteriormente. Se puede observar que los excipientes no interfirieron en las determinaciones, no existiendo ningún compuesto que comigre con el analito.

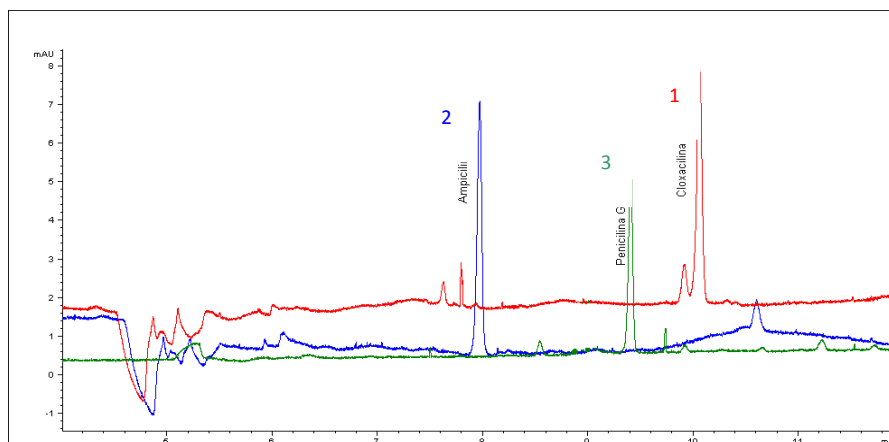


Figura I-11. Electroferogramas resultantes del análisis por el método propuesto de los tres productos farmacéuticos: 1. Orbenin cápsulas. 2. Britapen comprimidos. 3. Veterín-Micipen inyectable.

La veracidad del método fue evaluada por comparación de los resultados obtenidos al aplicar el método propuesto con los valores nominales ofrecidos por el fabricante. Esta comparación se hizo por medio de un test de la t de Student. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I-5. Puede observarse como los valores encontrados por el método propuesto al analizar las fármacos no difieren significativamente ($P > 5\%$) del valor nominal indicado por el fabricante, por lo que puede concluirse que el método es veraz. Igualmente los valores de DER al realizar análisis replicados confirman que la precisión es adecuada (inferior al 4 %) con lo que el método propuesto demuestra su

exactitud en la determinación de estos antibióticos en preparados farmacéuticos.

Tabla I-5. *Determinación de algunos β -lactámicos en preparados farmacéuticos.*

Muestra	Analito	Valor Nominal	Valor Encontrado (n=3)	P (%)	DER (%)
Cápsulas Orbenín	CLOX	500 ^a	478	95.6	3.1 (n=9)
Comprimidos Britapen	AMPI	1000 ^b	923	93.0	2.9 (n=9)
Inyectables Veterin-Micipen	PEN G	600 ^c	546	91.0	3.7 (n=9)

a: (mg/cápsula); b: (mg/comprimido); c: (mg/mL)

CAPÍTULO II

“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN
DISTINTOS TIPOS DE LECHE Y AGUA MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE”

1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta la capacidad de resolución que presenta la electroforesis capilar, unida al importante incremento en sensibilidad que supone su acoplamiento con una técnica de preconcentración on-line como es el “apilamiento de muestra de gran volumen” (*large volumen sample stacking*, LVSS), en el presente capítulo se pretende desarrollar un método para la cuantificación de siete antibióticos β -lactámicos (amoxicilina (AMOX), ampicilina (AMPI), nafcilina (NAFCI), dicloxacilina (DICLOX), cloxacilina (CLOXA), oxacilina (OXA) y penicilina G (PENG), cuyos límites máximos de residuo (LMRs) en alimentos de origen animal están regulados por la Unión Europea [256]. Se usará el ácido p-aminobenzoico (PABA) como patrón interno.

Para el desarrollo de este método se siguieron las siguientes etapas:

- Optimización de la separación electroforética.
- Desarrollo del método de preconcentración on-line.
- Rectas de calibrado y parámetros de calidad.
- Aplicación del método a la determinación de los siete antibióticos β -lactámicos en leche cruda de vaca y cabra.
- Aplicación del método a la determinación de los siete antibióticos β -lactámicos en aguas de distinta naturaleza.

[256] 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.

2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL Y MUESTRAS

Todos los reactivos y disolventes usados fueron de grado analítico. El hidróxido sódico fue suministrado por Panreac-Química (Barcelona, España), los disolventes orgánicos: acetonitrilo, metanol y etanol, así como el tampón tris (hidroximetil aminometano) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) y el ácido clorhídrico por Scharlaub (Barcelona, España).

Los analitos: AMOX, AMPI, NAFCI, CLOXA, DICLOX, OXA y PENG y el patrón interno (PI), el ácido p-aminobenzoico (PABA) fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU).

El agua empleada (18.2 MΩ/cm) se desionizó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

Los cartuchos utilizados en la extracción en fase sólida fueron: Oasis® HLB con un contenido hidrofílico-lipofílico (60 mg, 3 mL; Waters, Milford, MA, USA), y Alúmina N, elaborados en el laboratorio (500 mg, 3 mL; E. Merck).

Las disoluciones patrón (1000 mg/L) de cada analito se prepararon disolviendo la cantidad adecuada en agua desionizada. Estas disoluciones se almacenan en refrigerador en frasco topacio, preservándolas de la luz. Bajo estas condiciones fueron estables durante al menos dos meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon antes de la medida diluyendo alícuotas de las anteriores con agua desionizada.

La leche utilizada en el estudio fue leche de vaca sin tratar suministrada por Puleva Biotech (Granada, España), leche de vaca desnatada comercial (Puleva) y leche de cabra sin tratar procedente de una granja situada en Guadix (Granada, España).

Las aguas utilizadas para validar el método fueron: agua de depuradora, suministrada por la estación depuradora de aguas residuales situada en la vega de Granada (España), agua de río, recogida del río Fardes (Granada, España) y agua de pozo, situado en Guadix (Granada, España).

3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Los experimentos de CE se realizaron en un instrumento HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) equipado con detector de diodos en fila que operó a 220 nm con un ancho de banda de 16 nm. La separación se llevó a cabo en capilares de sílice fundida con una longitud total de 64.5 cm y un diámetro interno, primero de 50 μm y posteriormente de 75 μm , comprados a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

Los datos se trataron con el programa HP ChemStation, versión A.09.01.

Se utilizaron los programas Excel (Microsoft) y StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD) [257] para procesar los datos.

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España).

Para la extracción en fase sólida (SPE) se usó un dispositivo de vacío VacElut provisto de 20 posiciones de extracción, suministrado por Varian (Palo Alto, CA, USA).

[257] *STATGRAPHICS 5.0* Statistical Graphics Corporations, Rockville, MD, 2000.

4. PROCEDIMIENTO ELECTROFORÉTICO PROPUESTO

Los analitos se monitorizaron a 220 nm con un ancho de banda de 30 nm. La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida de 64.5 cm × 75 µm d.i. (longitud efectiva 56.5 cm) en modo normal y aplicando un voltaje de 30 kV.

Las muestras se introdujeron mediante inyección hidrodinámica a una presión de N₂ de 7 bar durante 1 minuto. La inyección de la muestra se hizo siguiendo el método de “apilamiento de muestra de gran volumen” (LVSS). La temperatura del capilar fue de 30°C.

Los capilares nuevos se acondicionaban con una disolución de NaOH 1 M durante 10 minutos, seguido de agua Milli-Q durante otros 10 min. y finalmente con tampón electroforético 15 min. Al principio de cada día, el capilar se pre-acondicionaba durante 3 minutos con una disolución de NaOH 0.1 M, 3 min. con agua Milli-Q y 5 min. con tampón electroforético. Después de cada análisis, el capilar se acondicionaba durante 1 min. con NaOH 0.1 M, 1 min. con agua Milli-Q y 2 min. con tampón electroforético, usando una presión de 7 bar en todos los casos, para mantener una adecuada repetibilidad entre análisis.

El tampón electroforético, una vez optimizado, consistía en una disolución acuosa 175 mM de Tris con 20% de etanol, ajustado a pH 8 con ácido clorhídrico 1 M.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES

Con objeto de conseguir un método lo más sensible posible, que a la vez fuera suficientemente preciso y selectivo, se procedió a optimizar todas las variables que influyen en el sistema electroforético: pH, naturaleza de la disolución tampón, concentración de la disolución tampón, voltaje, temperatura y tamaño del capilar. Como criterio para seleccionar los valores óptimos, se utilizó tanto la resolución de los diferentes picos como el área de pico electroforético. En todos los casos, se impuso como restricción que el valor de la intensidad de corriente generada no superara los 140 μ A. El estudio se realizó empleando inicialmente un capilar de 50 μ m de d.i. y de longitud total de 64.5 cm (longitud efectiva hasta el detector = 56.5 cm). La disolución utilizada, mezcla de los siete antibióticos β -lactámicos en estudio, poseía una concentración de 10 mg/L para cada analito, introduciéndose en el sistema mediante inyección hidrodinámica durante 5 s a una presión de 50 mbar. La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 30 kV y una temperatura de 30°C. Las diferentes etapas del estudio, se describen a continuación.

5.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL pH

Los valores de pKa de los diferentes antibióticos β -lactámicos en estudio, recogidos en la introducción, nos indican que a pH superior a 2 comenzarían a desprotonarse y presentar carga negativa, facilitándose de esta forma su separación electroforética.

Por ello, el primer paso en la optimización del sistema electroforético fue determinar qué pH era el más adecuado para la separación. Con este propósito

se realizó un estudio de pH de la disolución tampón en el rango comprendido entre 3.0-10. La disolución tampón empleada para este estudio de pH para el intervalo comprendido entre 7 y 10 fue Tris/HCl, mientras que para el intervalo comprendido entre 3 y 7 se utilizó acetato amónico/ácido acético a una concentración de 30 mM. Como resultado se observó que a valores de pH inferiores a 5 no aparecen picos electroforéticos, mientras que a partir de este valor empieza a apreciarse la aparición de señales, pero no es hasta pH 7 donde la resolución empieza a ser aceptable. En la Figura II-1 se muestra como varía la separación con respecto al pH. En el intervalo de 7 a 10 se observa que la mejor resolución y forma de los picos se obtiene a pH 8, que se selecciona como óptimo para el resto del trabajo experimental.

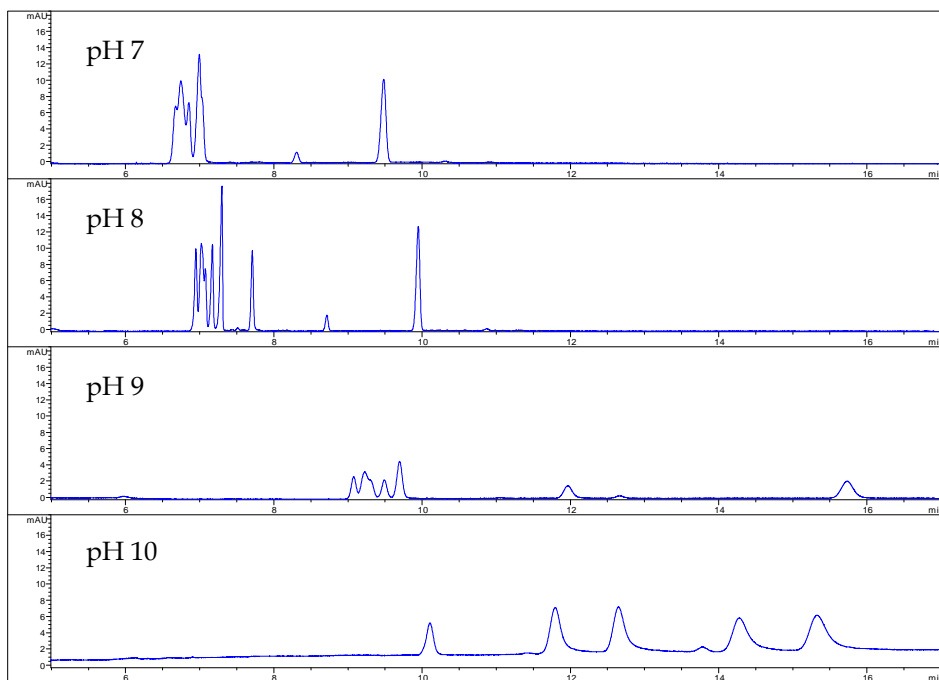


Figura II-1. Estudio del efecto del pH de la disolución tampón Tris 30 mM en la separación electroforética de los siete antibióticos β -lactámicos.

5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN

Una vez optimizado el pH y fijado un valor de 8, se seleccionó la naturaleza de la disolución tampón. Las disoluciones tampón elegidas para este estudio, a ese pH fueron: tetraborato sódico, tris y dihidrógeno fosfato sódico.

La concentración elegida para todas las disoluciones tampón fue de 50 mM, controlando que la corriente en el capilar no fuese muy elevada ya que esto podría dar lugar a un incremento del efecto Joule y a irreproducibilidad en las señales.

Los electroferogramas obtenidos empleando las distintas disoluciones tampón se muestran en la Figura II-2.

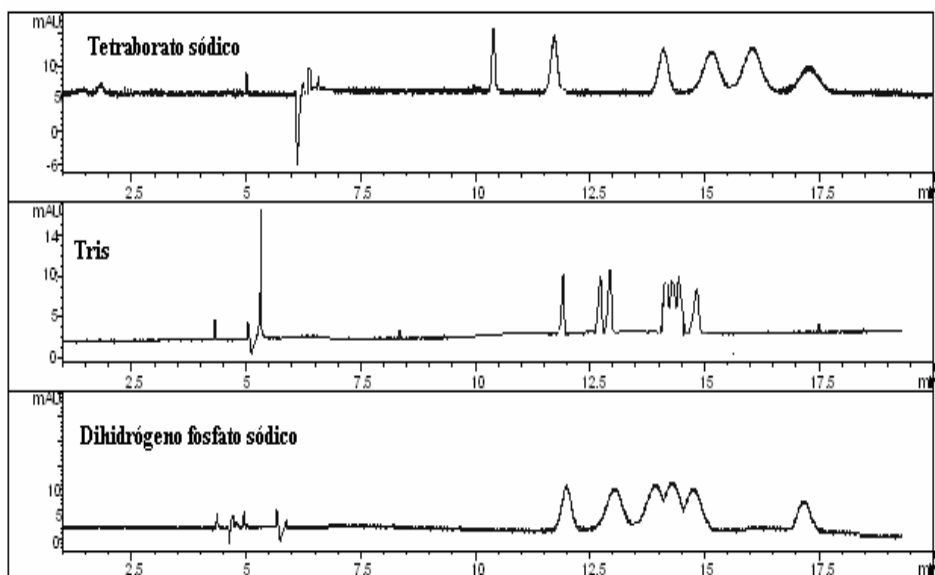


Figura II-2 Optimización de la naturaleza de la disolución tampón electroforética (pH 8).

Los electroferogramas muestran que con el tampón Tris se obtienen los mejores resultados pues, aunque la resolución no es aún completa, si se observa la señal correspondiente a cada uno de los siete analitos en estudio en un tiempo de análisis más corto.

5.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN

La concentración a usar de la disolución tampón seleccionada (Tris, pH 8) como medio de separación fue el siguiente parámetro en estudio, y el criterio para seleccionar la más adecuada fue conseguir la mejor resolución de los analitos. Se impusieron dos limitaciones en la optimización: (1) que el tiempo de análisis no fuera excesivamente largo y (2) que la corriente del capilar se mantuviera dentro de unos rangos admisibles (por debajo de 140 μ A).

El rango de concentraciones en las que se realizó el estudio fue de 30-200 mM. En la Figura II-3 se muestran los electroferogramas para el intervalo comprendido entre 30 - 200 mM. Los antibióticos β -lactámicos que más problemas presentaron en su separación fueron: DICLOX, CLOXA y OXA.

La resolución entre estos picos alcanzaba el óptimo a partir de una concentración 150 mM; por debajo de ésta la resolución era muy baja y por encima de 175 mM el tiempo de análisis se alarga considerablemente.

Finalmente se seleccionó una concentración de 175 mM, ya que la corriente producida era correcta, la resolución era adecuada y el tiempo de análisis aceptable.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

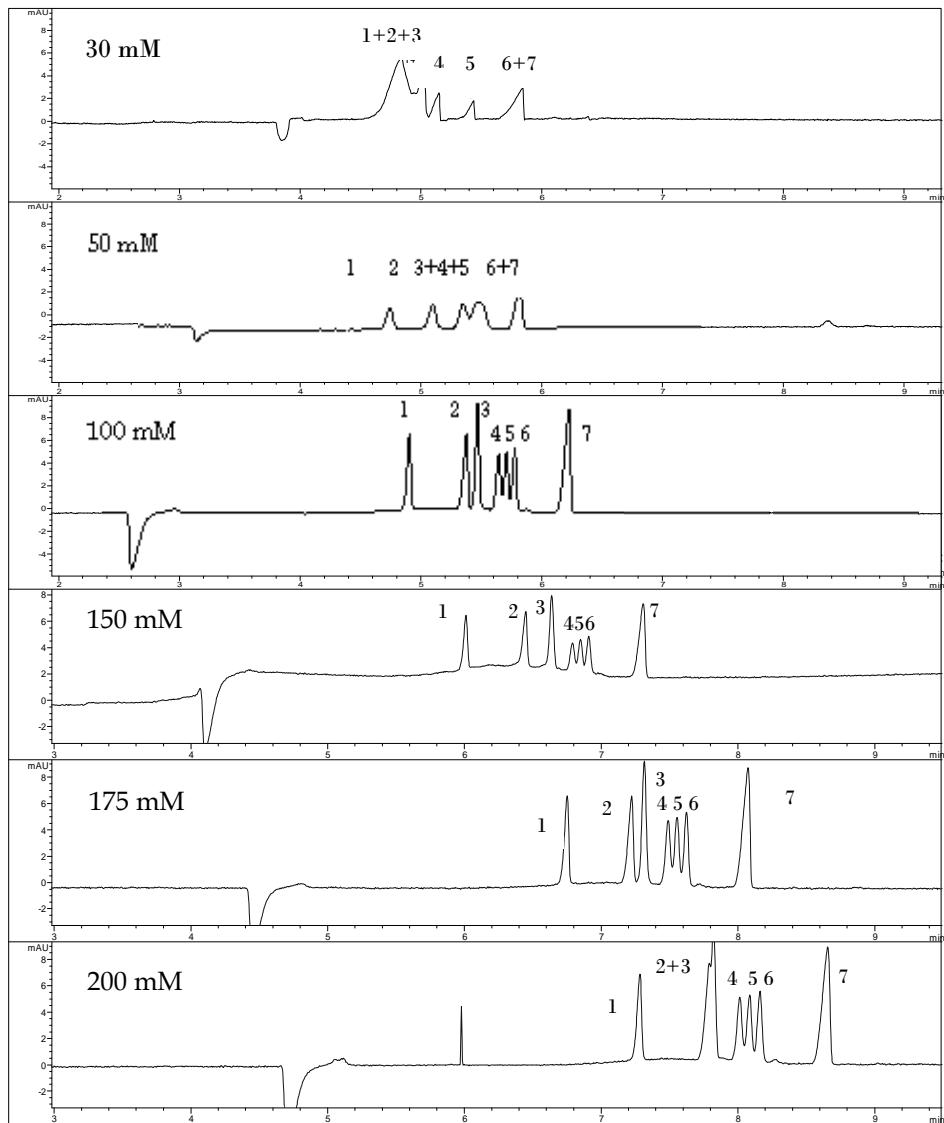


Figura II-3. Optimización de la concentración de la disolución tampón Tris de pH 8 en la separación electroforética 1. AMOX, 2. AMPI, 3.NAFCl, 4. DICLOX, 5.CLOXA, 6.OXA, 7.PENG.

5.1.4. EMPLEO DE MODIFICADOR ORGÁNICO

Una vez definida la concentración de la disolución tampón, se probó el uso de un modificador orgánico para aumentar la resolución entre los picos. Los modificadores orgánicos probados fueron: metanol, isopropanol, acetonitrilo y acetona, usando un tampón tris 175 mM a pH 8, y llevando a cabo un estudio con cada uno de los modificadores orgánicos con porcentajes en el tampón de separación comprendidos entre 5 y 30 %, en intervalos del 5% para cada uno de ellos, obteniéndose los mejores resultados, en cuanto a resolución de los picos y tiempo de análisis, con metanol. El valor óptimo seleccionado fue 20%, ya que era el valor al que se obtenía mejor resolución en menor tiempo.

La Figura II-4 presenta los electroferogramas obtenidos en esta experiencia a 10, 20 y 30%, donde se observa que a 20% de metanol, la separación de todos los compuestos es completa, en un tiempo de aprox. 15 minutos.

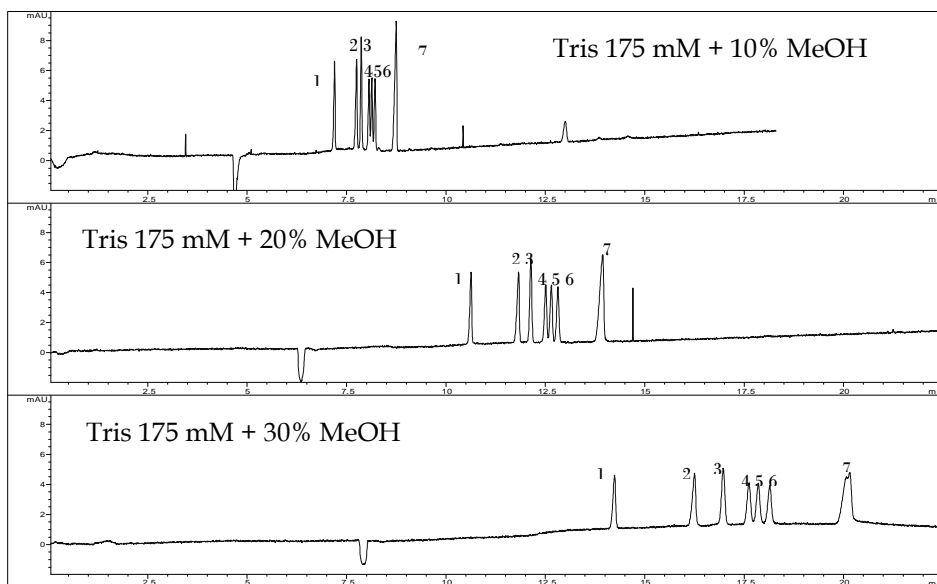


Figura II-4. Optimización del porcentaje de metanol usado como modificador orgánico en el tampón de separación Tris 175 mM, pH 8. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCI, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG.

5.2. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Usando las condiciones del sistema previamente optimizadas en el apartado anterior y una disolución mezcla de los siete antibióticos β -lactámicos en estudio de concentración de 10 mg/L para cada analito, se procedió al estudio de las variables instrumentales influyentes en la separación.

5.2.1. SELECCIÓN DEL CAPILAR

Un parámetro importante que se modificó en esta parte de la optimización, fue el diámetro interno del capilar de separación. Hasta ahora el capilar usado era de 50 μm de d.i. y una longitud de 64.5 cm. Este capilar se cambió por uno de d.i. de 75 μm y una ventana de detección de 200 μm . El aumento del diámetro interno del capilar provoca una pérdida de resolución entre los picos y un aumento de la corriente, pero el empleo de este “capilar burbuja” proporciona un aumento en sensibilidad de unas 4 veces respecto al capilar de 50 μm .

Por último, se probaron dos longitudes de capilar totales: 48.5 cm y 64.5 cm. La longitud más favorable fue de 64.5 cm, ya que con 48.5 cm se presentaban dos grandes inconvenientes: no se conseguía la separación de los analitos y la corriente aumentó a valores de 240 μA , de ahí que para el resto del trabajo experimental se eligiera un capilar de 64.5 cm.

5.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL VOLTAJE Y TEMPERATURA DEL CAPILAR

En esta etapa de optimización de la separación, se comenzó modificando el voltaje entre 15 y 30 kV. Se encontró que el valor que mejores resultados proporcionaba era el de 30 kV, ya que con este valor la resolución no

empeoraba, y el tiempo de análisis mejoraba levemente con respecto a valores más bajos. Los resultados de los electroferogramas se muestran en la Figura II-5.

El estudio de la temperatura del capilar se realizó a 20, 25 y 30°C. Se observó que la variación de temperatura no influía demasiado ni en la señal ni en la resolución de los picos, por lo que se seleccionó una temperatura de 30°C, próxima a la temperatura ambiente, descartando temperaturas superiores, ya que estamos trabajando con antibióticos muy sensibles y una mayor temperatura suponía una degradación de los analitos.

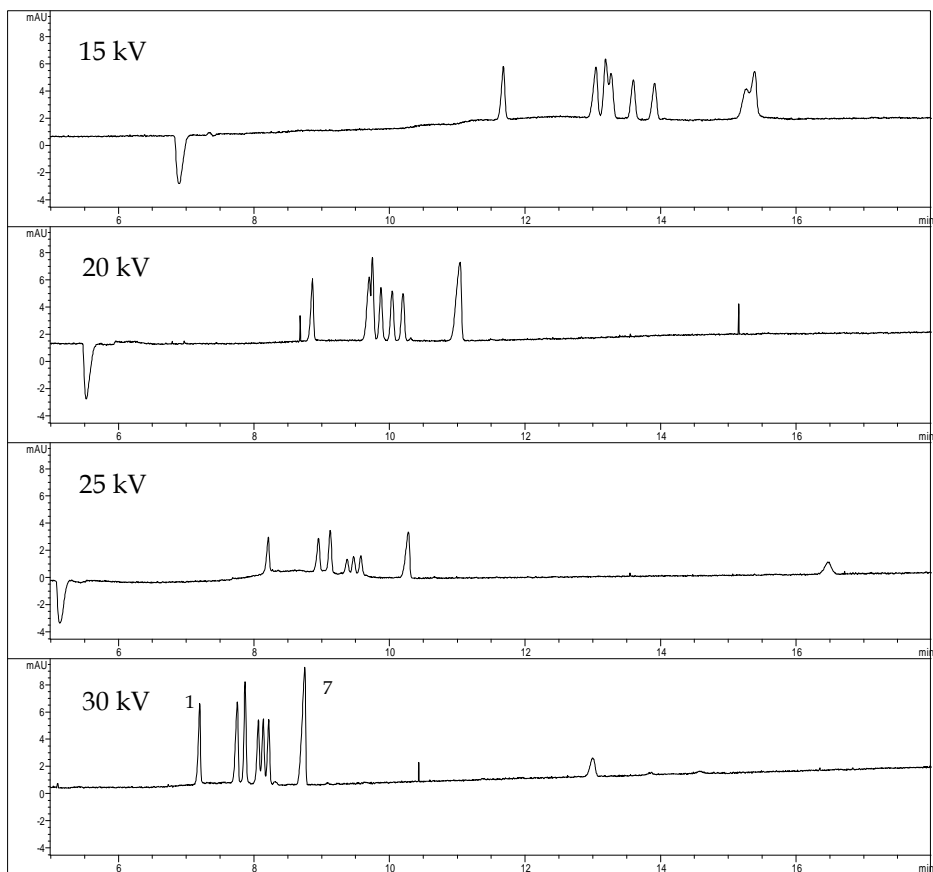


Figura II-5. Optimización del voltaje de separación. Tampón empleado Tris 175 mM con 20% MeOH, pH 8. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCl, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG.

5.3. DESARROLLO DEL MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

Considerando la baja sensibilidad que presenta la CE con detección UV/Vis, el empleo directo de esta técnica para el análisis de residuos de antibióticos β -lactámicos no sería adecuado para su aplicación en alimentos de origen animal, ya que los límites de detección obtenidos estarían por encima de los LMRs impuestos por la legislación de la UE. Por este motivo, se ha recurrido a un método de preconcentración on-line como es el apilamiento de muestra de gran volumen (LVSS), descrito en la introducción de esta memoria, con objeto de conseguir la preconcentración de la muestra en el propio capilar, mejorando la sensibilidad significativamente (Figura 16, introducción).

Los analitos considerados en este estudio deben encontrarse cargados negativamente al pH de trabajo para poder aplicar *LVSS con cambio de polaridad para aniones*. El proceso seguido en este tipo de preconcentración es el siguiente:

- Al inicio del análisis, se inyecta, mediante presión en el capilar, una gran cantidad de muestra disuelta en un disolvente de baja conductividad.
- Posteriormente se aplica un voltaje de polaridad negativa con objeto de focalizar la muestra en una pequeña parte en la entrada del capilar y retirar la matriz de la misma.
- Cuando los aniones están totalmente focalizados en el inicio del capilar y la mayor parte de la matriz ha sido eliminada, se para el voltaje aplicado y se cambia la polaridad. Esto se consigue cuando la corriente ha alcanzado un 95-99% del valor que presenta cuando el capilar contiene sólo disolución tampón.

- Finalmente, se aplica un voltaje con polaridad positiva con objeto de separar y detectar los analitos concentrados.

En LVSS, se han de optimizar tres parámetros importantes: disolvente de la muestra, tamaño de muestra inyectada y voltaje de polaridad negativa aplicado. Para realizar el estudio se partió de una disolución mezcla de analitos con una concentración de cada uno de ellos de 10 mg/L, sin embargo al llevar a cabo el proceso de preconcentración se obtuvieron señales excesivamente elevadas, llegando a solaparse la mayoría de los picos, por lo que disminuimos la concentración de cada uno de ellos, hasta quedarnos finalmente con una disolución mezcla que contenía una concentración de 0.5 mg/L para NAFCl, 1.5 mg/L de DICLOX, CLOXA y OXA, 2.5 mg/L de AMOX y 3.5 mg/L de AMPI y PENG.

5.3.1. SELECCIÓN DEL DISOLVENTE

La variable más significativa en este tipo de preconcentración es el disolvente de la muestra, porque éste requiere una muy baja conductividad para obtener la mayor focalización de los analitos, ya que en este medio éstos migrarán más lentamente produciéndose el fenómeno de apilamiento. Se estudiaron distintos disolventes de la muestra: agua, metanol y etanol, teniendo en cuenta su baja conductividad. El tampón electroforético no se usó como disolvente de muestra, porque presenta una mayor conductividad que otros disolventes probados, provocando una disminución en la efectividad de LVSS. Empleando metanol o etanol, los antibióticos β -lactámicos se descomponían, siendo los mejores resultados los obtenidos, por tanto, con el agua como disolvente.

5.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA INYECTADA

Para optimizar el tamaño de muestra inyectada, se probaron diferentes porcentajes (50, 70, 90 y 100%) de llenado del total del capilar. Estos porcentajes fueron estimados, basándonos en el diámetro y longitud del capilar y en la presión aplicada. Los resultados mostraron que era posible llenar todo el capilar aplicando una presión de 7 bares durante 1 minuto.

5.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CORRIENTE DE INVERSIÓN

El voltaje negativo aplicado para llevar a cabo la focalización de los analitos en el capilar, se estudió en un rango comprendido entre -15 y -30 kV. Finalmente se seleccionó -20 kV como el voltaje óptimo, puesto que este valor permite un llenado rápido del capilar con adecuada estabilidad de la corriente y separación de los analitos en estudio. Valores mayores de -20 kV provocaban, con bastante frecuencia, el solapamiento de los picos y algunas veces inestabilidad de la corriente.

Una vez optimizadas todas las variables que afectan al LVSS, el proceso se completaba en aproximadamente 5 minutos, obteniéndose un aumento de la sensibilidad de aproximadamente 8 veces.

Los electroferogramas correspondientes a la mezcla de antibióticos en las condiciones optimizadas previamente y tras la aplicación de LVSS se muestran en la Figura II-6, donde se observa un significativo incremento de la señal una vez que hemos aplicado el proceso de preconcentración LVSS. Como puede comprobarse, se ha incluido el ácido p-aminobenzoico (PABA) como patrón interno, ya utilizado en el método propuesto en el Capítulo 1.

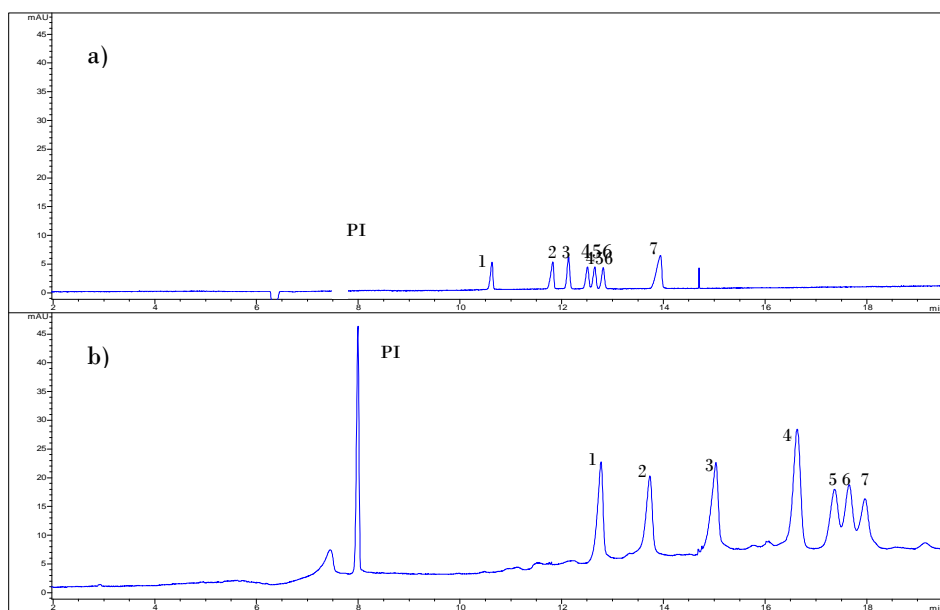


Figura II-6. Comparación de los electroferogramas usando a) inyección normal, b) preconcentración mediante apilamiento de muestra de gran volumen (LVSS), a una concentración de 2.5 mg/L para 1.AMOX, y 3.5 mg/L para 2.AMPI y 3. PENG, 0.5 mg/L de 3.NAFCl, y 1.5 mg/L de 4. DICLOX, 5.CLOXA y 6. OXA, PI. PABA.

A continuación se muestran los valores óptimos obtenidos tanto para la separación electroforética como para el LVSS (Tabla II-1).

Tabla II-1. Valores óptimos para la separación y aplicación de LVSS.

Capilar	64.5 cm. de longitud, 75 μ m de d.i., con una ventana de detección de 200 μ m
pH	8.0
Disolución Tampón	Tris, 175 mM con 20% de etanol
Voltaje separación	30 kV
Temperatura	30°C
Voltaje para LVSS	-20 kV
Disolvente de la muestra para LVSS	Agua Milli-Q
Volumen de muestra inyectada	100% del volumen del capilar

5.4. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

5.4.1. RECTAS DE CALIBRADO

La linealidad de la respuesta se comprobó a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 0.2, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/L de AMOX y AMPI; 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/L de PENG; 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 mg/L de OXA, CLOXA y DICLOX y 0.02, 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mg/L para NAFCL. Se empleó PABA como patrón interno con objeto de conseguir una mayor reproducibilidad en las señales y en los tiempos de migración. En todos los casos la concentración empleada fue 0.5 mg/L.

Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado. Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico relativas corregidas (relación entre el área de pico del analito dividida por el tiempo de migración y el área del patrón interno dividida por el tiempo de migración) en función de la concentración de cada analito. La representación gráfica de las rectas de calibrado se muestra en la Figura II-7.

Los parámetros estadísticos calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla II-2. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para los antibióticos β -lactámicos se ajustan a un modelo lineal en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido como recomienda la IUPAC [258].

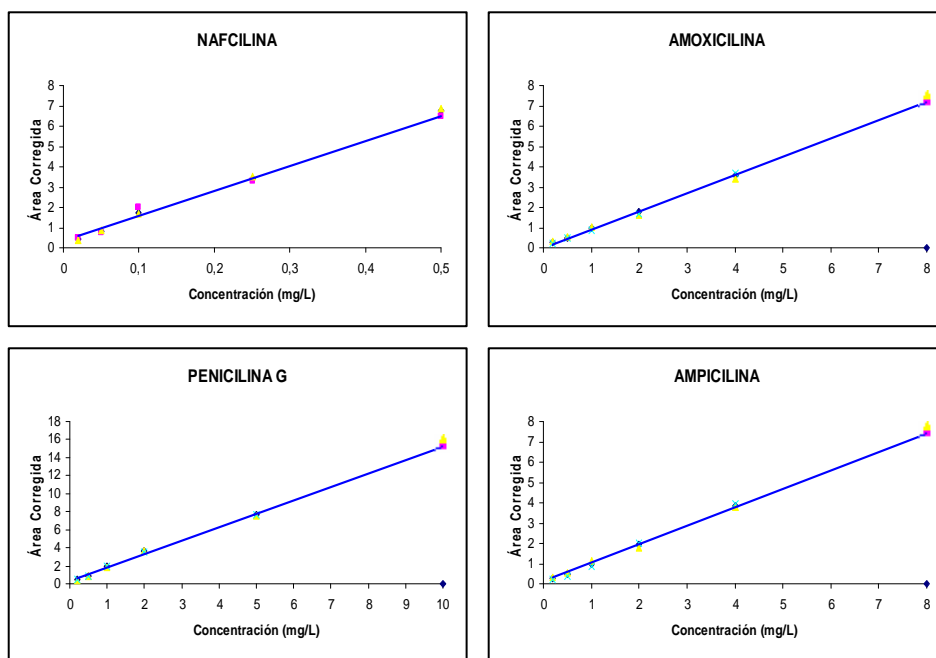


Figura II-7. Rectas de calibrado de los antibióticos β -lactámicos determinados.

[258] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemical, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC 2002.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

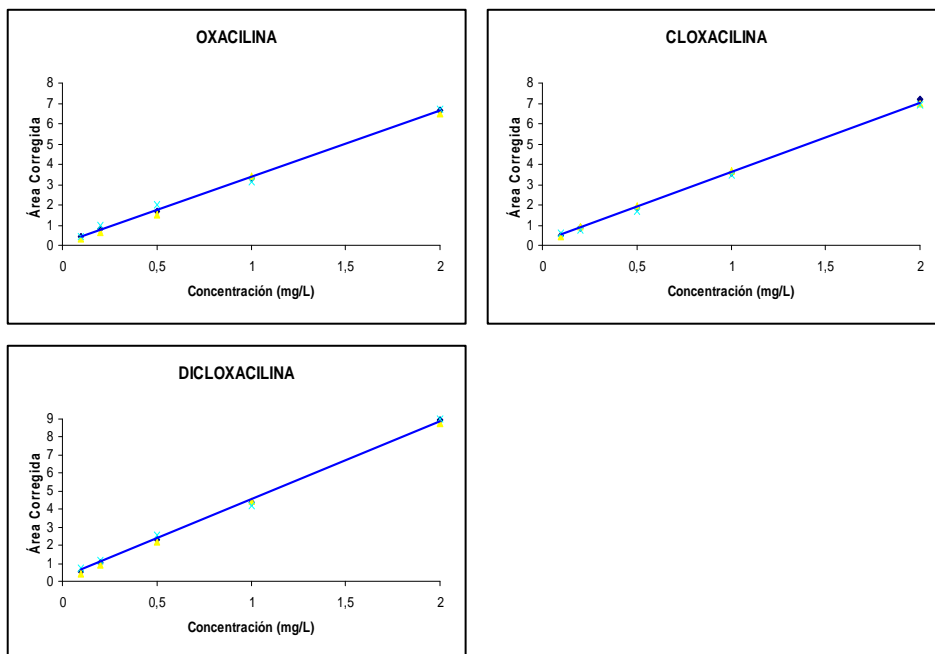


Figura II-7 (Cont.). Rectas de calibrado de los antibióticos β -lactámicos determinados.

Tabla II-2. Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto (concentración frente a áreas de pico relativas corregidas).

Analito	Rango lineal (mg/L)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
AMPI	0.05-8	0.18	0.11	99.7	0.05	0.18
AMOX	0.05-8	0.37	0.12	99.6	0.05	0.15
DICLOX	0.04-2	0.09	0.33	99.8	0.04	0.14
CLOXA	0.04-2	0.08	0.22	99.6	0.04	0.14
OXA	0.04-2	0.03	0.15	99.9	0.04	0.13
PENG	0.05-10	2.77	4.67	99.3	0.05	0.17
NAFCI	0.007-0.5	0.09	1.36	99.9	0.007	0.02

5.4.2. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

El estudio de la de precisión para el método propuesto a diferentes concentraciones se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Repetibilidad o precisión intradía: se midieron tres disoluciones patrón (réplicas experimentales), a tres niveles de concentración, (**nivel 1:** 0.02 mg/L para NAFCl, 0.2 mg/L AMOX, PENG y AMPI, 0.1 mg/L para OXA, CLOXA y DICLOX, **nivel 2:** 0.1 mg/L para NAFCl, 1 mg/L para AMOX, PENG y AMPI, 0.5 mg/L para OXA, CLOXA y DICLOX, **Nivel 3:** 1 mg/L para NAFCl, 4 mg/L para AMOX, PENG y AMPI, 2 mg/L para OXA, CLOXA y DICLOX), Tabla II-3, y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales).
- Precisión intermedia o interdía: se llevó a cabo por el mismo procedimiento del estudio anterior, pero analizando una disolución patrón, durante 5 días e inyectado por triplicado.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración (Tabla II-3).

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS
CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

Tabla II-3. Estudio de precisión para el método propuesto referido a distintos niveles de concentraciones y tiempos de migración

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOX	DICLOX
Intradía DER (%) (n=9)							
Nivel 1	6.1	7.2	5.4	7.5	6.8	6.7	6.1
Nivel 2	5.8	7.1	6.1	7.7	7.1	5.8	6.0
Nivel 3	7.0	6.9	6.6	7.0	6.2	6.2	5.7
Tiempo migración (min)	21.9	16.4	28.4	22.6	25.0	24.7	23.6
DER (%)	0.6	0.7	0.8	0.5	0.7	0.7	0.5
Interdía DER (%) (n=15)							
Nivel 1	5.1	5.4	6.1	5.7	5.8	6.3	4.1
Nivel 2	5.9	6.7	5.9	7.0	6.2	5.4	6.3
Nivel 3	6.3	6.2	5.1	5.3	6.0	7.1	6.6
Tiempo migración (min)	23.2	18.4	30.8	25.0	27.4	29.7	25.3
DER (%)	4.4	5.1	3.9	6.2	4.7	4.9	5.0

Nivel 1: 0.02 mg/L para NAFCI, 0.2 mg/L AMOX, PENG y AMPI, 0.1 mg/L para OXA, CLOXA y DICLOX.

Nivel 2: 0.1 mg/L para NAFCI, 1 mg/L para AMOX, PENG y AMPI, 0.5 mg/L para OXA, CLOXA y DICLOX.

Nivel 3: 0.5 mg/L para NAFCI, 4 mg/L, AMOX, PENG y AMPI, 2 mg/L para OXA, CLOXA y DICLOX.

5.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA, CABRA Y AGUAS

Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado en muestras reales, se escogieron muestras de alimentos de origen animal como la leche, y de tipo medioambiental como el agua.

La aplicación a muestras de leche de distinta naturaleza se realizó dado que es frecuente la presencia de este tipo de residuos en esta matriz ya que se usan para combatir la mastitis en los animales, enfermedad que puede provocar importantes pérdidas económicas. Por otra parte, se seleccionaron muestras de agua de distinta procedencia, debido a que es posible que las aguas naturales o residuales puedan estar contaminadas con residuos de ciertos antibióticos tras su empleo en granjas o debido a la ausencia de procesos de eliminación de éstos en estaciones depuradoras, como ya se comentó en la introducción.

5.5.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA Y CABRA

Los tipos de leche seleccionados para su estudio fueron: leche de vaca sin tratar suministrada por Puleva Biotech (Granada, España), leche de vaca desnatada comercial (Puleva) y leche de cabra sin tratar procedente de una granja situada en Guadix (Granada, España).

5.5.1.1. Tratamiento de las muestras

El tratamiento propuesto para este tipo de muestras se basó en el método, llevado a cabo por Holstege y col. [259], tras las correspondientes modificaciones para conseguir la extracción de todos los antibióticos β -lactámicos en estudio. Este método se basó en una extracción sólido-líquido con acetonitrilo (ACN) y posterior uso de la extracción en fase sólida (SPE) con objeto de preconcentrar los analitos y limpiar la muestra. Para ello se utilizó un tándem de cartuchos de extracción: en primer lugar Oasis® HLB, que presenta como empaquetamiento un copolímero macroporoso con funciones lipofílicas e hidrofílicas y que permite retener los analitos y Alúmina N, que es un adsorbente polar que permitirá la eliminación de sustancias endógenas de la matriz.

A continuación se recoge el tratamiento de muestra propuesto para la extracción (Figura II-8):

1. Se toman 5 mL de leche cruda de vaca, en un tubo de centrifuga (40 mL).
2. Se añaden 5 mL de acetonitrilo y se agita 1 min en vortex.
3. Se añaden 10 mL más de acetonitrilo y se agita 1 min en vortex.
4. Se centrifuga a 1800 rpm durante 5 minutos.
5. El sobrenadante se lleva a casi sequedad (0.5 mL aprox.) en corriente de nitrógeno.
6. Se recompone con 3 mL de disolución tampón fosfato de pH 8.5.
7. Pasamos la muestra a través de los cartuchos HLB (60 mg, 3 mL), previamente activados con:

[259] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 406.

- . 5 mL de metanol
- . 5 mL de acetonitrilo
- . 5 mL de agua Milli-Q
- . 3 mL de disolución tampón fosfato pH 8.5.

8. Los antibióticos se eluyen con 6 mL de acetonitrilo a una velocidad de 1 - 2 mL/min empleando bomba de vacío.

9. El eluato se pasa a través de un cartucho de Alúmina N (500 mg, 3 mL) (fabricado en el laboratorio), previamente activado con:

- . 4 mL de agua Milli-Q
- . 4 mL de acetonitrilo, a una velocidad de 1 mL/min.

10. Se eluye con 3 mL de agua Milli-Q

11. Se evapora en corriente de nitrógeno.

13. Se reconstituye con 0.5 mL de agua Milli-Q que contiene el patrón interno (PABA, 0.5 mg/L) y se somete éste al análisis mediante el método propuesto (Ver Figura II-8).

La Figura II-9 presenta los electroferogramas obtenidos para una muestra de leche de vaca sin tratar y sin fortificar con los antibióticos β -lactámicos y el obtenido para una muestra de vaca a la que se han añadido las concentraciones indicadas de cada uno de los analitos. La Figura II-10 muestra los resultados obtenidos para una muestra de leche de cabra y el electroferograma obtenido para una muestra de leche de vaca desnatada comercial se muestran en la figura II-11. El análisis de los blancos de cada una de las leches analizadas mostró que no había residuos previos de los analitos en las mismas ni sustancias que coemigraban a los mismos tiempos de migración.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

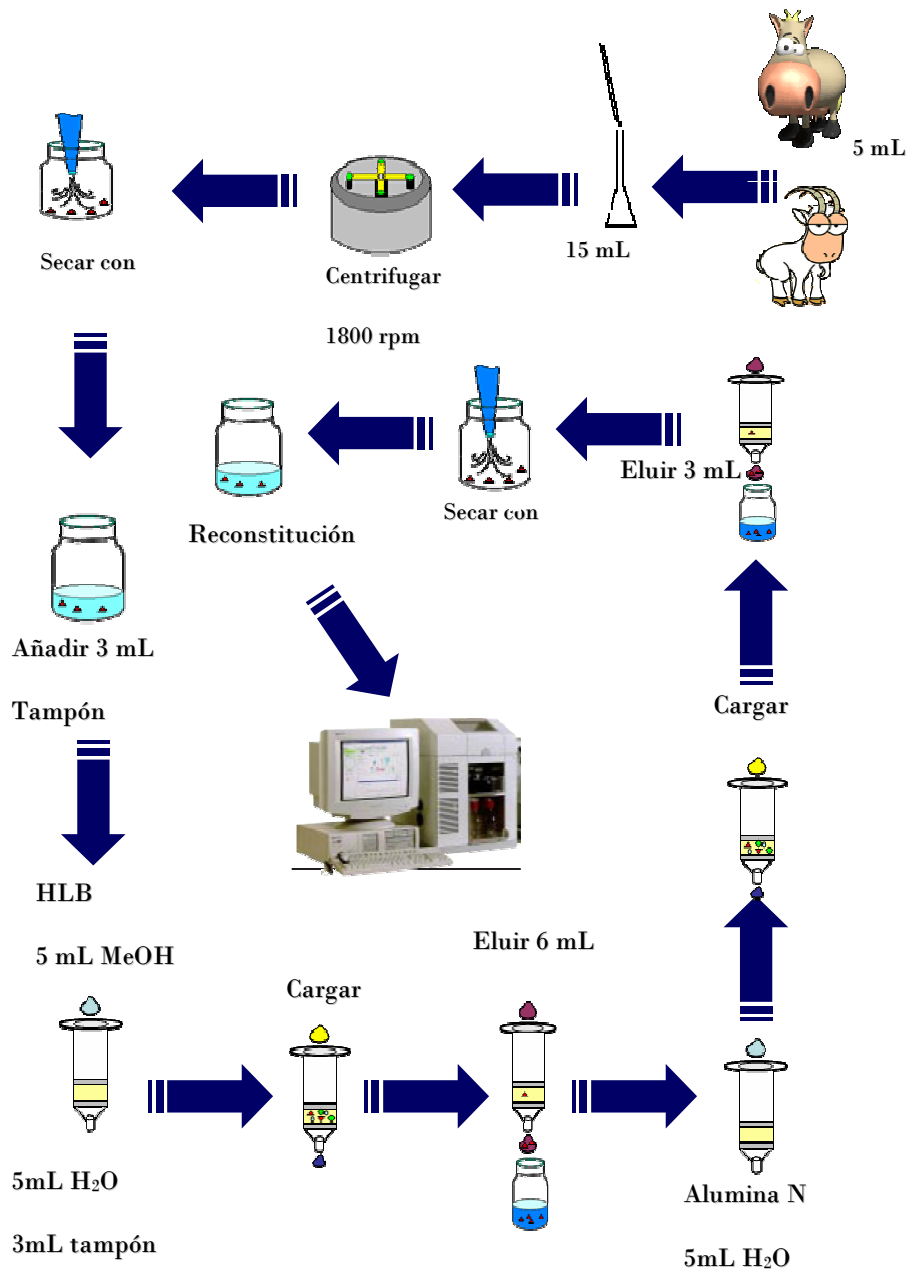


Figura II-8. Esquema del tratamiento de muestra para el análisis de β -lactámicos en leche por el método propuesto.

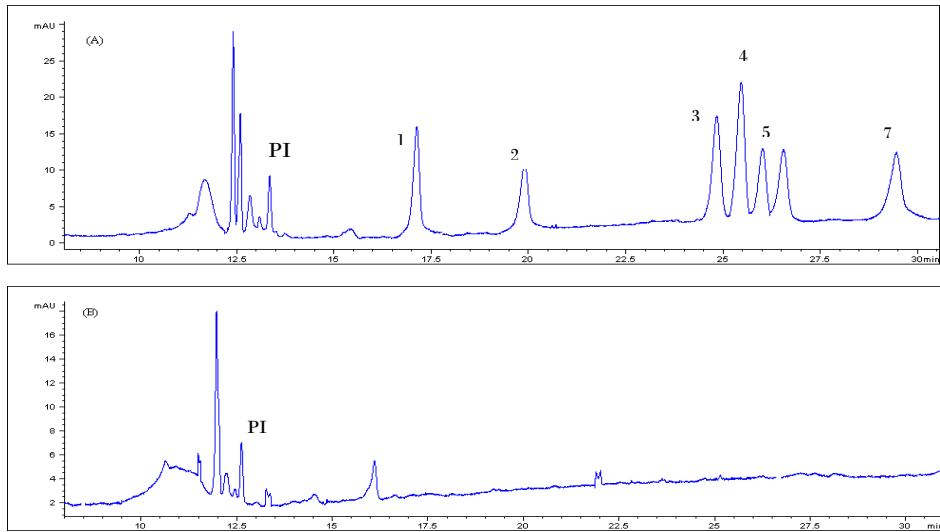


Figura II-9. (A) Electroferograma de una muestra de leche de vaca cruda, dopada con 1.AMOX, 200 $\mu\text{g/L}$; 2.AMPI, 200 $\mu\text{g/L}$; 3. NAFCl, 20 $\mu\text{g/L}$; 4. DICLOX, 100 $\mu\text{g/L}$; 5. CLOXA, 100 $\mu\text{g/L}$; 6. OXA, 100 $\mu\text{g/L}$; 7. PENG, 200 $\mu\text{g/L}$. PI. PABA 20 $\mu\text{g/L}$ (B) Blanco de leche de vaca cruda.

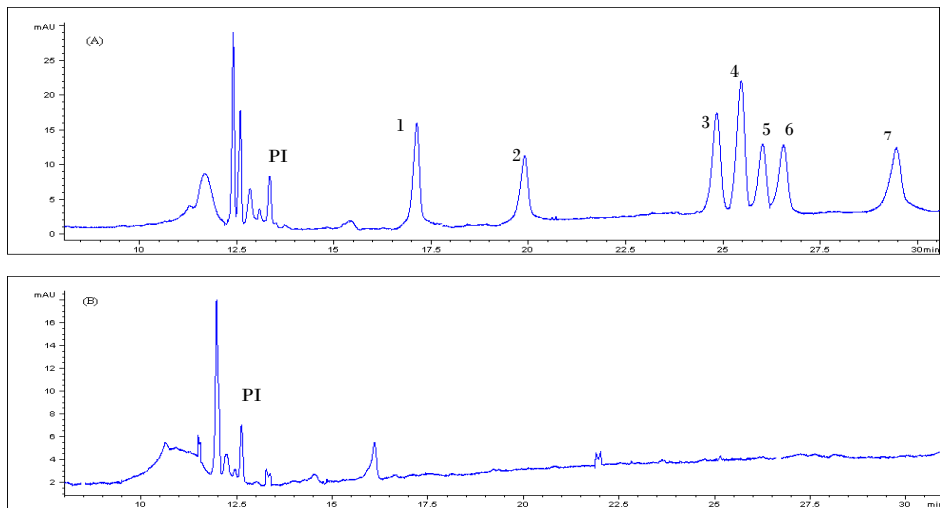


Figura II-10. Electroferogramas de (A) muestra de leche de cabra cruda dopada con 200 $\mu\text{g/L}$ de 1. AMOX, 2. AMPI y 7. PENG; 20 $\mu\text{g/L}$ de 3. NAFCl; 100 $\mu\text{g/L}$ de 4. DICLOX, 5. CLOX, 6. OXA; (B) Blanco de leche de cabra cruda, obtenidos mediante el método SPE-LVSS-CE propuesto. PI. PABA, 20 $\mu\text{g/L}$.

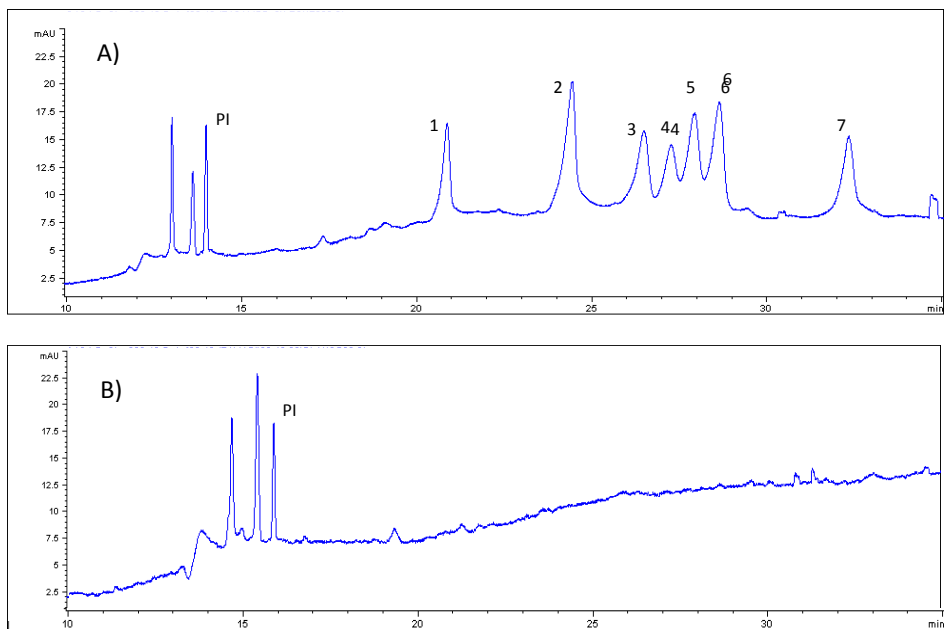


Figura II-11. Electroferogramas de (A) muestra de leche desnatada de vaca dopada con 200 $\mu\text{g/L}$ de 1. AMOX , 2.AMPI y 7. PENG; 20 $\mu\text{g/L}$ de 3. NAFCI; 100 $\mu\text{g/L}$ de 4. DICLOX, 5. CLOX, 6. OXA; (B) Blanco de leche desnatada de vaca, obtenidos mediante el método SPE-LVSS-CE propuesto. PI. PABA, 20 $\mu\text{g/L}$.

5.5.1.2. Validación del método para el análisis de muestras de leche

El método analítico propuesto para el análisis de estos residuos en muestras de leche se validó en términos de linealidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), precisión y veracidad.

5.5.1.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

Se construyeron las correspondientes rectas de calibrado en presencia de matriz, usando para ello leche de vaca sin tratar, libre de los antibióticos en estudio. Las rectas de calibrado para los antibióticos β -lactámicos seleccionados se obtuvieron mediante fortificación de las muestras, antes del tratamiento, con

concentraciones crecientes. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 40, 100, 200, 400, 800 y 1600 $\mu\text{g/L}$ para AMOX y AMPI, 40, 100, 200, 400, 1000 y 1500 $\mu\text{g/L}$ para PENG, 20, 40, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/L}$ para DICLOX, CLOXA y OXA y finalmente 4, 10, 20, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/L}$ para NAFCL. En todos los casos, 20 $\mu\text{g/L}$ de PABA (PI) se añadieron durante la etapa de reconstitución del extracto, antes de la medida. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración. Las funciones de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas corregidas (Figura II-12).

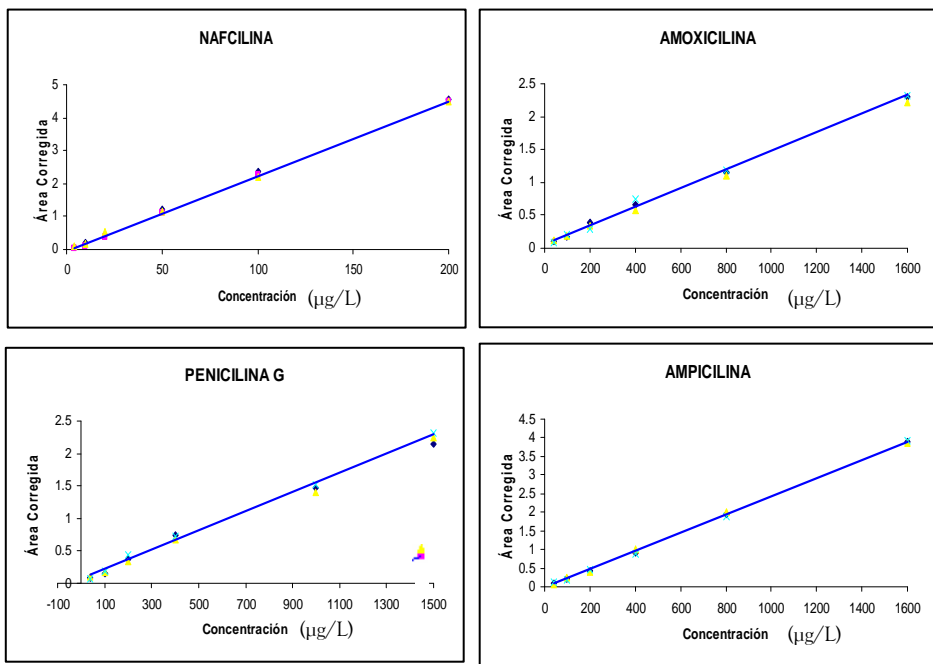


Figura II-12. Rectas de calibrado para muestra de leche de los siete antibióticos β -lactámicos seleccionados.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

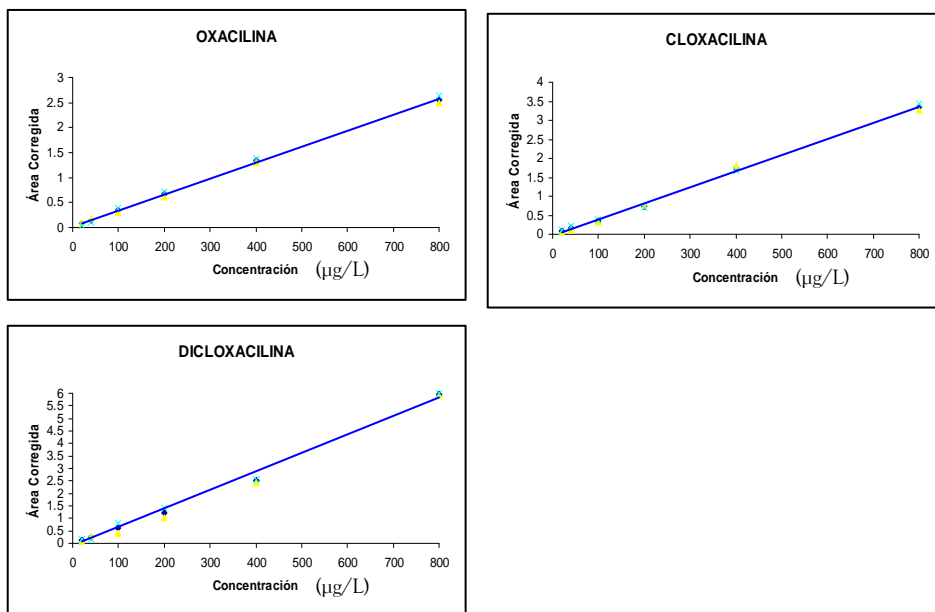


Figura II-12 (Cont.). Rectas de calibrado para muestra de leche de los siete antibióticos β -lactámicos seleccionados.

Los parámetros estadísticos, calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla II.4. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para los antibióticos β -lactámicos son lineales en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido (S/N).

Tabla II-4. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto (concentración frente a áreas de pico relativas corregidas). Se incluyen los LMRs legislados para estos compuestos en leche.*

Analito	Rango lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD ^a (µg/L)	LOQ ^b (µg/L)	LMRs (µg/L)
AMPI	2-1600	-0.026	3.8	99.3	2	7	4
AMOX	2-1600	0.079	2.6	99.9	2	8	4
DICLOX	10-800	0.071	10.4	99.2	10	19	30
CLOXA	9-800	0.046	5.3	99.4	9	20	30
OXA	9-800	0.058	6.1	99.2	9	20	30
PENG	3-1500	0.096	3.0	99.2	3	10	4
NAFCI	2-200	0.091	37.6	99.2	2	4	30

(a) Tres veces la relación señal ruido.

(b) Diez veces la relación señal ruido.

5.5.1.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por medio de aplicaciones repetidas del procedimiento de SPE a dos muestras (réplicas experimentales) para cada nivel de concentración, (nivel 1: 50 µg/L para NAFCI, 400 µg/L AMOX y AMPI, 200 µg/L para OXA, CLOXA, DICLOX y PENG, nivel 2: 20 µg/L para NAFCI, 200 µg/L para AMOX y AMPI, 100 µg/L para OXA, CLOXA, DICLOX y PENG Nivel 3: 10 µg/L para NAFCI, 100 µg/L, AMOX y AMPI, 40 µg/L para OXA, CLOXA, DICLOX y

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

PENG), y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se dan en la Tabla II-5. Como se puede comprobar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla II-5. Estudio de precisión para el método propuesto referido a distintos niveles de concentraciones y tiempos de migración

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOX	DICLOX
Intradía DER (%) (n=9)							
Nivel 1	4.8	4.3	4.4	2.5	2.8	2.7	5.7
Nivel 2	4.9	5.1	4.7	3.0	3.4	3.1	6.3
Nivel 3	5.1	5.3	4.9	5.3	3.7	4.9	4.5
Tiempo migración (min)	23.7	18.8	29.1	21.8	25.6	25.1	24.4
DER (%)	0.7	0.8	0.5	0.4	0.6	0.7	0.6
Interdía DER (%) (n=15)							
Nivel 1	4.0	4.2	3.9	3.1	2.8	2.3	4.1
Nivel 2	6.1	5.7	4.3	6.7	3.9	5.4	7.1
Nivel 3	8.3	7.1	5.4	6.3	5.9	6.1	6.7
Tiempo migración (min)	24.7	21.7	31.0	26.7	28.9	28.1	28.5
DER (%)	2.7	2.1	2.7	3.9	3.3	2.9	3.6

Nivel 1: 50 $\mu\text{g/L}$ para NAFCI, 400 $\mu\text{g/L}$ AMOX y AMPI, 200 $\mu\text{g/L}$ para OXA, CLOXA y DICLOX y PENG.

Nivel 2: 20 $\mu\text{g/L}$ para NAFCI, 200 $\mu\text{g/L}$ para AMOX y AMPI, 100 $\mu\text{g/L}$ para OXA, CLOXA, DICLOX y PENG.

Nivel 3: 10 $\mu\text{g/L}$ para NAFCI, 100 $\mu\text{g/L}$, AMOX y AMPI, 40 $\mu\text{g/L}$ para OXA, CLOXA, DICLOX y PENG.

5.5.1.2.3. *Estudio de la veracidad*

Para comprobar la veracidad del método propuesto para muestras de leche se llevaron a cabo estudios de recuperación, añadiendo los diferentes antibióticos β -lactámicos a muestras de leche de los tres tipos antes señalados, libres de los mismos. Las muestras de leche se doparon con una mezcla de los siete antibióticos β -lactámicos (AMPI, AMOX, PENG, CLOXA, DICLOX, OXA, NAFCI) a diferentes niveles de concentración (100, 200, 500 $\mu\text{g/L}$) de cada uno de ellos. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Las recuperaciones absolutas fueron calculadas comparando las áreas de pico relativas de muestras de leche dopadas antes del procedimiento de SPE con las áreas de pico relativas de patrones. Las recuperaciones fueron mayores del 85% en todos los casos con DER aceptables. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla II-6.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN ON-LINE

TablaII-6. Recuperaciones obtenidas en muestras de leche cruda de vaca dopadas a distintos niveles de concentración de los siete antibióticos β -lactámicos.

			AMOX	AMPI	CLOX	DICLOX	OXA	NAFCI	PEN G
Leche cruda vaca	500 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	88	89	88	89	90	~	~
		DER (%)	3.3	3.8	2.9	4.9	3.2	~	~
	200 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	88	90	88	87	89	90	90
		DER (%)	4.2	2.5	2.6	5.6	2.7	4.8	4.4
	100 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	87	86	88	87	88	90	91
		DER (%)	4.4	3.1	3.5	4.6	3.1	3.9	4.1
Leche desnatada vaca	500 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	90	92	92	93	92	~	~
		DER (%)	4.2	2.9	3.2	3.5	4.1	~	~
	200 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	88	92	92	92	90	93	92
		DER (%)	3.5	3.7	4.2	5.0	4.9	3.9	4.8
	100 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	88	92	90	90	90	93	91
		DER (%)	4.9	3.4	4.8	5.2	4.5	3.8	4.4
Leche cruda cabra	500 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	90	89	90	89	88	~	~
		DER (%)	4.6	2.3	3.7	3.1	4.5	~	~
	200 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	89	88	87	89	88	88	89
		DER (%)	3.7	3.2	3.7	2.8	6.1	5.4	4.4
	100 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	88	88	87	88	87	88	90
		DER (%)	4.9	3.7	4.9	3.8	4.1	4.4	5.1

Como puede observarse, el método propuesto proporciona buenos resultados en términos de precisión y veracidad, con recuperaciones cuantitativas.

5.5.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS PROCEDENTES DE ESTACIÓN DEPURADORA, POZO Y RÍO

El método propuesto se aplicó también a la determinación de estos mismos antibióticos β -lactámicos en muestras de agua, procedentes tanto de una EDAR ubicada en la Vega de Granada, como de pozo, situado en Guadix (Granada, España) y de río, recogida del río Fardes (Granada, España).

5.5.2.1. Tratamiento de las muestras

El método a seguir básicamente es el mismo que se ha empleado en la determinación de estos compuestos en muestras de leche. La única diferencia reside en las etapas de preconcentración y limpieza, ya que la etapa de limpieza únicamente se lleva a cabo en el agua residual, mientras que para el agua de pozo y río solo se emplea la etapa de preconcentración, pudiendo prescindir de la etapa de limpieza con cartuchos de Alúmina N, por lo que el tratamiento será más simple.

Los pasos a seguir en el procedimiento son los siguientes (ver Figura II-13)

1. Se toman 100 mL de agua
2. Se filtran a través de un filtro de membrana (0.2 μ m PTFE)
3. Se acondiciona el cartucho HLB (60 mg, 3 mL) con:
.5 mL de metanol

.5 mL de acetonitrilo

.5 mL de agua Milli-Q

4. Se pasa la muestra por la columna con objeto de retener los analitos, sin usar vacío.
5. Se eluyen los compuestos con 6 mL de acetonitrilo a una velocidad de 1 - 2 mL/min.
6. Se evapora en corriente de nitrógeno a 60°C, añadiendo acetonitrilo repetidamente para evitar que puedan quedar adheridos los analitos en las paredes del tubo, (a partir de aquí en el caso de aguas naturales, pasamos al punto 10, evitando el paso por los cartuchos de alúmina).
7. Se pasa la muestra por un cartucho de Alúmina N, previamente acondicionado con 5 mL de agua Milli-Q y 5 mL de acetonitrilo, (este paso, junto con el 8 y 9, se llevan a cabo únicamente para muestras de agua procedentes de una EDAR).
8. Se eluyen los compuestos con 3 mL de agua Milli-Q
9. Se evapora en corriente de nitrógeno
10. Se recompone hasta un volumen final de 1 mL que ya contiene el patrón interno, a una concentración de 10 $\mu\text{g/L}$
11. Se filtra a través de un filtro 0.2 μm de nylon, acrodisc.
12. Se aplica el método propuesto en LVSS-CE con objeto de realizar la determinación de los compuestos en estudio.

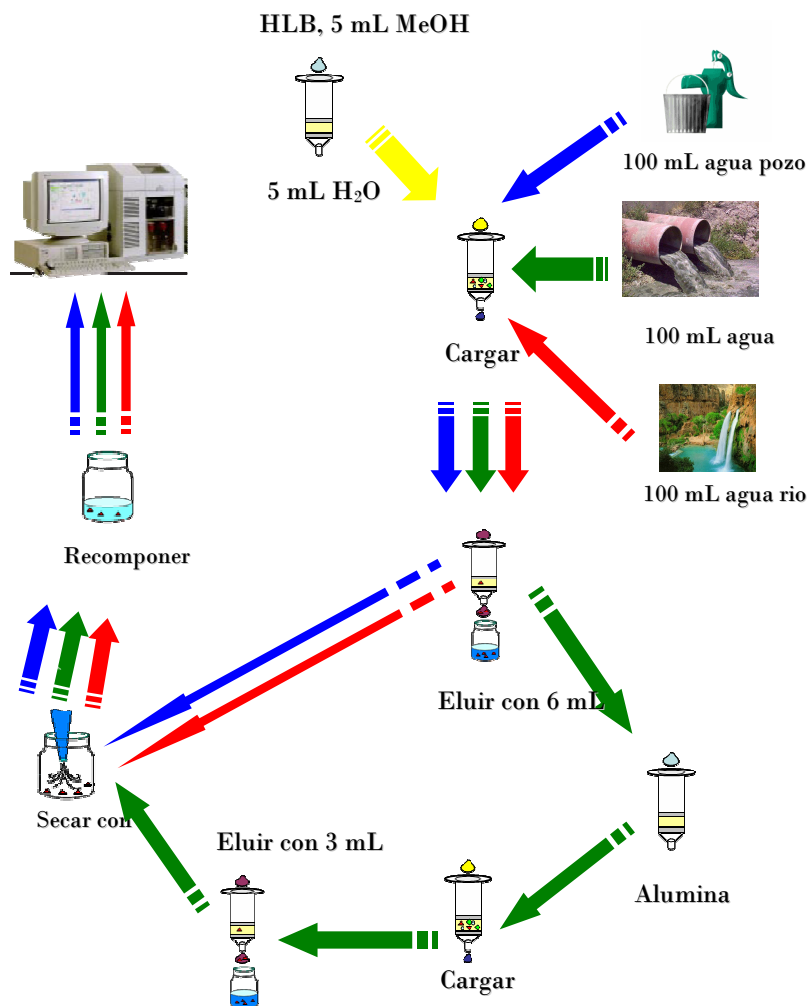


Figura II-13. Esquema del tratamiento de muestra para el análisis de β -lactámicos en aguas por el método propuesto.

A continuación, las Figuras II-14, II-15 y II-16 muestran los electroferogramas para muestras de agua de río, agua de pozo y agua residual, respectivamente, libres de los analitos en estudio, fortificadas junto con su blanco correspondiente, observándose que no existen compuestos de la matriz que comigren con los analitos en estudio, después del tratamiento de muestra.

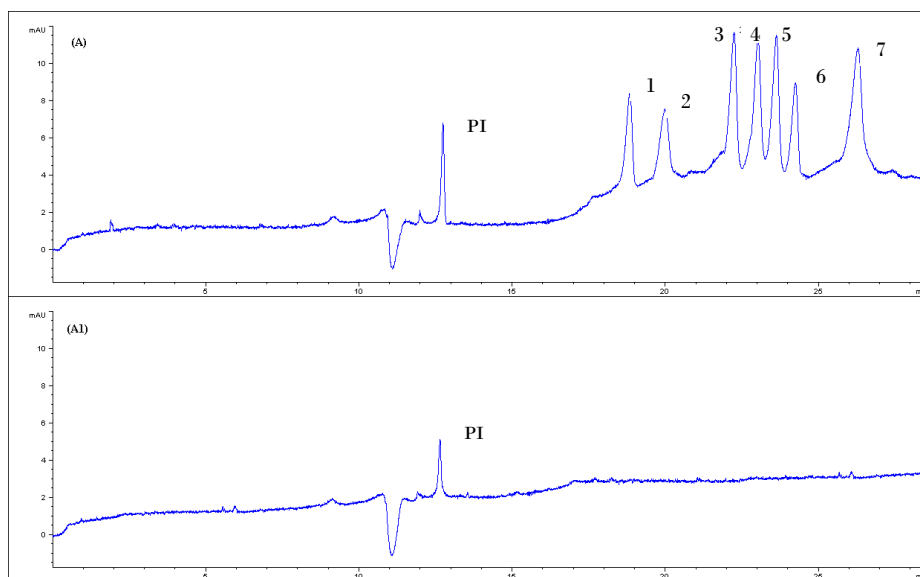


Figura II-14. Electroferogramas de (A) muestra de agua de pozo dopada con 1. AMOX, 3.0 $\mu\text{g/L}$; 2. AMPI, 3.0 $\mu\text{g/L}$; 3. NAFCL, 0.2 $\mu\text{g/L}$; 4. DICLOX, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 5. CLOXA, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 6. OXA, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 7. PENG, 3.0 $\mu\text{g/L}$. y (A1) blanco, obtenidos mediante el método SPE-LVSS-CE, en las condiciones óptimas, PI. PABA, 10 $\mu\text{g/L}$.

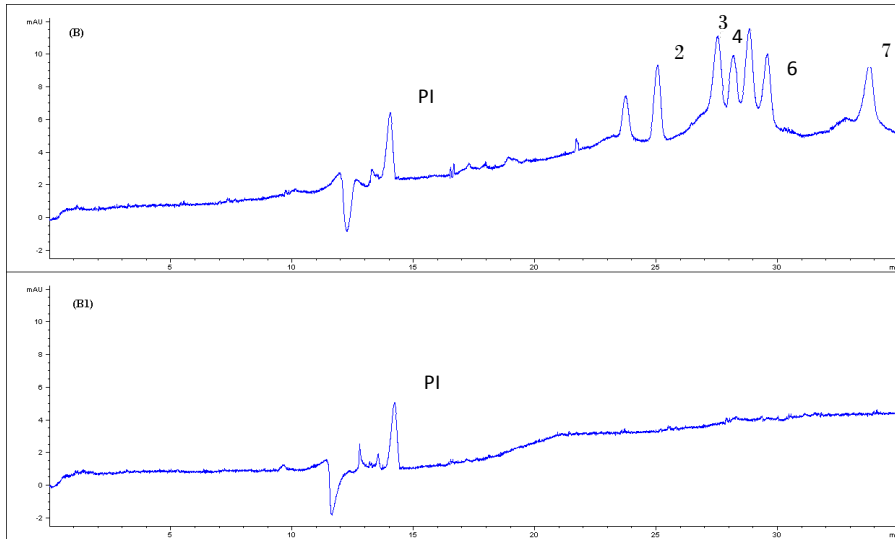


Figura II-15. Electroferogramas de (B) muestras de agua de río dopada con 1.AMOX, 3.0 $\mu\text{g/L}$; 2. AMPI, 3.0 $\mu\text{g/L}$; 3. NAFCl, 0.2 $\mu\text{g/L}$; 4. DICLOX, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 5. CLOXA, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 6. OXA, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 7. PENG, 3.0 $\mu\text{g/L}$ y (B1) blanco. PI. obtenidos mediante el método SPE-LVSS-CE, en las condiciones óptimas, PABA, 10 $\mu\text{g/L}$.

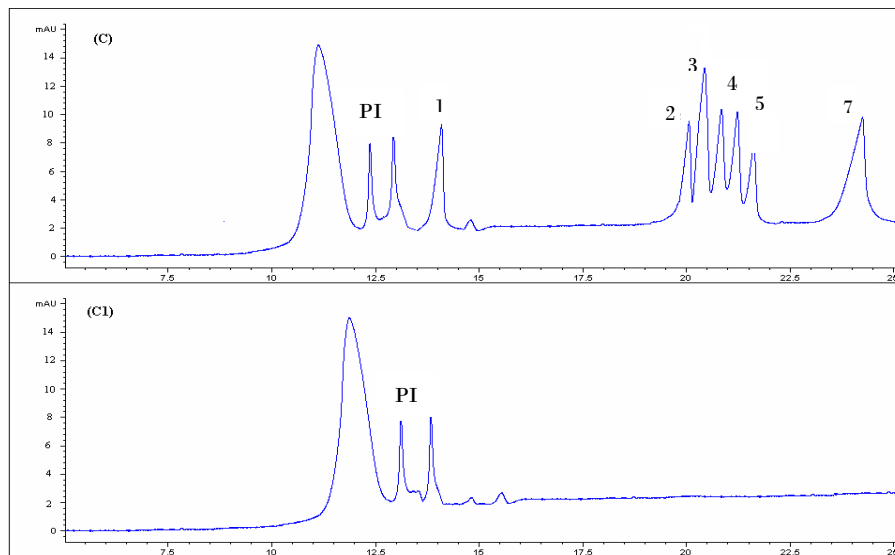


Figura II-16. Electroferogramas de (C) agua de depuradora dopada con 1. AMOX, 3.0 $\mu\text{g/L}$; 2. AMPI, 3.0 $\mu\text{g/L}$; 3. NAFCl, 0.2 $\mu\text{g/L}$; 4. DICLOX, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 5. CLOXA, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 6. OXA, 1.0 $\mu\text{g/L}$; 7.PENG, 3.0 $\mu\text{g/L}$ y (C1) blanco, obtenidos mediante el método SPE-LVSS-CE, en las condiciones óptimas, PI. PABA, 10 $\mu\text{g/L}$.

5.5.2.2. Validación del método para el análisis de muestras de agua

El método analítico se validó en términos de linealidad, LOD, LOQ, repetibilidad, precisión intermedia y veracidad.

5.5.2.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

En primer lugar, se realizó una función de calibrado en presencia de matriz y para caracterizar el método decidimos utilizar agua de pozo. Las curvas de calibrado para los antibióticos β -lactámicos seleccionados, se obtuvieron empleando muestras libres de analitos de agua de pozo, dopándolas antes del tratamiento de muestra. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5 y 3 $\mu\text{g/L}$ para NAFCI; 0.5, 1, 2, 4, 8 y 15 $\mu\text{g/L}$ para DICLOX, CLOXA, OXA y 1.5, 3, 6, 12 y 20 $\mu\text{g/L}$ para AMOX; 1.5, 3, 6, 12, 20 y 40 $\mu\text{g/L}$ para AMPI y PENG. En todos los casos, 10 $\mu\text{g/L}$ de PABA se añadieron como patrón interno (PI) durante la etapa de reconstitución de la muestra. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración. Las curvas de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas corregidas (relación entre el área del pico de analito y el área del pico de PI y el tiempo de migración de ambos). Los parámetros estadísticos, calculados mediante regresión por mínimos cuadrados, y de calidad del método, se muestran en la Tabla II-7.

La Figura II-17 recoge las funciones de calibrado obtenidas para cada uno de los antibióticos β -lactámicos.

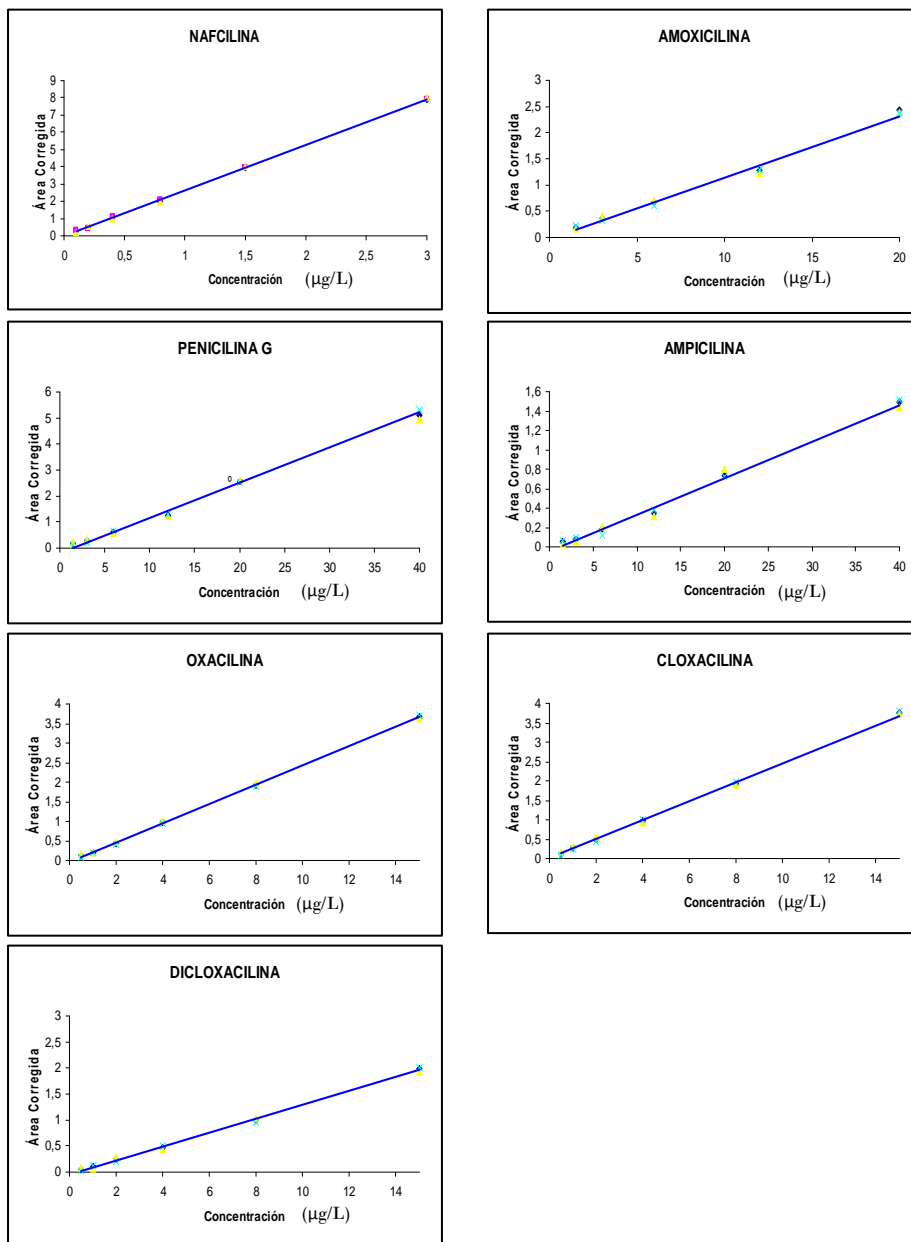


Figura II-17 (cont). Rectas de calibrado de los siete antibióticos β -lactámicos seleccionados, en muestras de agua de pozo.

Tabla II-7. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para muestras de agua de pozo.*

Analito	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD ^(a) ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ^(b) ($\mu\text{g/L}$)
AMPI	0.80-40	0.083	0.434	99.7	0.80	1.6
AMOX	0.80-20	0.628	0.430	99.6	0.80	2.0
DICLOX	0.25-15	0.164	1.607	99.8	0.25	0.7
CLOXA	0.30-15	0.821	2.012	99.6	0.30	0.8
OXA	0.30-15	0.220	1.955	99.9	0.30	0.8
PENG	0.90-40	-0.435	0.591	99.3	0.90	2.0
NAFCI	0.08-3	0.193	13.09	99.9	0.08	0.2

(a) Tres veces la relación señal ruido.

(b) Diez veces la relación señal ruido.

5.5.2.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método se evaluó en términos de precisión intradía e interdía. La repetibilidad se estudió en un solo día por medio de aplicaciones repetitivas del método completo a tres muestras diferentes (réplicas experimentales) fortificadas a 3 niveles de concentración (3, 2 y 1 $\mu\text{g/L}$). La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos, usando una única muestra, con un procedimiento similar al de los estudios de repetibilidad. El resultado se muestra a continuación. Los resultados, expresados como DER de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración, se reflejan en la Tabla II-8.

Tabla II-8. Estudio de la precisión del método propuesto para muestras de agua.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOX	DICLOX
Intradía DER (%) (n=9)							
3.0 µg/L	4.5	7.1	5.1	4.3	6.6	5.4	4.8
2.0 µg/L	5.4	7.9	6.1	3.9	6.7	6.0	5.0
1.0 µg/L	3.3	6.5	6.9	4.6	7.1	6.3	6.2
Tiempo (min)	22.6	19.6	27.5	21.9	24.0	23.7	23.4
DER (%)	1.8	2.3	1.9	2.2	3.1	2.9	1.7
Interdía DER (%) (n=15)							
3.0 µg/L	5.1	6.9	4.3	6.3	7.0	5.8	5.7
2.0 µg/L	6.0	6.9	4.9	7.1	7.3	7.1	4.9
1.0 µg/L	6.3	7.2	5.5	7.4	6.9	7.2	5.8
Tiempo (min)	22.0	18.7	26.3	20.1	24.2	23.6	22.8
DER (%)	4.3	3.8	2.9	3.7	3.5	4.9	4.8

5.5.2.2.3. Estudio de la veracidad

Para estudiar la eficacia del método propuesto, se llevaron a cabo estudios de recuperación a tres niveles de concentración (1, 2 y 3 µg/L) para los tres tipos de muestras de agua seleccionados. Se prepararon tres réplicas a cada nivel de concentración y se inyectaron tres veces. Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando áreas de pico de muestras de agua de depuradora, agua de pozo y río, dopadas antes del tratamiento de muestra, con las áreas de pico de patrones a las mismas concentraciones. Los resultados se muestran en la Tabla II-9.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACION ON-LINE

Tabla II-9. Estudios de recuperación para cada antibiótico β -lactámicos a diferentes concentraciones, en cada uno de los tres tipos de aguas.

			AMOX	AMPI	CLOX	DICLOX	OXA	NAFCI	PEN G
Agua pozo	3.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	97	96	98	99	97	97	99
		DER (%)	7.4	9.2	5.8	3.8	5.2	6.2	5.1
	2.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	95	96	98	97	98	95	98
		DER (%)	6.6	4.6	3.1	2.8	3.6	4.5	4.0
	1.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	94	94	96	97	96	95	96
		DER (%)	5.6	4.5	9.5	3.7	8.1	6.0	6.2
Agua río	3.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	96	97	98	96	97	99	98
		DER(%)	6.6	4.7	4.6	4.4	7.0	5.2	3.9
	2.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	96	95	96	95	96	99	96
		DER(%)	7.1	3.8	5.3	4.7	4.0	3.0	7.8
	1.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	94	95	96	96	96	97	95
		DER(%)	9.1	5.4	7.3	6.3	4.2	6.2	5.9
Agua residual	3.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	95	98	97	97	98	98	97
		DER(%)	4.7	4.2	5.6	5.2	5.5	4.8	5.7
	2.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	94	95	96	98	97	97	95
		DER(%)	5.8	5.2	5.7	4.3	8.3	6.3	7.4
	1.0 ($\mu\text{g/L}$)	R(%)	94	95	97	97	97	95	95
		DER(%)	3.9	4.8	6.3	4.9	7.9	6.0	6.4

(n = 9)

El método SPE-CE-LVSS propuesto para análisis de muestras de agua, mostró una exactitud satisfactoria en términos de veracidad y precisión.

CAPÍTULO III

“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO Y AGUAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM”

1. INTRODUCCIÓN

Con objeto de cumplir con los requisitos establecidos por la Unión Europea en cuanto a métodos de confirmación para el análisis de residuos de antibióticos en alimentos [260], en este capítulo de la presente Memoria se propone un método para la identificación y cuantificación de nueve antibióticos β -lactámicos: amoxicilina (AMOX), ampicilina (AMPI), penicilina G (PENG), penicilina V (PENV), cloxacilina (CLOXA), dicloxacilina (DICLOX), oxacilina (OXA), piperacilina (PIPE) y nafcilina (NAFCI), empleado lomefloxacin (LOME) como patrón interno, en muestras de carne de pollo (músculo) y aguas de río y subterráneas, mediante Electroforesis Capilar con detección por Espectrometría de Masas (CE-MS) y Espectrometría de Masas en tándem (CE-MS/MS).

Para el desarrollo de este método se siguieron las siguientes etapas:

- Optimización de la separación electroforética
- Optimización de los parámetros de CE-MS y CE-MS/MS
- Rectas de calibrado y parámetros de calidad
- Aplicación del método a la determinación de antibióticos β -lactámicos en muestras reales

[260] Commission Decision 2002/657/EEC, *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L 221, 23.

2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL Y MUESTRAS

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico. Acetonitrilo, metanol, hidróxido amónico e hidróxido sódico fueron suministrados por Panreac (Madrid, España). Isopropanol, ácido fórmico, ácido acético y acetato amónico fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania). Los antibióticos β -lactámicos NAFCl, DICLOX, CLOXA, OXA, AMPI, PENG, AMOX, PENV, PIPE y la quinolona LOME, usada como patrón interno, se compraron a Sigma (St. Louis, MO, USA). La tierra de diatomeas se obtuvo de Dionex (California, USA). El agua utilizada (18.2 M Ω /cm) fue desionizada empleando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Los cartuchos de extracción Oasis HLB (60 mg, 3cc) (Waters, Milford, MA, USA) y Alumina N (500 mg, 3 mL, E. Merck, Darmstadt, Germany) preparados en el laboratorio, se emplearon para el tratamiento de muestra.

Se preparó una disolución madre de 1000 mg/L de cada antibiótico β -lactámico y otra de LOME (patrón interno) a la misma concentración, en agua Milli-Q y se guardaron a 4°C en un bote color topacio. Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución con agua.

En cuanto a las muestras seleccionadas para validar el método, la carne de pollo analizada fue adquirida en un supermercado local (Granada, España) y las muestras de agua procedieron del río Fardes (Granada, España) y de un pozo situado en Guadix (Granada, España).

3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo en un instrumento HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) equipado con un detector de diodos en fila (DAD) que operó a 220 nm con un ancho de banda de 16 nm. La separación se llevó a cabo en capilares de sílice fundida con una longitud total de 96 cm y un diámetro interno de 50 μ m (360 μ m de diámetro externo) comprados a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

Se utilizó un nebulizador coaxial de líquido adicional para el acoplamiento CZE-MS (Agilent Technologies). El líquido adicional fue introducido con una bomba de alta presión Jasco PU-2085 (Jasco Analítica, Madrid, España) equipada con un divisor de flujo 1:100. La detección por espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas Agilent 1100 Series LC/MSD SL (Agilent Technologies) equipado con un analizador de trampa de iones.

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España).

En el tratamiento de muestra se empleó una picadora de cocina (Taurus, Barcelona, España) para triturar las muestras de músculo de pollo.

El equipo ASE 100 de Dionex (Sunnyvale, CA, USA) fue empleado para los estudios de tratamiento de muestra mediante extracción líquida presurizada.

Para la extracción en fase sólida (SPE) se usó un dispositivo de vacío VacElut provisto de 20 posiciones de extracción, suministrado por Varian (Palo Alto, CA, USA).

Los electroferogramas con detección UV-visible se realizaron con el programa HP ChemStation versión A.09.01. El espectrómetro de masas estaba controlado mediante el programa Esquire 4.1 de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

Se utilizaron los programas Excel (Microsoft) y StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD) para procesar los datos.

4. PROCEDIMIENTO CE-MS PROPUESTO

4.1. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

Las inyecciones se realizaron en el lado anódico utilizando una presión de 50 mbar durante 80 s (aprox. el 3.4% del total del capilar, 64 nL). La separación electroforética se realizó con un voltaje de 30 kV (modo normal) con una rampa inicial de 0.3 min. Como tampón de separación se utilizó una disolución acuosa 60 mM de acetato amónico ajustada a pH 6.0 con ácido acético 1M. La temperatura del capilar se mantuvo constante a 30 °C. En estas condiciones los valores de corriente del capilar se mantenían por debajo de los 45 μ A, con lo que se evitaba la descarga corona y fallos en las separaciones electroforéticas.

Antes de su primer uso, el capilar se acondicionó con NaOH 1M durante 10 min a 60 °C, lavándose posteriormente con agua durante 5 min, y finalmente con disolución tampón durante 20 min. Se aplicó una presión de 1 bar. Diariamente y antes de empezar a utilizar el equipo, el capilar se acondicionaba durante 3 min con NaOH 0.1M, lavando a continuación con agua durante 3 min y finalmente con tampón electroforético durante 5 min, manteniéndose una presión de N₂ de 7 bares. Antes de cada inyección el capilar se acondicionaba con NaOH 0.1 M a 7 bares durante 1 min, H₂O a 7 bares durante 3 min y acetato amónico 60 mM a pH 6 durante 5 min.

Después de cada inyección, el capilar fue lavado con tampón electroforético durante 1 min a una presión de 7 bares. De esta manera se pretendía evitar la contaminación entre inyecciones consecutivas.

4.2. INTERFASE ESI

Se utilizó el nebulizador coaxial de líquido adicional para el acoplamiento CZE-MS. Desde su primera aplicación [261], la interfase coaxial con flujo adicional es la más utilizada. Esta interfase está formada por tres tubos concéntricos: el capilar de separación, que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que se hace fluir el líquido adicional y un tercer tubo por el cual se introduce el gas nebulizador, normalmente nitrógeno, que posibilita la formación del electrospray. Estos tres tubos concéntricos están situados en la cámara de nebulización, la cual se encuentra a una temperatura generalmente comprendida entre 100 y 350 °C. El flujo adicional, que se hace pasar por el tubo metálico que rodea el capilar, cierra el circuito eléctrico necesario durante la separación por CE, al establecer el contacto eléctrico entre el electrodo situado en el vial de entrada, el capilar y el tubo de acero inoxidable que hace de electrodo de salida. Este tubo metálico sirve además para definir la diferencia de potencial entre la salida del capilar y el electrodo que se encuentra a la entrada del espectrómetro de masas. Con el flujo adicional además se consigue aumentar el flujo necesario para que la interfase ESI funcione de modo adecuado originando un electrospray estable, ya que aumenta el flujo con el que típicamente se trabaja en la separación por CE, obteniéndose flujos del orden de los mL/min.

[261] R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, H.R. Udseth, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948.

El capilar se montó de manera que la punta del mismo sobresalía, aproximadamente, un cuarto del diámetro externo del capilar de la aguja de acero que lo envuelve. El líquido adicional consistía en una mezcla de isopropanol, agua y ácido fórmico (50:47:3 v/v/v) y fue introducido con un flujo de 0.20 mL/h con una bomba de alta presión Jasco PU-2085 (Jasco Analítica, Madrid, España) equipada con un divisor de flujo 1:100. El voltaje ESI se estableció en -4200V. Otros parámetros del electrospray en condiciones óptimas fueron los siguientes: presión de nebulización de 8 psi, flujo de gas de secado de 6 L/min y temperatura del gas de secado de 250 °C. Para evitar la entrada de burbujas de aire durante la inyección de muestra o preacondicionamiento, por el efecto Venturi causado por el nebulizador, fue necesario preacondicionar e inyectar la muestra con la presión del nebulizador y el voltaje ESI a cero, a continuación se esperó 2 minutos después de introducir la muestra para restaurar nuevamente el nebulizador y el voltaje.

4.3. CONDICIONES MS y MS/MS

El espectrómetro de masas operó en modo positivo y escaneó entre 120-550 m/z (masa objetivo 382 m/z, estabilidad del compuesto 100%) a 13000 m/z/s. En los experimentos MS, los parámetros de la trampa se seleccionaron con el modo de control de carga activado utilizando un objetivo de 50.000 y un tiempo de acumulación máximo de 300 ms. Se hicieron 5 medias por experimento. En los experimentos de MS/MS, el tiempo de acumulación máximo se estableció en 50 ms., utilizando 2 medias por experimento para poder obtener 10 espectros por pico.

La fragmentación se realizó por medio de disociaciones inducidas por colisión (CID) con el helio presente en la trampa durante 40 ms. en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

La primera parte del desarrollo de este método se dedica a la optimización de la separación electroforética. Para ello, haremos uso de la espectrofotometría de absorción UV-visible como sistema de detección de los analitos en estudio, seleccionando como longitud de onda de trabajo 220 nm y un ancho de banda de 16 nm. Se empleará un capilar de separación de 96 cm de longitud y 50 μm de d.i. que será el que se utilizará posteriormente, cuando se realice el acoplamiento del equipo de electroforesis al espectrómetro de masas. Para las medidas de absorción, en este capilar se practica una ventana situada a 8.5 cm del extremo del capilar, para monitorizar el espectro UV-Vis. En este estudio se emplea una disolución mezcla de 100 mg/L de cada uno de los analitos, usando agua Milli-Q.

5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA Y pH DEL TAMPÓN DE SEPARACIÓN

La principal premisa a la hora de comenzar la optimización del pH consiste en seleccionar un tampón para llevar a cabo la separación electroforética cuya naturaleza sea compatible con el posterior acoplamiento a la detección por MS. Por lo tanto, únicamente se podrán usar tampones volátiles y que mantengan la corriente por debajo de 50 μA , ya que si no es así se podrían producir oclusiones o descargas en la interfase. Además, valores de corriente bajos reducen el riesgo de ensanchamiento de picos debido al efecto

Joule, cuando el capilar no está adecuadamente termostatizado cerca o dentro del nebulizador [262].

Considerando este hecho se escogieron, como tampones compatibles para realizar este estudio, acetato amónico e hidrógeno carbonato amónico, teniendo en cuenta además que los tampones básicos o neutros son los que permiten una mejor resolución de los antibióticos β -lactámicos.

Para realizar la optimización del pH se estudió el rango comprendido entre 5-10, usando una concentración 50 mM de cada uno de los tampones seleccionados y ajustando el pH con amoníaco 1 M o ácido acético 1M. Para este estudio los demás parámetros de la separación se fijaron en los siguientes valores: Voltaje: 30 kV; temperatura: 30°C e inyección hidrodinámica, aplicando una presión de 50 mbar durante 10 s.

Las Figuras III-1 y III-2 muestran los distintos electroferogramas recogidos para el intervalo de pH ensayado. Con hidrógeno carbonato amónico se estudio el intervalo comprendido entre pH 7 y 10 (Figura III-1) y con acetato amónico el intervalo de pH comprendido entre 5 y 6.5 (Figura III-2). En ambos casos se observó que a partir de 6.5 se comenzaba a perder resolución, solapándose algunos picos.

Según se observa en la Figura III-1, a valores de pH superiores a 7, tanto la sensibilidad como la resolución disminuyen con respecto a los valores ácidos de pH estudiados, aunque el tiempo de análisis es inferior. Entre 6.5 y 6 (Figura III-2) la resolución se mantiene pero la sensibilidad aumenta al disminuir el pH. A continuación se estudió de manera más exhaustiva el rango de pH comprendido entre 6 - 6.5, con incrementos de 0.1 unidades de pH y

[262] J. Ohnesorge, C. Neüsuß, H. Wätzig, *Electrophoresis*, 26 (2005) 3973.

manteniendo constantes todos los demás parámetros. Los resultados obtenidos mostraron que en este rango de pH, la resolución entre los analitos no variaba de forma significativa, pero la sensibilidad aumentaba para el valor más bajo del intervalo, como se puede ver en la Figura III-3, por lo que se estableció como pH óptimo un valor de 6.

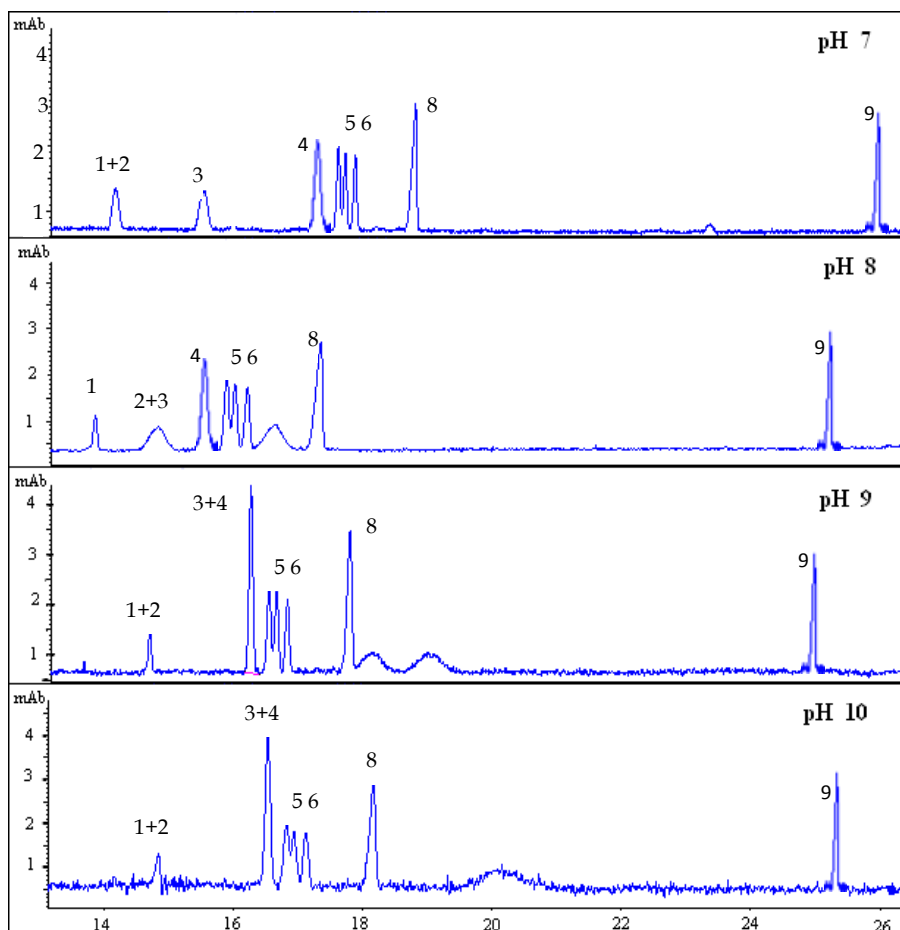


Figura III-1. Electroferogramas obtenidos con hidrogeno carbonato amónico 50 mM como tampón de separación. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCL, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG, 8. PENIV, 9. PIPE.

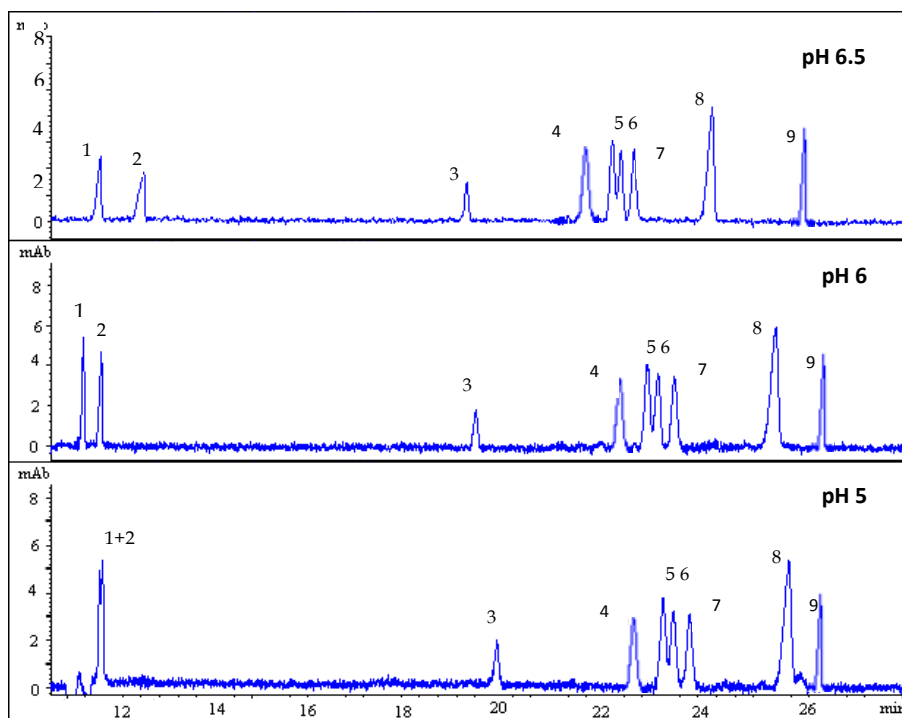


Figura III-2. Electroferogramas obtenidos con acetato amónico 50 mM como tampón de separación. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCI, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG, 8. PENIV, 9. PIPE.

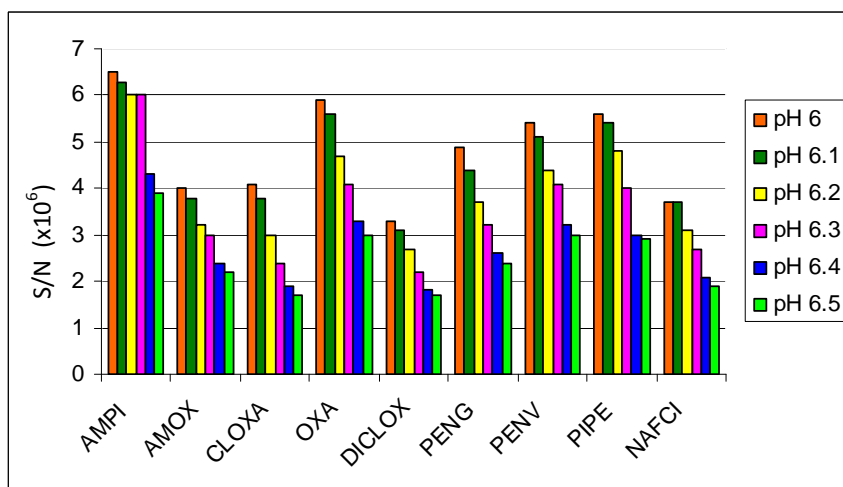


Figura III-3. Representación de la relación señal/ruido obtenida en el rango de pH 6-6.5 para cada uno de los analitos en estudio.

El valor de pH establecido como óptimo así como la restricción de que sólo se pueden emplear tampones volátiles para el acoplamiento CE-MS, nos indujo a seleccionar el acetato amónico para experiencias posteriores, pues produce una separación aceptable de los analitos y la señal obtenida es también adecuada.

5.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN DE SEPARACIÓN

Con este estudio se pretende conseguir la resolución de aquellos analitos que se encuentran peor resueltos: CLOXA, OXA y PENG, además de aumentar la sensibilidad de forma general y concretamente de NAFCI y DICLOX, que presentan señales más pequeñas.

Se impusieron dos limitaciones: (1) que el tiempo de análisis no fuera excesivamente largo; y (2) que la corriente se mantuviera por debajo de 50 μ A. Las concentraciones que se ensayaron fueron 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mM de tampón acetato amónico, ajustando a pH 6 con ácido acético 1 M.

En la Tabla III- 1 se muestran los valores de la intensidad de corriente obtenida con este tampón y la resolución de los picos escogidos así como la variación de áreas y la relación S/N correspondiente a los cuatro analitos que presentaban menor señal. Como se puede observar, la concentración de 60 mM es la que mejores resultados proporciona, tanto en áreas como en la relación S/N y resolución de pico, sin llegar a sobrepasar el límite impuesto de 50 μ A de intensidad de corriente.

Tabla III-1. Optimización de la concentración del tampón de separación.

Concentración (mM)		20	30	40	50	60	70
Intensidad de corriente (µA)		20	24	27	38	42	51
NAFCI	Área pico	21 · 10 ³	25 · 10 ³	27 · 10 ³	30 · 10 ³	34 · 10 ³	29 · 10 ³
	S/N	84	91	94	100	106	107
DICLOX	Área pico	7 · 10 ³	9 · 10 ³	10 · 10 ³	12 · 10 ³	15 · 10 ³	14 · 10 ³
	S/N	111	115	118	122	126	125
OXA	Área pico	19 · 10 ³	26 · 10 ³	33 · 10 ³	37 · 10 ³	43 · 10 ³	39 · 10 ³
	S/N	105	110	114	118	121	120
CLOXA	Área pico	9 · 10 ³	14 · 10 ³	18 · 10 ³	20 · 10 ³	22 · 10 ³	21 · 10 ³
	S/N	71	79	82	90	96	97
Resolución CLOXA Y DICLOX		1.78	1.87	1.99	2.01	2.30	2.44

5.1.3. OPTIMIZACIÓN DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN Y TEMPERATURA DEL CAPILAR

En esta etapa de optimización de la separación, se comenzó modificando el voltaje entre 15 y 30 kV, a intervalos de 5 kV. Se encontró que el valor que mejores resultados proporcionaba era el de 30 kV, ya que con este valor se obtenía una buena resolución y el tiempo de análisis mejoraba con respecto a valores más bajos. La Figura III-4, muestra los electroferogramas obtenidos a distintos voltajes.

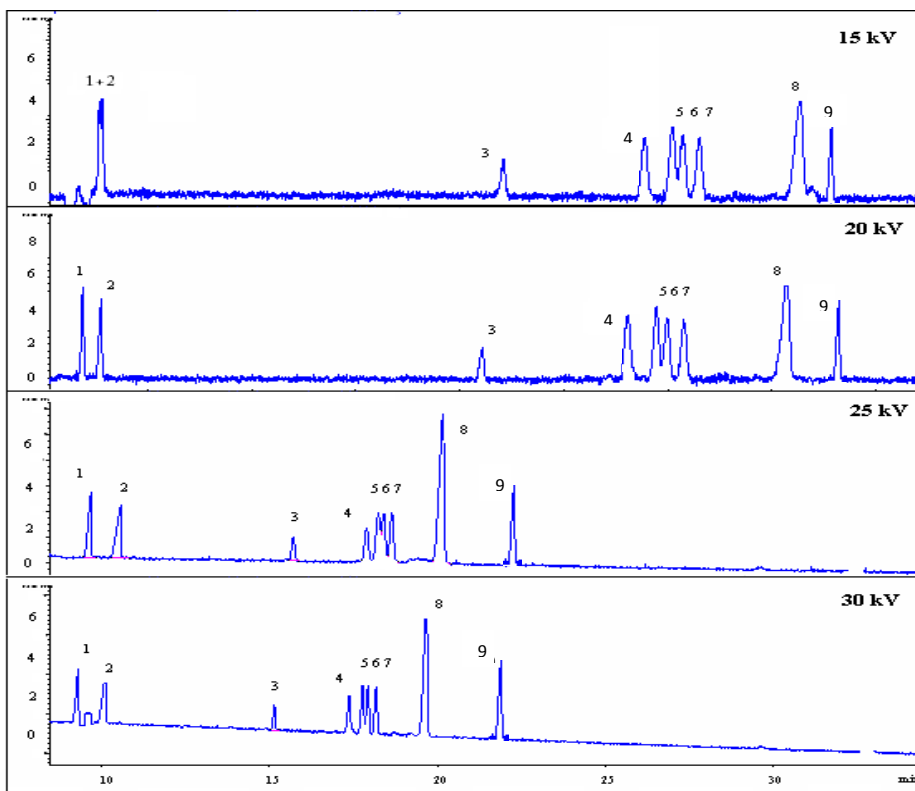


Figura III-4. Optimización del voltaje de separación. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCL, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG, 8. PENIV, 9. PIPE.

El estudio de la temperatura del capilar se realizó entre 20-30°C, con un intervalo de medida de 5°C. Se observó que la variación de temperatura, dentro de este intervalo, no influía de forma significativa en la sensibilidad ni en la resolución de los picos, por lo que se seleccionó una temperatura de 30°C, próxima a la temperatura ambiente, para experiencias posteriores. Se descartaron valores superiores, ya que los compuestos estudiados pueden degradarse por acción de la temperatura.

A continuación, en la Tabla III-2 se muestran los valores óptimos establecidos para la separación electroforética de los antibióticos en estudio.

Tabla III-2. *Valores óptimos para la separación electroforética*

Tampón electroforético	Acetato amónico
Concentración tampón	60 mM
pH	6
Voltaje	30 kV
Temperatura	30°C
Características del capilar	96 cm de longitud y 50 µm de d.i.

5.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE CE-MS y CE-MS/MS

Una vez optimizada la separación de los analitos propuestos para el análisis, se procedió a la optimización de los parámetros concernientes al acoplamiento CE-MS, utilizando la ionización por electrospray (ESI). Para llevar a cabo este estudio se ha empleado una disolución con una concentración de 100 mg/L de cada uno de los analitos disueltos en agua Milli-Q y se usa una concentración de 100 mg/L de LOME como PI.

5.2.1. ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN AL ELECTROSPRAY

5.2.1.1. Elección del modo de ionización por electrospray (ESI+, ESI-)

En primer lugar se ensayaron diferentes disolventes para los analitos con el fin de seleccionar el modo de polaridad más adecuado para el espectrómetro de masas. Para poder usar el modo de polaridad positiva (ESI+) es necesario que los analitos estén disueltos en disoluciones ácidas. Generalmente las que mejores resultados producen son aquellas que contienen ácidos débiles como fórmico, acético o propiónico, ya que los ácidos fuertes, como el ácido

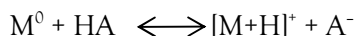
trifluoroacético (TFA) o el ácido clorhídrico, no son adecuados debido a la formación de pares iónicos con los analitos catiónicos, reduciendo la concentración de ión analito. Para el modo de polaridad negativa (ESI-), las disoluciones que mejores resultados producen son las sales de amonio y otras bases volátiles. A partir de estas consideraciones se procedió a la selección del modo en el que se producían mejores resultados.

Para probar el modo ESI+, se usó una composición del líquido adicional consistente en ácido fórmico:isopropanol : H₂O (1: 50: 49) (v:v:v). Para el modo ESI-, la composición del líquido adicional fue NH₃:isopropanol:H₂O (1:50:49) (v:v:v). Las condiciones para la separación electroforética fueron las ya optimizadas, descritas anteriormente. Los parámetros iniciales usados en MS fueron:

- Caudal del líquido adicional: 5 μ L/min
- Presión del nebulizador: 5psi
- Caudal del gas de secado: 6 L/min
- Temperatura del gas de secado: 150 °C
- Media de las masas a determinar: 382 m/z
- Objetivo: 50.000
- Tiempo de acumulación de la trampa: 300 ms
- Promedio: 5
- Intervalo de masas a medir: 120 - 550 m/z
- ICC: activado

Finalmente seleccionamos el modo de polaridad positiva (ESI+), ya que era el modo en el que conseguíamos obtener señal correspondiente a nuestros analitos, puesto que en polaridad negativa (ESI-), no conseguíamos ver ningún compuesto. Esto es debido a que los antibióticos β -lactámicos, poseen un

grupo con carácter básico, esto le permite aceptar un protón en un medio más ácido:



Debido a esta característica, es posible determinar los antibióticos β -lactámicos en CE-MS con polaridad positiva (ESI+) y no en polaridad negativa (ESI-).

5.2.1.2. Composición del líquido adicional

El líquido adicional es uno de los parámetros más influyentes en el acoplamiento CE-MS, siendo sus principales funciones:

- Aumentar el flujo del capilar de CE que es del orden de los nL/min. Se facilita de esta forma el acoplamiento CE-MS pues la interfase ESI requiere flujos del orden de los mL/min. Se obtiene además un electrospray estable.
- Cerrar el circuito eléctrico con el interior del capilar.
- Facilitar la ionización de las moléculas de los analitos.

5.2.1.2.1. *Selección de los constituyentes del líquido adicional*

Una vez seleccionado el modo de trabajo en polaridad positiva, se seleccionó la naturaleza del ácido y el disolvente orgánico que componían el líquido adicional, tomando como criterio de selección la relación señal/ruido (S/N). Para este estudio se emplearon dos ácidos: ácido fórmico y ácido acético, manteniendo las proporciones del líquido adicional mencionadas anteriormente (ácido:isopropanol:H₂O (1:50:49)). Los electroferogramas recogidos en la Figura III-5 mostraban que el ácido fórmico proporcionó mejores resultados, puesto que empleando ácido acético, dos de los analitos en estudio no se detectaban, concretamente AMPI y NAFCl.

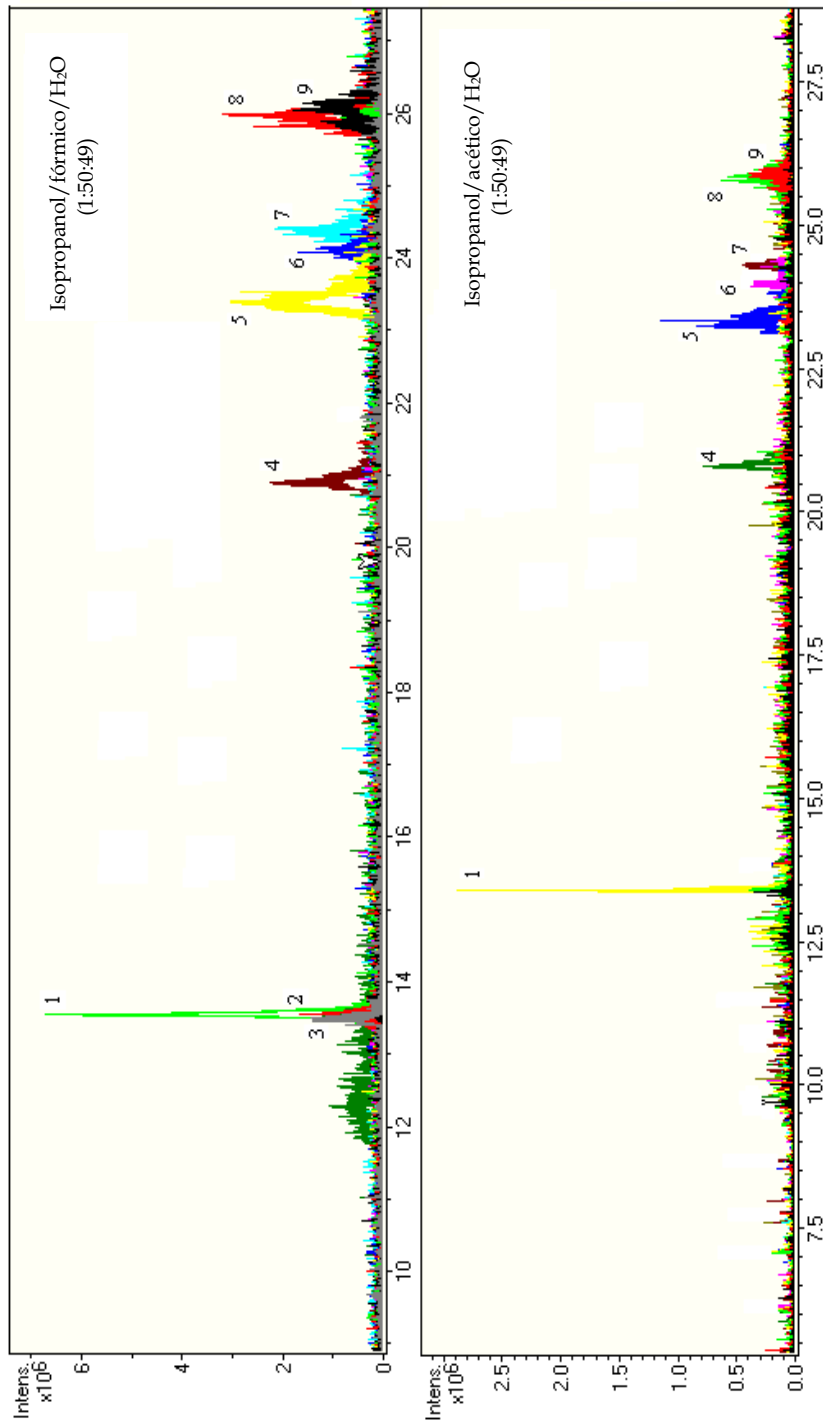


Figura III-5. Electroferogramas usando isopropanol/formico e isopropanol/acético como líquido adicional. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCI, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG, 8. PENIV, 9. PIPE.

Tras escoger el ácido fórmico, para el estudio del disolvente orgánico en el líquido adicional se probaron los siguientes: isopropanol, metanol y acetonitrilo, todos ellos diluidos a un 50% con agua.

Las Figura III-6 muestra la influencia en la relación S/N obtenida, para cada uno de los analitos y para el patrón interno, de los distintos ácidos y disolventes orgánicos ensayados en el líquido adicional.

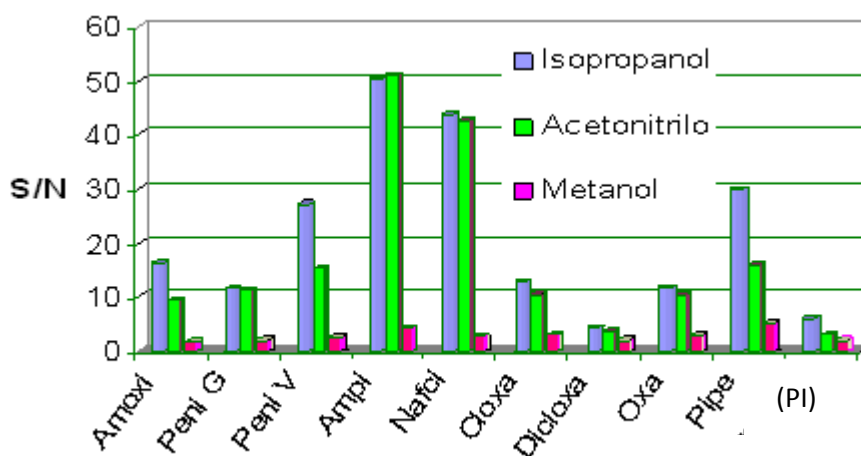


Figura III-6. Influencia del disolvente orgánico del líquido adicional sobre la relación S/N

Los resultados mostrados en la Fig III-6 confirman que el isopropanol es el que presenta mejores resultados ya que muestra una mayor eficiencia en la ionización y una cantidad de impurezas inferior.

5.2.1.2.2. Optimización del porcentaje de ácido fórmico

En primer lugar se estudió la influencia del porcentaje de ácido fórmico respecto a la relación S/N. Para llevar a cabo el estudio, se tomó un porcentaje

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM

fijo de isopropanol (50 %), y se fue variando el porcentaje de ácido fórmico en un intervalo comprendido entre (0.5 % y 5 %), con incrementos de 0.5 %.

En la Figura III-7 se muestra la influencia, sobre la relación S/N, del porcentaje de ácido fórmico para cada analito en estudio, así como para el patrón interno.

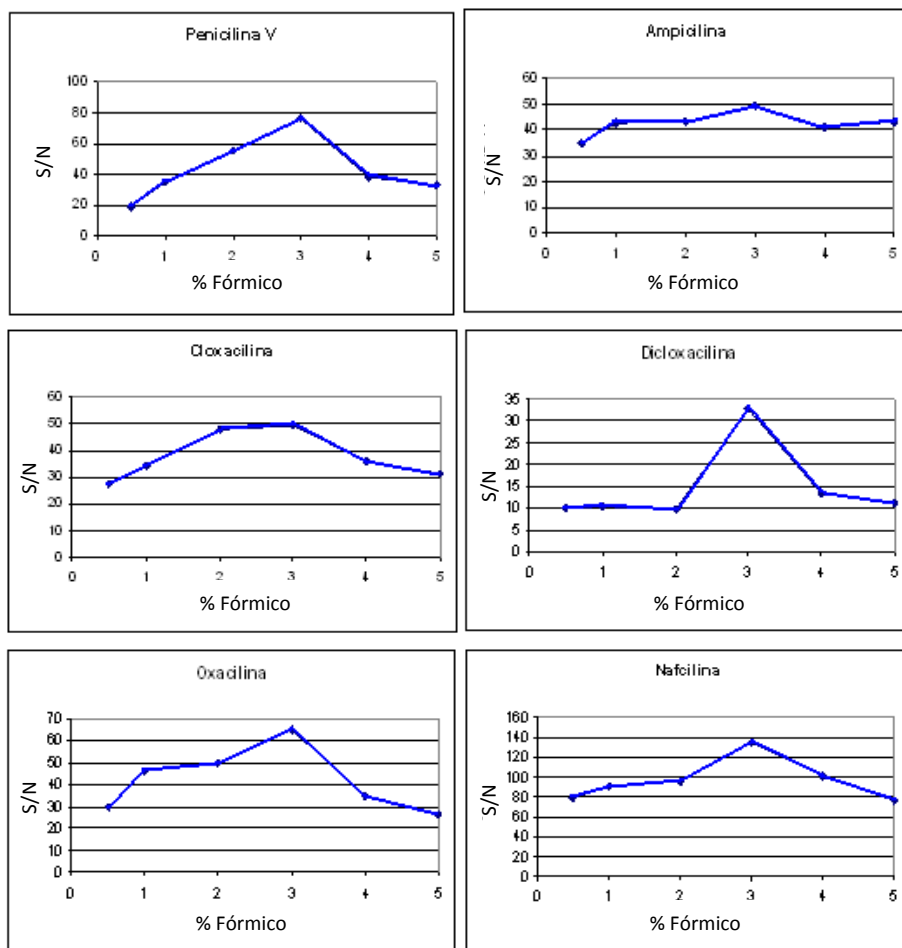


Figura III-7. Influencia del porcentaje de ácido fórmico sobre la relación S/N.

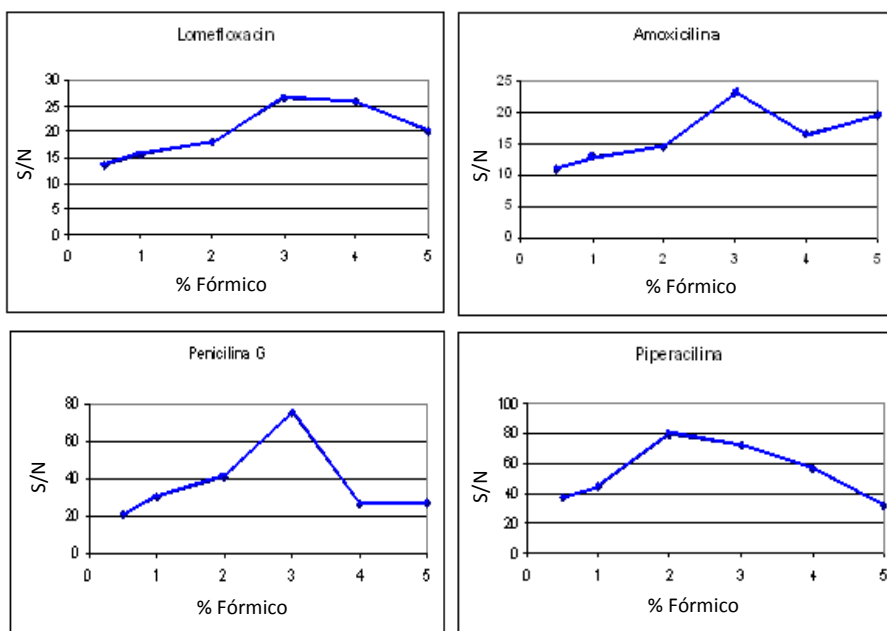


Figura III-7 (Cont.). Influencia del porcentaje de ácido fórmico sobre la relación S/N.

Se observa que, para la mayoría de los analitos en estudio, el porcentaje de ácido fórmico que proporciona mejores resultados es del 3%. Sin embargo, para corroborar el resultado, se obtuvieron los datos globales sumando la relación S/N para todos los analitos en estudio, obteniendo los resultados de la Figura III-8.

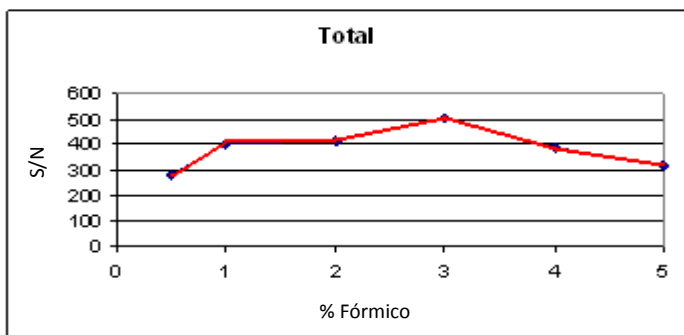


Figura III-8. Resultados globales correspondientes al porcentaje de ácido fórmico

Una vez comparadas las gráficas de la Figura III-7 correspondientes a los distintos analitos, así como el resultado global obtenido para la relación S/N, considerando todos los analitos, se establece un valor del 3% de ácido fórmico como valor de compromiso óptimo para estudios posteriores.

5.2.1.2.3. *Optimización del porcentaje de isopropanol*

A continuación se optimizó el porcentaje de disolvente orgánico para el líquido adicional. Para ello se fijó el porcentaje de ácido fórmico en 3 % y se varió el porcentaje de isopropanol en un rango comprendido entre 10 y 90 %, con incrementos del 10 % (Figura III-9).

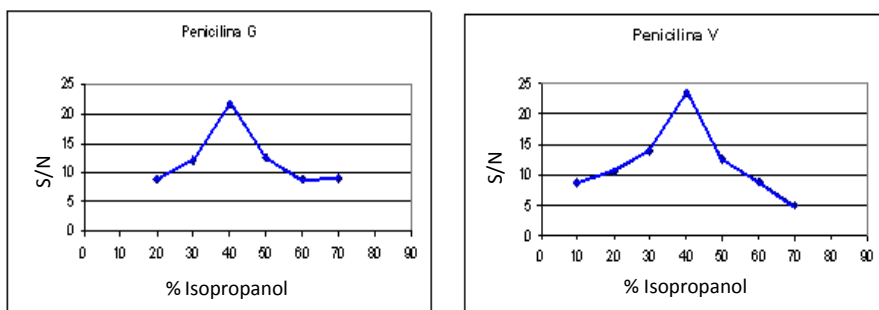


Figura III-9. Influencia del porcentaje de isopropanol sobre la relación S/N

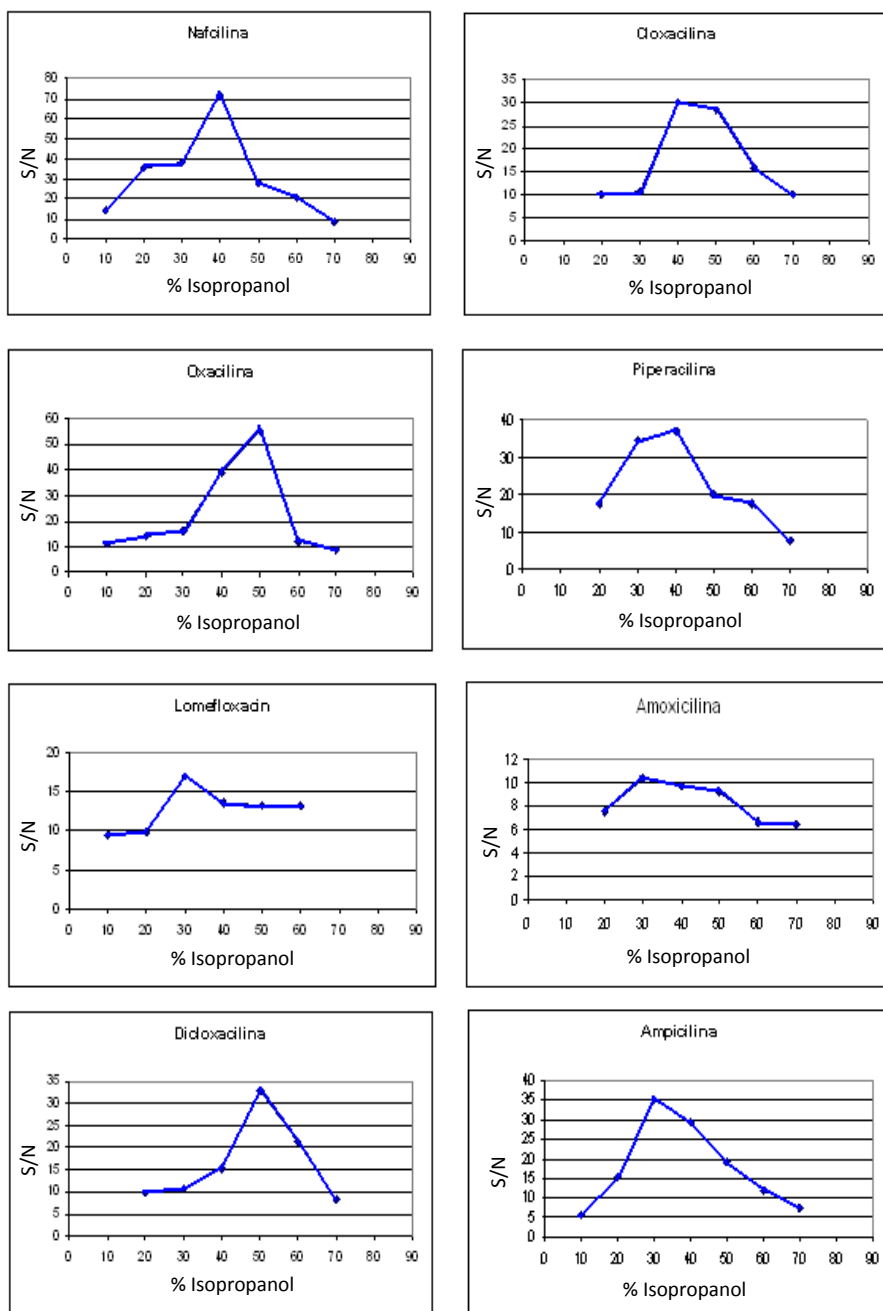


Figura III-9. Influencia del porcentaje de isopropanol sobre la relación S/N

Según se observa en las correspondientes figuras, no se han representado valores superiores al 70 % de contenido en isopropanol del líquido adicional ya que se generaban corrientes muy inestables, al no cerrarse bien el circuito eléctrico. En la mayoría de los casos los óptimos están comprendidos entre el 30-50 %.

A continuación, en la Figura III-10, se recogen los resultados globales obtenidos al sumar la relación S/N para todos los analitos en estudio, a los distintos porcentajes de isopropanol ensayado.

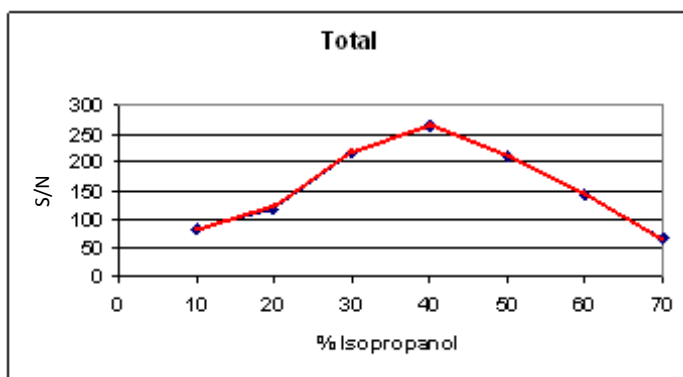


Figura III-10. Resultados globales correspondientes al estudio del porcentaje de isopropanol

Finalmente se seleccionó un valor de compromiso para todos los compuestos en estudio del 40% de isopropanol.

La composición establecida, por tanto, para el líquido adicional fue: ácido fórmico, isopropanol y agua (3:40:57 v/v/v).

5.2.1.3. Optimización del caudal del líquido adicional

El siguiente paso en el estudio fue la optimización del caudal del líquido adicional. El intervalo de trabajo estudiado estuvo comprendido entre 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, con incrementos de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figura III-11).

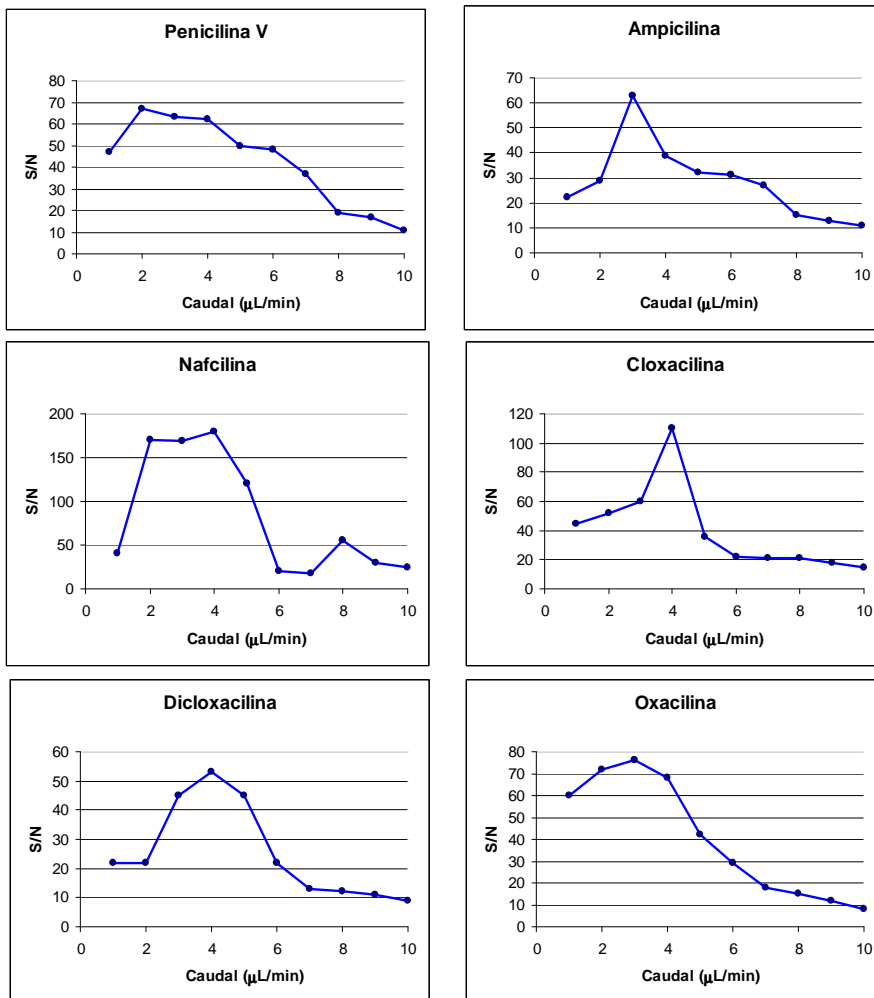


Figura III-11. Influencia del caudal del líquido adicional sobre la relación S/N

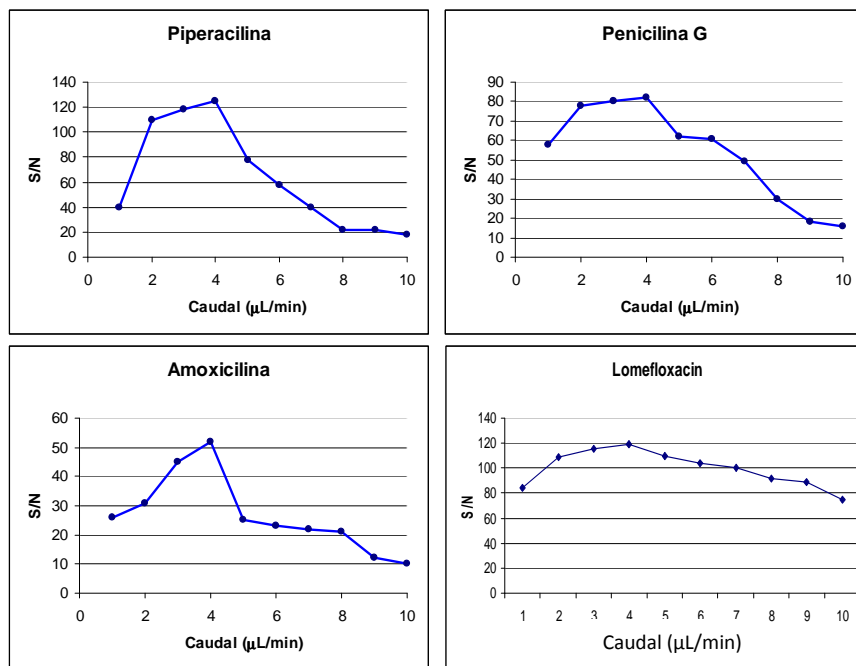


Figura III-11(Cont.). Influencia del caudal del líquido adicional sobre la relación S/N

Una vez comparadas las gráficas recogidas en la Figura III-11, observamos que los mejores resultados corresponden a valores del caudal del líquido adicional comprendidos entre 3 y 4 $\mu\text{L}/\text{min}$

A continuación, en la Figura III-12, se recogen los resultados globales obtenidos al sumar la relación S/N para todos los analitos en estudio a los distintos caudales para el líquido adicional.

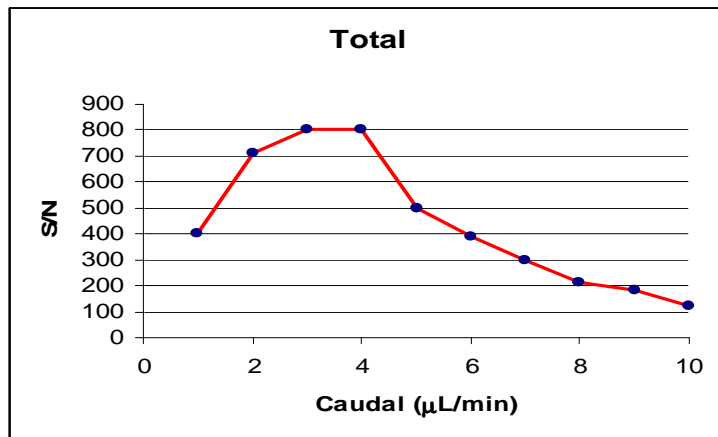


Figura III-12. Resultados globales correspondientes al caudal del líquido adicional

A partir de este estudio decidimos seleccionar 3.5 µL/min, ya que es el punto intermedio del intervalo óptimo obtenido.

5.2.1.4. Optimización de la presión del nebulizador

Una vez optimizadas las variables que afectan al líquido adicional, se procedió a optimizar el resto de variables que afectan al electro spray. Se comenzó con la presión del nebulizador, escogiendo un intervalo de trabajo comprendido entre 2 y 20 psi, con incrementos de 2 psi.

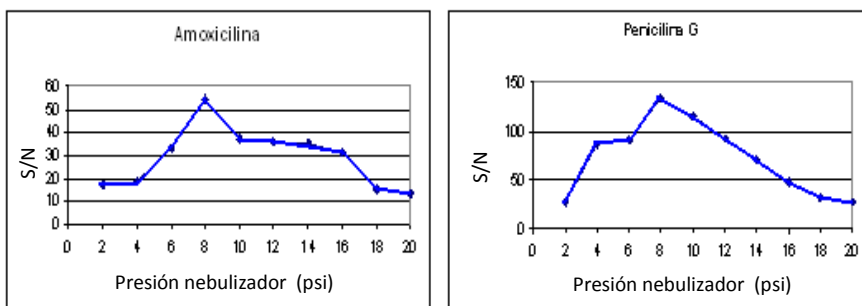


Figura III-13. Influencia de la presión del nebulizador sobre la relación S/N.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM

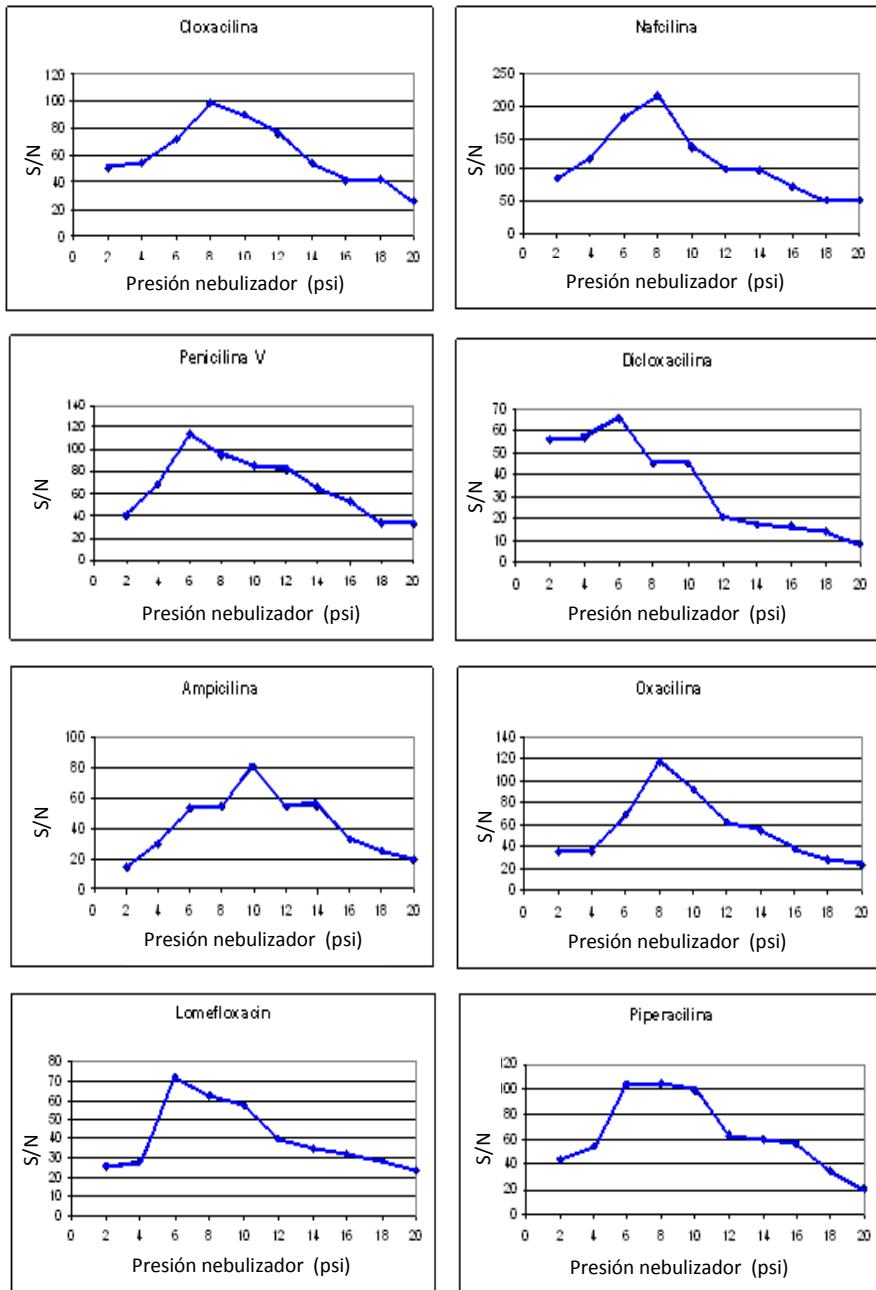


Figura III-13 (Cont.). Influencia de la presión del nebulizador sobre la relación S/N.

Una vez comparadas las gráficas recogidas en la Figura III-13, vemos que los mejores resultados nos aparecen a una presión del nebulizador comprendida entre 6 y 10 psi, siendo 8 psi el valor óptimo para la mayoría de los analitos (AMOXI, PENG, NAFCI, CLOXA, OXA y PIPE), mientras que a una presión de 6 psi obtenemos mejores resultados para dos de los analitos estudiados PENV, DICLOX y el patrón interno LOME. Finalmente, encontramos que para AMPI la presión del nebulizador más adecuada es de 10 psi.

En la Figura III-14, se recogen los resultados globales obtenidos al sumar la relación S/N para todos los analitos en estudio correspondientes a la presión del nebulizador.

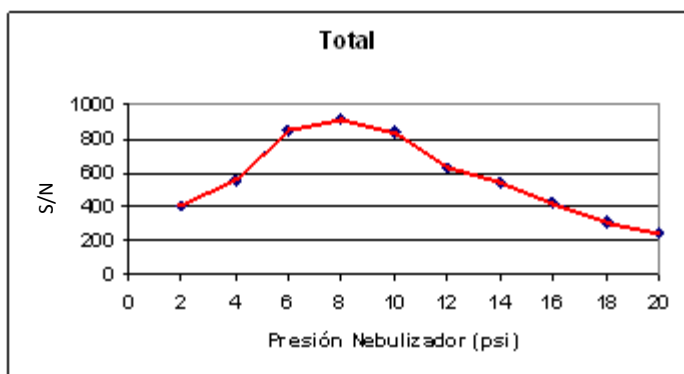


Figura III-14. Resultados globales correspondientes a la presión del nebulizador

De este estudio se decide seleccionar un valor de compromiso de 8 psi como presión óptima del nebulizador en la que se produce un spray más estable y una relación S/N óptima para la mayoría de analitos.

5.2.1.5. Optimización del caudal del gas de secado

El siguiente factor a considerar en el estudio es el caudal del gas de secado. Para llevar a cabo esta optimización se estudió un intervalo

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM

comprendido entre 2 y 10 L/min, con incrementos de 2 L/min, fijándose el resto de variables en los óptimos obtenidos hasta ahora.

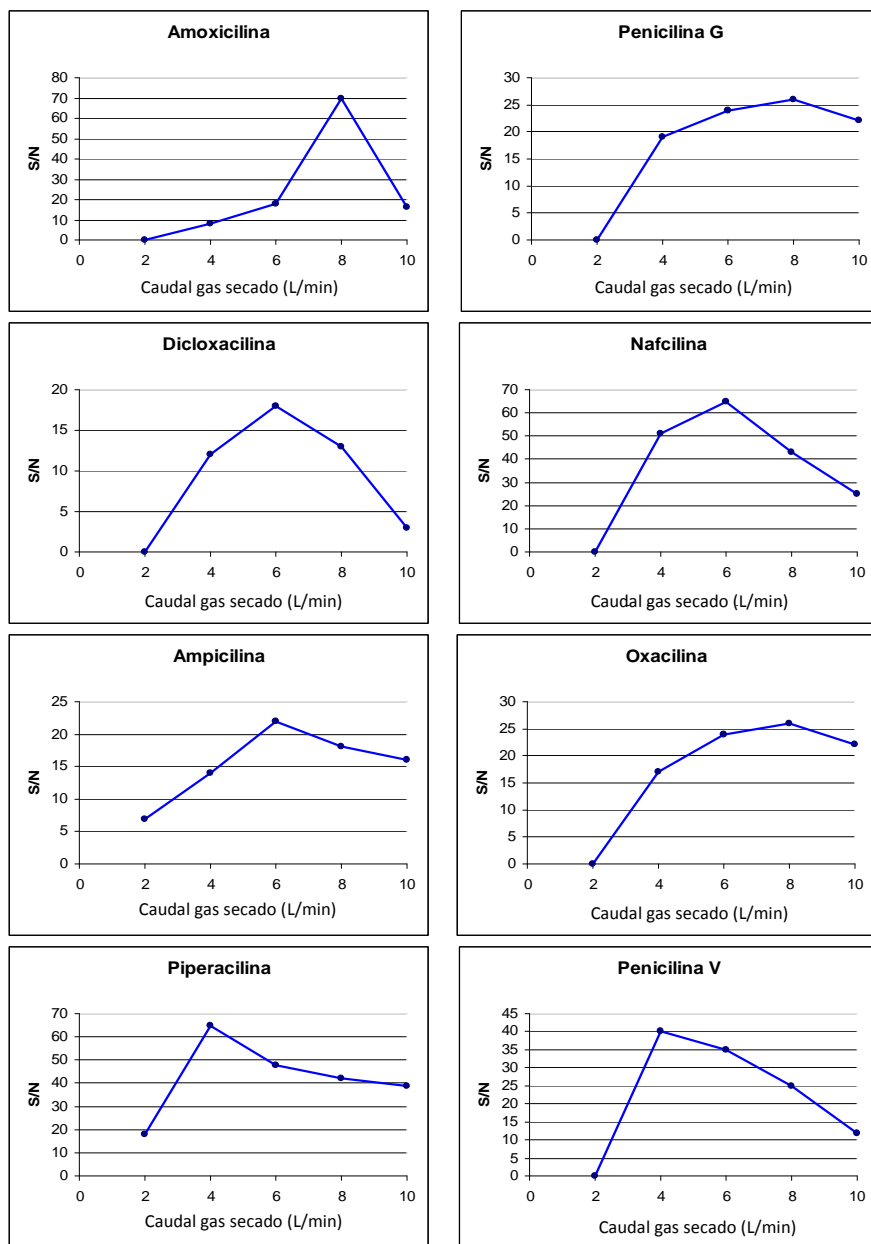


Figura III-15. Influencia del caudal del gas de secado sobre la relación S/N.

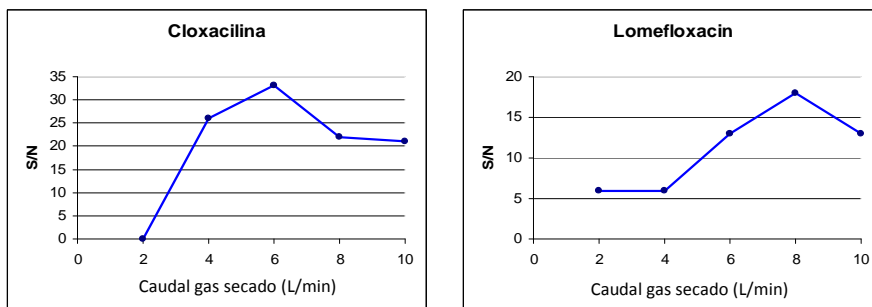


Figura III-15 (Cont.). *Influencia del caudal del gas de secado sobre la relación S/N.*

Una vez comparadas las gráficas (Figura III-15), observamos que se obtienen las mayores relaciones S/N para un caudal del gas de secado comprendido entre 6 y 8 L/min, siendo 8 L/min el valor óptimo para AMOX, PENG, OXA y LOME (P.I.), mientras que a un caudal de 6 L/min obtenemos mejores resultados para AMPI, NAFCl, CLOXA y DICLOX. Para PIPE y PENV el caudal óptimo fue de 4 L/min.

A continuación, en la Figura III-16, se recogen los resultados globales obtenidos al sumar la relación S/N para todos los analitos en estudio a los distintos caudales de gas de secado.

Decidimos seleccionar finalmente 6 L/min como caudal de gas de secado ya que es un valor medio entre los 4 L/min óptimos para PIPE y PENIV y los 8 L/min óptimos para AMOX, PENG, OXA y LOME, además de ser el caudal óptimo de gas de secado para la mitad de los analitos.

En estas dos últimas variables estudiadas puede observarse que los valores óptimos no corresponden con valores altos en el intervalo estudiado ya que si la presión del nebulizador y el caudal del gas de secado son demasiado altos se

puede secar la punta del capilar, especialmente al usar altos porcentajes de isopropanol, de modo que se imposibilita el cierre del circuito eléctrico.

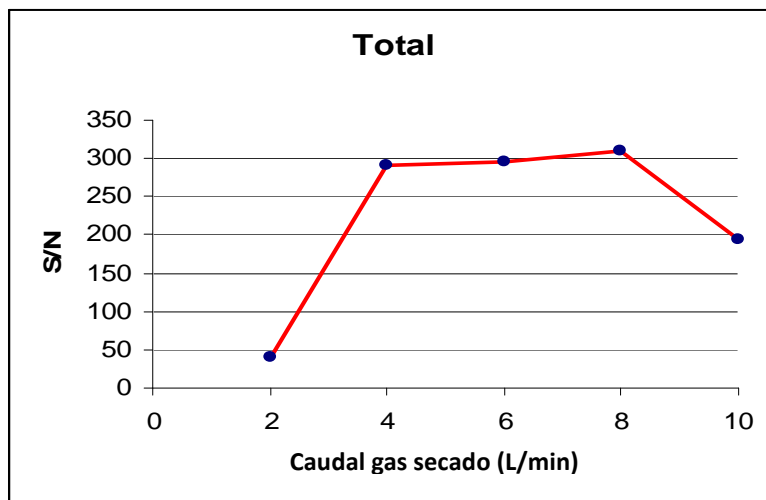


Figura III-16. Resultados globales correspondientes al caudal del gas de secado.

5.2.1.7. Optimización de la temperatura del gas de secado

Finalmente optimizamos la temperatura para el gas de secado en un intervalo comprendido entre 150 y 300°C, con incrementos de 50°C.

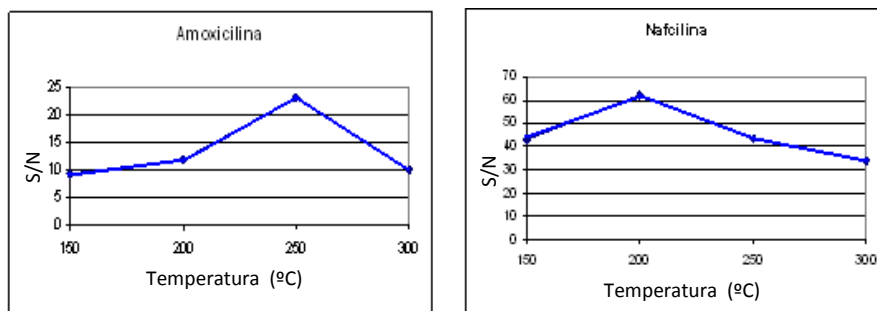


Figura III-17. Influencia de la temperatura del gas de secado sobre la relación S/N.

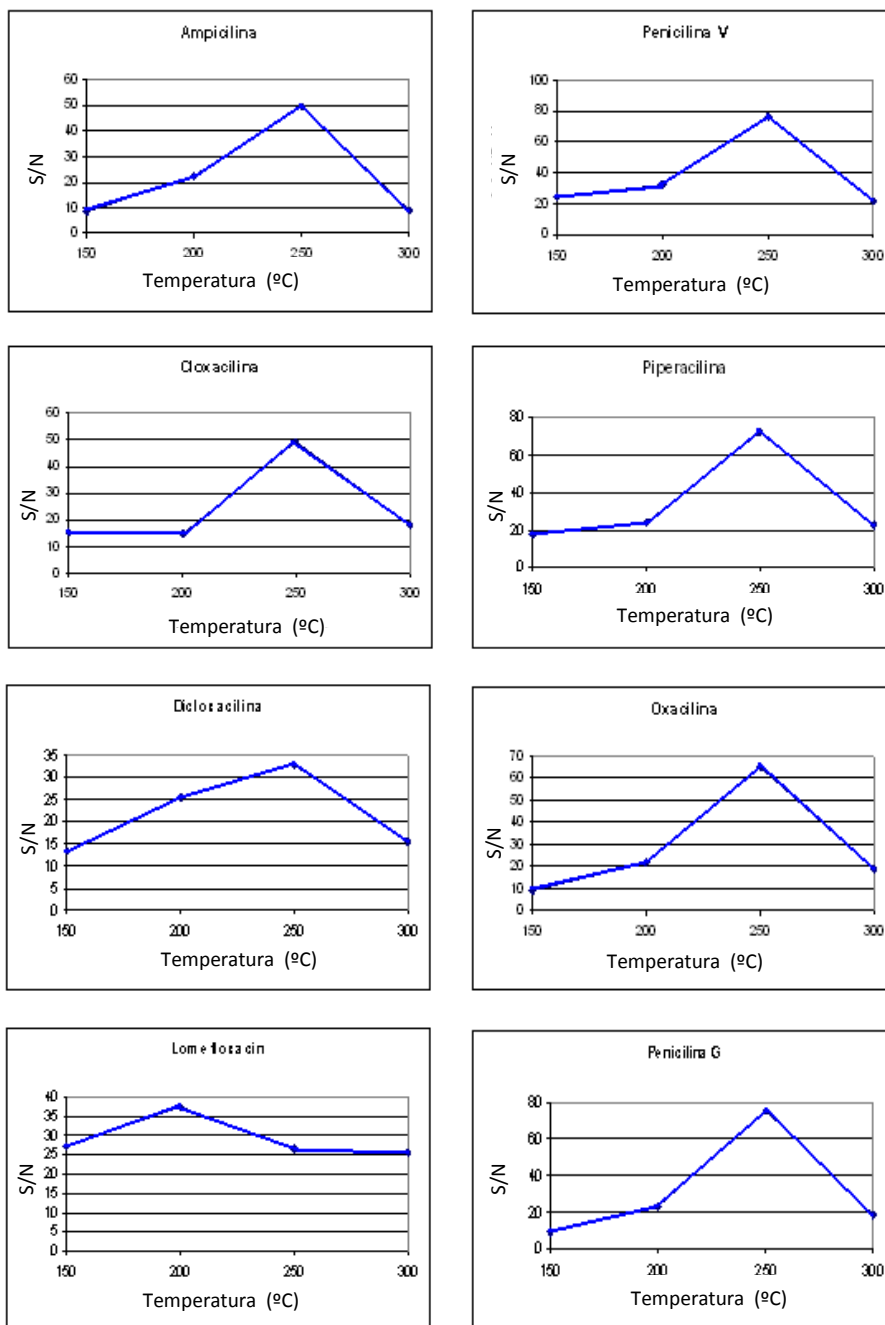


Figura III-17 (Cont.). Influencia de la temperatura del gas de secado sobre la relación S/N.

A la vista de los resultados (Figura III-17), vemos que la temperatura óptima para el gas de secado en el caso de 8 de los 10 analitos en estudio (AMOX, PENG, PENV, AMPI, CLOXA, DICLOX, OXA y PIPE) es de 250 °C, mientras que para NAFCI y LOME el valor máximo para la relación S/N se presenta a 200 °C.

A continuación, en la Figura III-18, se recogen los resultados globales obtenidos al sumar la relación S/N para todos los analitos en estudio a los distintos valores de temperatura ensayados.

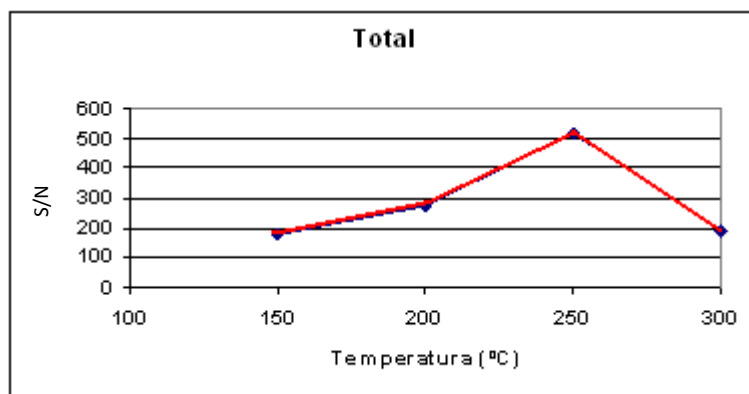


Figura III-18. Resultados globales correspondientes a la temperatura del gas de secado.

Finalmente se concluye que el valor más favorable para la temperatura del gas de secado es de 250°C, consiguiéndose una desolvatación completa para todos los analitos en estudio.

A continuación se recogen en la Figura III-19 y Tabla III-3 los óptimos encontrados para cada una de las variables estudiadas y cada uno de los analitos considerados. En la Tabla III-3 igualmente se muestran los valores de compromiso seleccionados para cada variable.

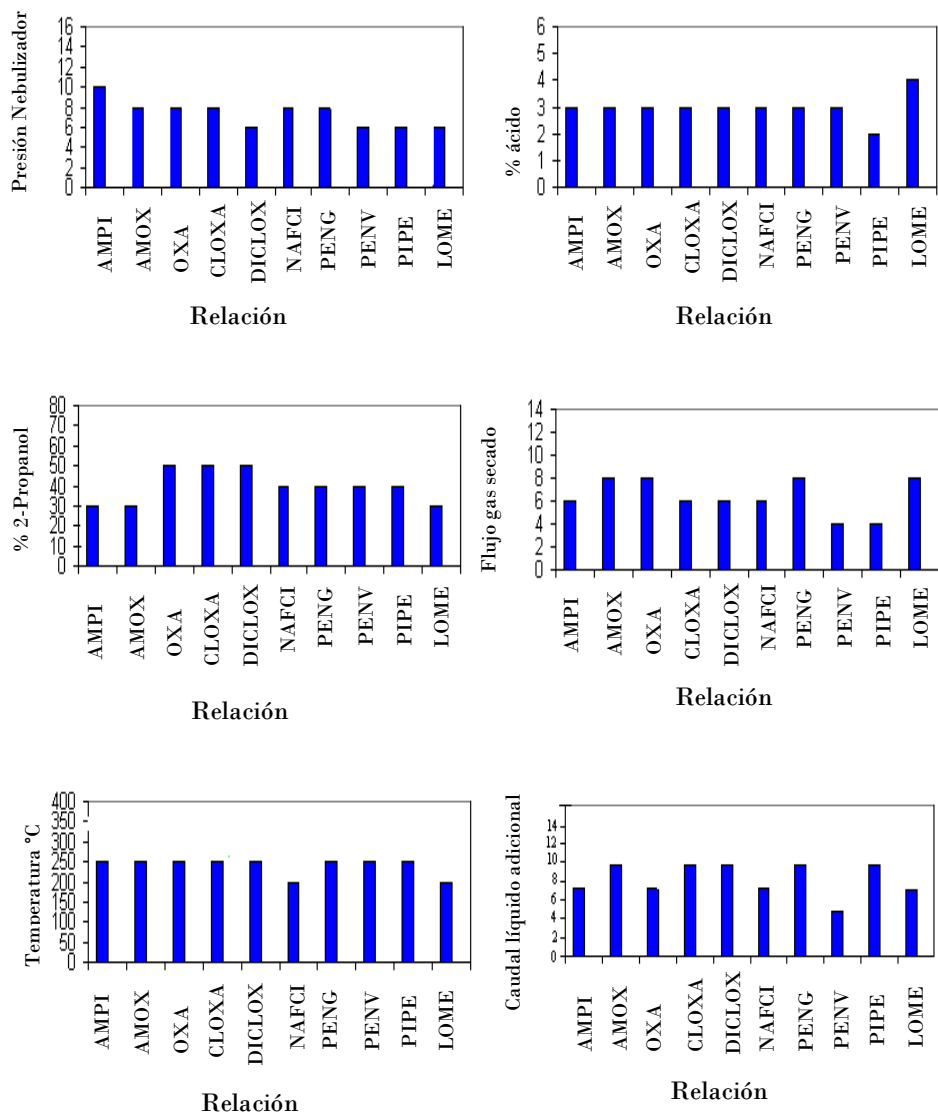


Figura III-19. Resultados obtenidos en la optimización de variables significativas relacionadas con el electrospray. Los valores representados corresponden a la máxima relación S/N para cada uno de los antibióticos β -lactámicos.

Tabla III-3. Valores óptimos encontrados para cada uno de los analitos en estudio.

	Ácido Fórmico (%)	2-Propanol (%)	Caudal líquido adicional ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Presión Nebulizador (psi)	Caudal gas secado (L/min)	T ^a (°C)
AMPI	3	30	3	10	6	250
AMOX	3	30	4	8	8	250
OXA	3	50	3	8	8	250
CLOXA	3	50	4	8	6	250
DICLOX	3	50	4	6	6	250
NAFCI	3	40	4	8	6	200
PENG	3	40	4	8	8	250
PENV	3	40	2	6	4	250
PIPE	2	40	4	6	4	250
LOME (PI)	4	30	3	6	8	200
Valor seleccionado	3	40	3.5	8	8	250

5.2.2. VOLTAJE DEL CAPILAR DE ENTRADA

El siguiente parámetro que se optimizó fue el voltaje del capilar de entrada al espectrómetro de masas, empleando infusión por voltaje. Para ello el capilar se llena por completo con una mezcla de los analitos en estudio, de concentración 20 mg/L, disueltos en el tampón electroforético y se aplica el voltaje de separación. De esta forma se realizaba un aporte constante de muestra al detector en unas condiciones parecidas a las de una medida “real”. Así, se varió el voltaje de forma aleatoria en el intervalo comprendido entre 3100 V y 4600V, a intervalos de 5 minutos, durante los cuales se monitorizó la señal m/z. Las variaciones que se produjeron fueron las siguientes:

0 - 5 min = 3100 V

5 - 10 min = 4400 V

10 - 15 min = 3500 V

15 - 20 min = 4200 V

- 20 - 25 min = 4000 V
- 25 - 30 min = 3300 V
- 30 - 35 min = 4600 V
- 35 - 40 min = 3700 V
- 40 - 45 min = 4200 V
- 45 - 50 min = 4600 V

El voltaje que mejores señales proporcionaba y que daba lugar a señales más estables era el de 4200 V. Para comprobar la influencia de este parámetro sobre la relación S/N de cada analito se representó gráficamente la relación señal ruido frente a cada voltaje. Como podemos ver en la Figura III-20 la relación señal ruido para todos los analitos es mayor a 4200 V respecto a otros voltajes.

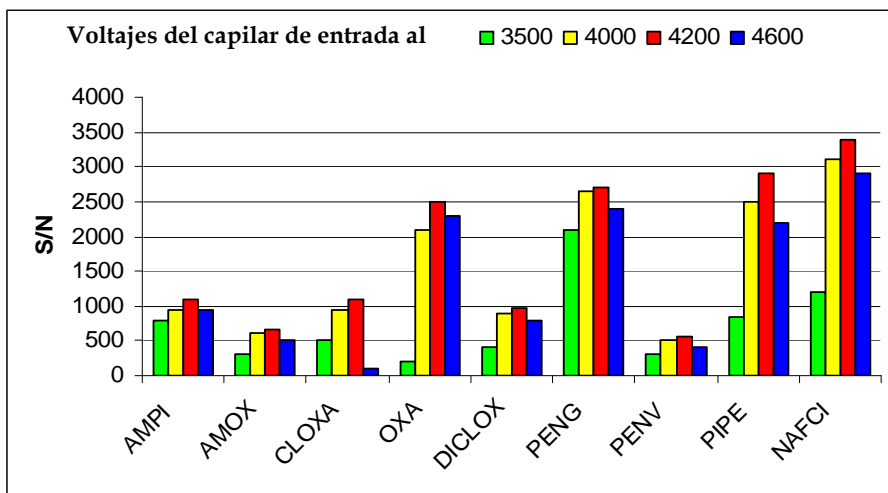


Figura III-20. Influencia del voltaje del capilar de entrada al espectrómetro de masas sobre la relación S/N.

5.2.3. AMPLITUD DE LA FRAGMENTACIÓN

Hasta ahora, los parámetros que se han optimizado eran comunes para la detección por MS y MS/MS. A continuación se optimizó la amplitud de fragmentación para llevar a cabo la detección por MS/MS. Con este parámetro se controla la energía utilizada para fragmentar al ión precursor. En general valores excesivamente bajos no fragmentarán al ión precursor, mientras que valores excesivamente altos, expulsarán de la trampa al ión precursor y a los iones fragmentos obtenidos. Para llevar a cabo esta optimización, se prepararon disoluciones de 20 mg/L de cada analito, disolviéndolos en el tampón de trabajo (acetato amónico 60 mM, pH 6), y llevando a cabo una infusión por voltaje. Se varió la amplitud de fragmentación entre 0 y 1.5 V, en incrementos de 0.05 V, de tal forma que la intensidad de los fragmentos fuera máxima y siempre quedara un resto del ión precursor.

Con objeto de llevar a cabo la confirmación inequívoca de los analitos, la Decisión 2002/657/EC [263], relativa a la validación de los métodos analíticos de control de residuos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los resultados, en el marco de la Directiva 96/23/CE, establece un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos, basado en el uso de la masa mediante análisis de los fragmentos. Teniendo en cuenta que los antibióticos β -lactámicos están clasificados en el grupo B (medicamentos de uso veterinario con LMR establecido), se requiere un mínimo de 3 puntos. La asignación de puntos se establece adjudicando 1 punto para cada ión precursor y 1.5 puntos para cada hijo o ión fragmento.

[263] European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L221.

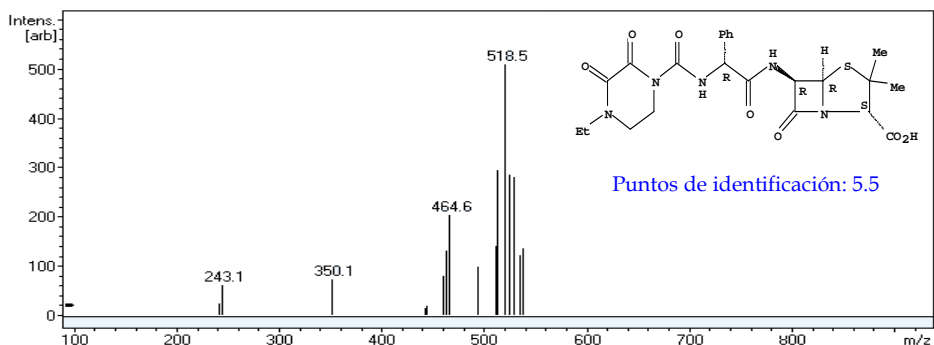
A continuación, en la Tabla III-4 se recogen los parámetros correspondientes al acoplamiento MS/MS, incluida la amplitud de fragmentación seleccionada en función del criterio establecido, así como el número de fragmentos producidos. La Figura III-21 recoge los distintos espectros de MS/MS obtenidos para cada analito así como sus correspondientes estructuras.

Para todos los compuestos implicados en la separación, se superó el número mínimo de puntos de identificación que exige la legislación.

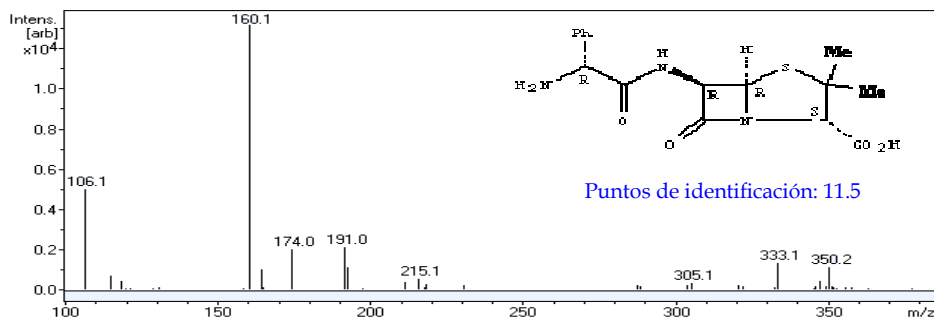
Tabla III-4. Principales parámetros correspondientes al acoplamiento MS/MS y puntos de identificación para cada analito.

Analito	AMOX	AMPI	PIPE	PENG	PENV	CLOXA	OXA	DICLOX	NAFCI	LOME (P.I.)
Ion precursor	366.4	350.4	518.5	335.4	351.2	436.8	402.4	470.2	415.2	352.3
Amplitud (V)	0.85	0.65	1.00	0.70	0.65	0.55	0.85	0.45	0.50	0.85
Anchura (m/z)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Límite (m/z)	100	96	143	91	96	120	110	130	114	100
Iones fragmento	136.9 185.0 203.2 258.2 320.6 349.1	106.1 160.1 174.0 191.0 215.1 305.1 333.1	464.6 350.1 243.1	141.0 173.1 195.1 215.2 249.1 263.9 307.2 317.4	114.1 160.0 192.2 235.2 281.0 333.4	163.9 277.2 333.3 356.4 390.2	126.1 160.0 175.2 219.1 243.1 283.3	160.1 311.1	115.1 181.1 199.1 256.2	225.2 265.2 288.3 308.3 334.2
Puntos identificación	10	11.5	5.5	13	10	8.5	10	4	7	8.5
Segmentos (minutos)	7 - 19	7 - 19	19 - 25	19 - 25	19 - 25	7 - 19	7 - 19	7 - 19	7 - 19	4 - 7

Piperacilina



Ampicilina



Penicilina G

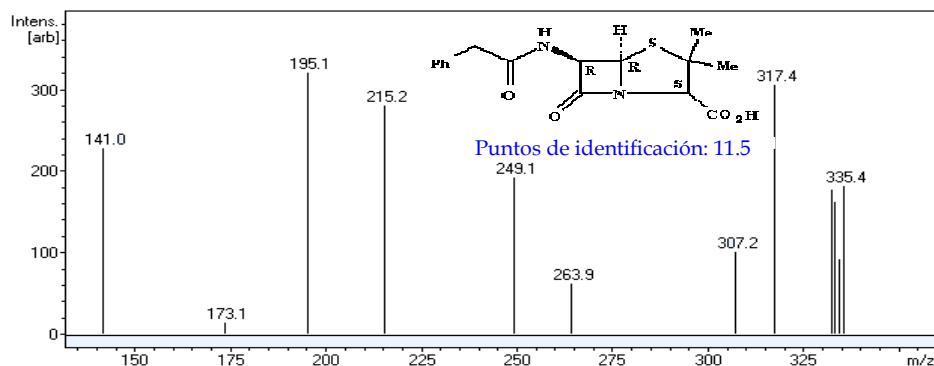
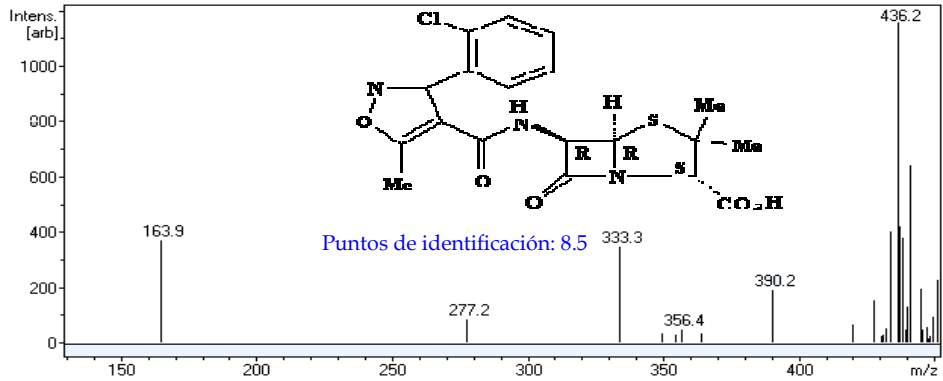
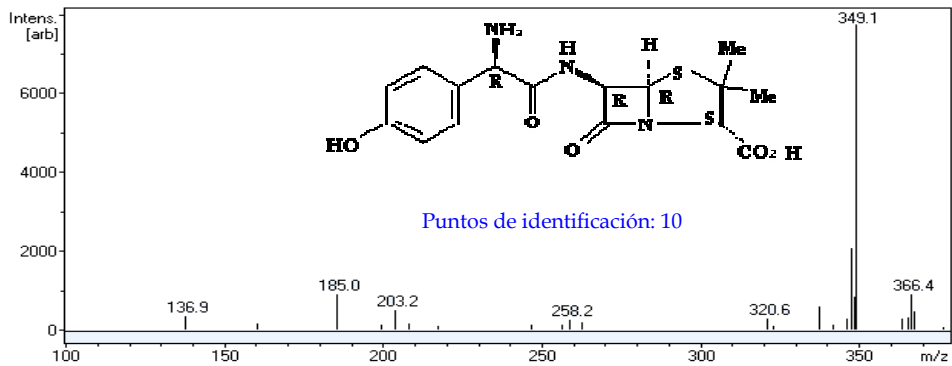


Figura III-21. Espectros de MS/MS de los analitos en estudio y del PI.

Cloxacilina



Amoxicilina



Nafcilina

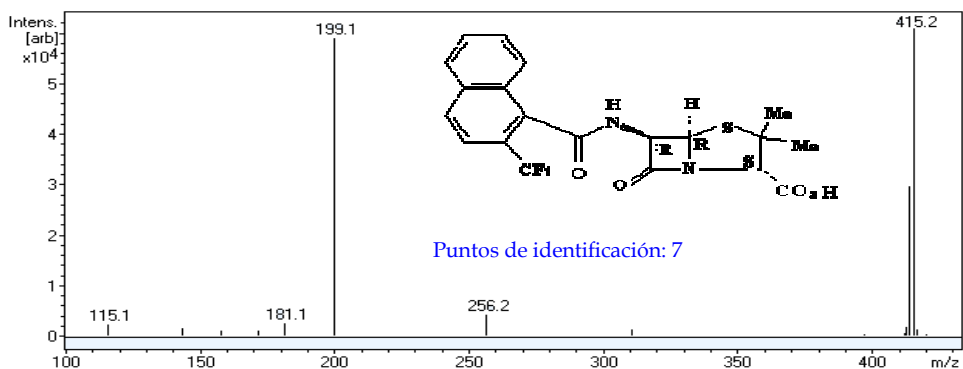
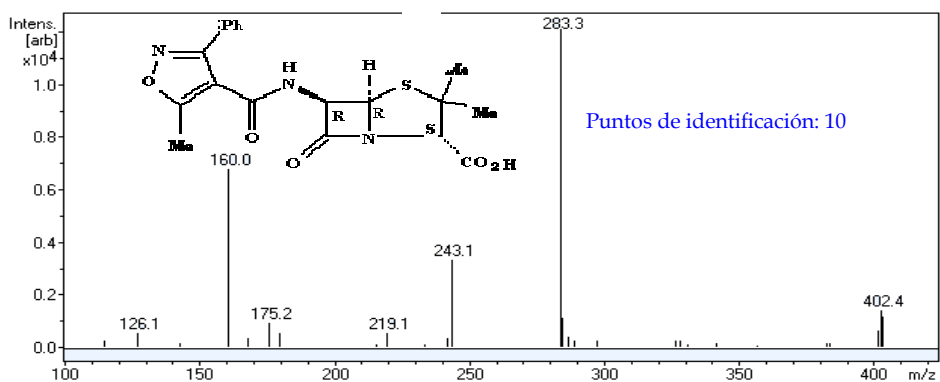
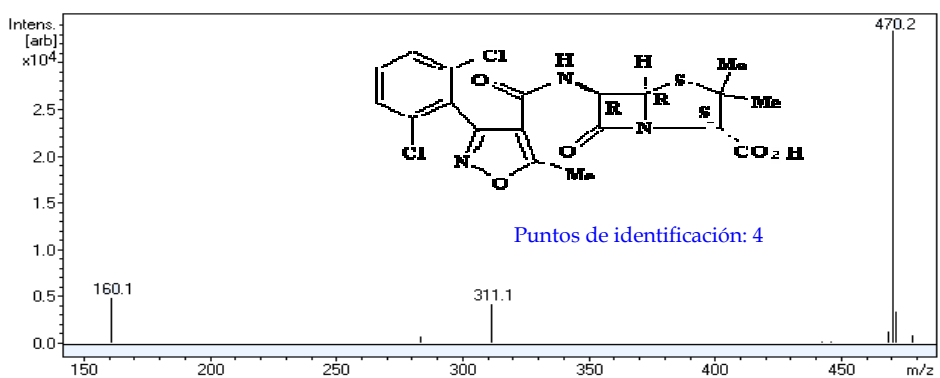


Figura III-21. Espectros de MS/MS de los analitos en estudio y del PI.

Oxacilina



Dicloxacilina



Penicilina V

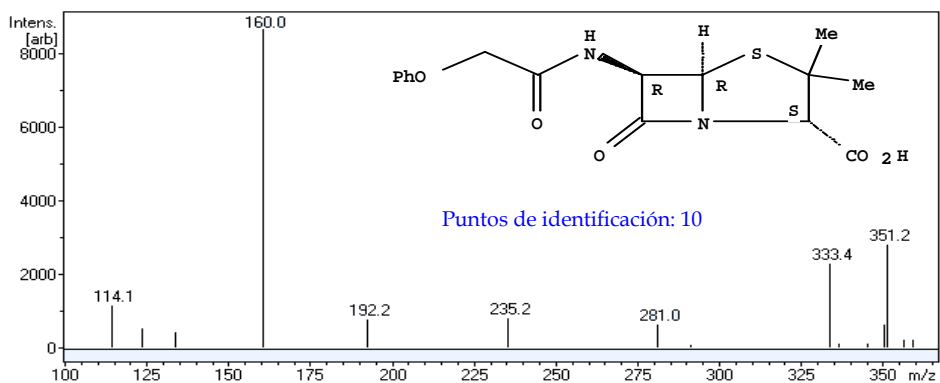


Figura III-21. Espectros de MS/MS de los analitos en estudio y del PI.

Lomefloxacin (PI)

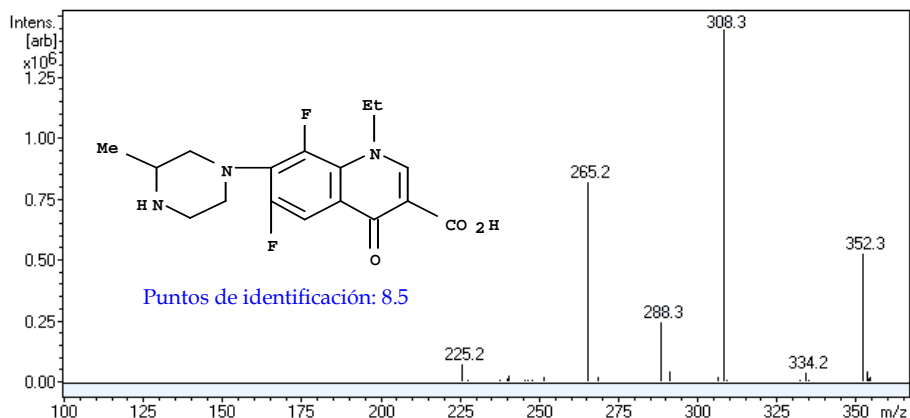


Figura III-21 (cont.). Espectros de MS/MS de los analitos en estudio y del IS.

5.2.4. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INYECCIÓN

El último parámetro optimizado fue el tiempo de inyección. La optimización se realizó aumentando dicho tiempo de 10 a 100 s, aplicando una presión de 50 mbar.

En la Figura III-22 se recoge la influencia del tiempo de inyección sobre la relación S/N para todos los analitos estudiados. Según se observa, al aumentar el tiempo de inyección, aumenta la relación S/N, hasta los 90 segundos, valor a partir del cual permanece constante o incluso decrece, seleccionándose por tanto este valor como óptimo.

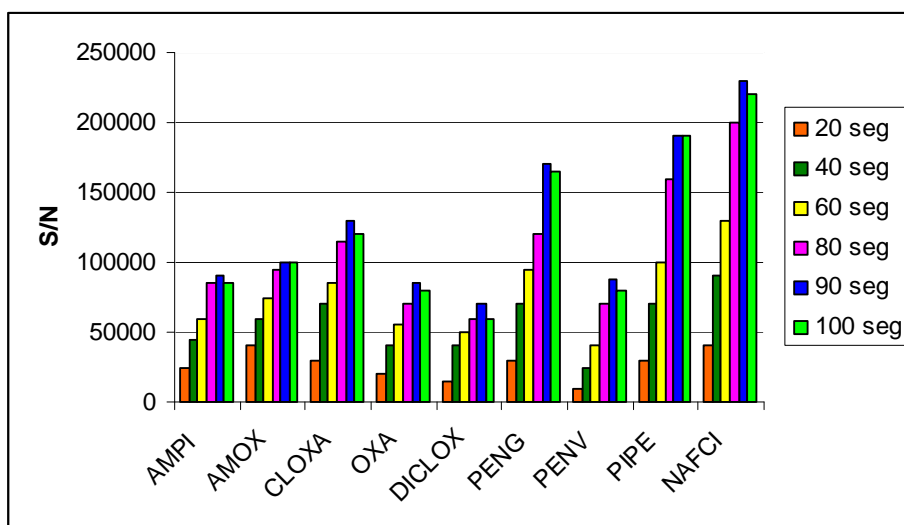


Figura III-22. Optimización del tiempo de inyección.

5.3. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

5.3.1. RECTAS DE CALIBRADO

La linealidad de la respuesta se comprobó a partir de cuatro niveles de concentración correspondientes a 8, 15, 20 y 25 mg/L, para AMPI, AMOX, PENV, PENG, PIPE, OXA, CLOXA, DICLOX y NAFCI para CE-MS y seis niveles de concentración para CE-MS/MS correspondientes a: 3, 5, 8, 15, 20 y 25 mg/L, para cada uno de los antibióticos. En todos los niveles se usó una concentración de 50 mg/L de LOME como PI.

Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado en las condiciones óptimas seleccionadas. Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico corregidas (relación entre el área de pico del analito dividido por el tiempo de migración, y dividido entre el área de pico del patrón interno dividido por su tiempo de migración), en función de la concentración de cada analito. Las rectas de calibrado se establecieron tanto para el método de CE-MS, como para el de CE-MS/MS. La Figura III-23 recoge las correspondientes al acoplamiento CE-MS/MS.

Los parámetros estadísticos, calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad de los métodos, se muestran en la Tabla III-5 para CE-MS, y Tabla III-6 para CE-MS/MS. Se observa que, en términos generales, el método CE-MS/MS muestra una mayor sensibilidad, además de ofrecer simultáneamente la posibilidad de la separación, cuantificación y confirmación de los analitos en estudio en función de los puntos de identificación requeridos por la Decisión de la Unión Europea [263].

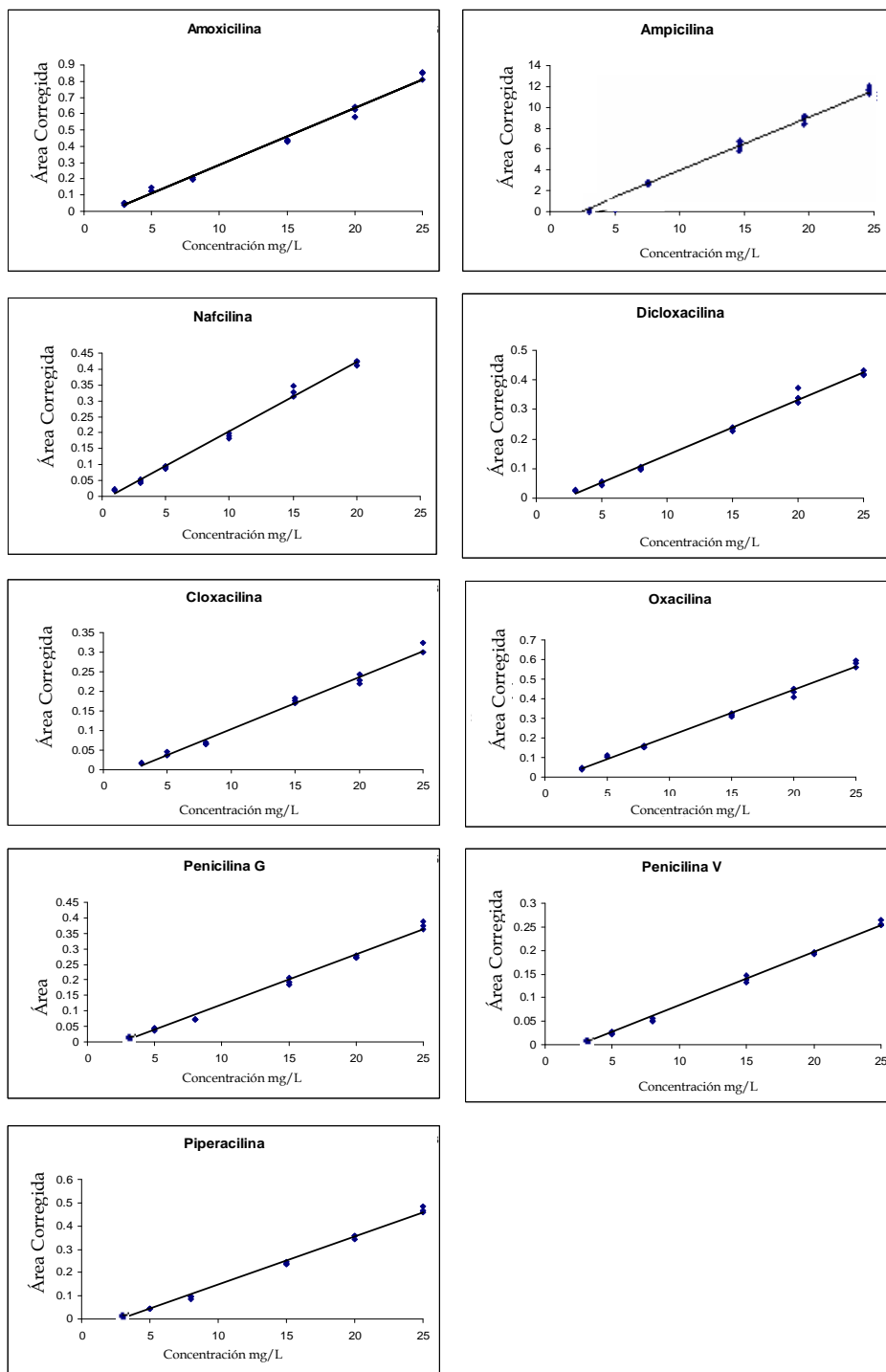


Figura III-23. Rectas de calibrado en CE-MS/MS.

Tabla III-5. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto mediante CE-MS.*

	AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Ordenada	0.023	0.058	0.048	0.041	0.059	0.090	0.045	0.019	0.053
Pendiente	0.083	0.068	0.034	0.034	0.032	0.043	0.032	0.035	0.037
R ² (%)	99.2	99.1	99.0	99.3	99.4	99.5	99.2	99.3	99.4
LOD ^a (mg/L)	1.0	2.0	2.0	2.0	2.3	0.6	2.3	2.0	1.5
LOQ ^b (mg/L)	3.3	6.7	6.7	6.7	8.0	2.0	8.0	6.7	5.0
Rango lineal (mg/L)	1.0 - 25	2.0 - 25	2.0 - 25	2.0 - 25	2.3 - 25	0.6 - 20	2.3 - 25	2.0 - 25	1.5 - 25

^a Tres veces la relación señal- ruido.

^b Diez veces la relación señal- ruido.

Tabla III-6. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuestos mediante CE-MS/MS.*

	AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Ordenada	-0.065	-1.949	-0.029	-0.040	-0.027	-0.013	-0.042	-0.028	-0.056
Pendiente	0.035	0.513	0.013	0.019	0.024	0.022	0.016	0.011	0.021
R ² (%)	99.2	99.2	99.2	99.3	99.3	99.3	99.1	99.2	99.3
LOD ^a (mg/L)	0.4	0.6	0.9	0.9	0.8	0.1	0.6	0.6	0.7
LOQ ^b (mg/L)	1.3	2.0	3.0	3.0	2.6	0.3	2.0	2.0	2.3
Rango lineal (mg/L)	0.4 - 25	0.6 - 25	0.9 - 25	0.9 - 25	0.8 - 25	0.1 - 20	0.6 - 25	0.6 - 25	0.7 - 25

^a Tres veces la relación señal- ruido.

^b Diez veces la relación señal- ruido.

5.3.2 ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

El estudio de la precisión para el método propuesto a diferentes concentraciones se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Repetibilidad o precisión intradía: se midieron tres disoluciones patrón (réplicas experimentales), de las concentraciones indicadas en las Tabla III-7 y III-8, y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales).
- Precisión intermedia o interdía: se llevó a cabo por el mismo procedimiento del estudio anterior, pero analizando una disolución patrón, durante 5 días e inyectado por triplicado.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración para CE-MS (Tabla III-7) y para CE-MS/MS (Tabla III-8).

Tabla III-7. Resultados obtenidos en el estudio de precisión para CE/MS.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOXA	DICLOX	PENV	PIPE
Intradía (n=9)									
10 mg/L DER (%)	2.1	3.9	4.1	3.7	4.2	3.7	4.2	4.1	3.7
20 mg/L DER (%)	2.1	3.4	4.0	3.6	4.1	3.7	4.0	4.1	3.2
Tiempo migración (min)	18.1	10.4	18.9	12.0	17.8	16.2	16.6	21.3	22.4
DER (%)	0.4	0.8	0.6	0.5	0.6	0.7	0.6	0.6	0.5
Interdía (n=15)									
10 mg/L DER (%)	3.9	5.1	4.4	4.1	5.6	4.8	5.4	4.5	4.4
20 mg/L DER (%)	4.0	4.8	4.3	4.1	4.7	4.3	5.2	4.6	4.5
Tiempo migración (min)	17.9	10.3	18.6	11.8	17.3	17.0	16.4	19.8	21.5
DER (%)	2.7	3.4	3.6	3.4	5.6	3.7	4.1	2.3	3.7

Tabla III-8. Resultados obtenidos en el estudio de precisión para CE-MS/MS.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOXA	DICLOX	PENV	PIPE
Intradía (n=9)									
1 mg/L DER (%)	5.8	6.6	4.6	5.9	7.4	6.2	5.9	3.6	5.4
10 mg/L DER (%)	4.4	6.3	4.5	5.6	6.7	6.3	5.8	3.7	5.0
20 mg/L DER (%)	4.9	5.8	4.6	4.8	6.7	5.9	5.1	4.1	5.1
Tiempo migración (min)	17.6	10.0	18.4	11.6	17.3	15.8	16.0	20.9	21.9
DER(%)	1.1	0.8	0.6	0.7	1.3	0.9	0.7	0.7	0.6
Interdía (n=15)									
1 mg/L DER (%)	6.9	7.1	5.8	6.3	7.8	6.8	6.0	4.7	5.3
10 mg/L DER (%)	5.8	6.3	5.4	6.3	7.5	6.6	5.9	5.0	5.6
20 mg/L DER (%)	5.6	6.0	5.4	5.8	6.9	6.0	6.0	4.9	4.9
Tiempo migración (min)	18.2	10.6	18.9	12.0	17.8	16.2	16.6	21.2	22.5
DER (%)	4.2	4.5	4.0	3.9	6.4	5.8	3.3	3.8	3.7

5.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO Y AGUAS

Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado en muestras reales, se seleccionó una muestra de alimento de origen animal, en concreto músculo de pollo, para la que están legislados los correspondientes LMRs para los analitos en estudio y diversos tipos de aguas en las que pueden encontrarse estos residuos.

5.4.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO

5.4.1.1. Tratamiento de las muestras

Para llevar a cabo la extracción de los analitos de las muestras de músculo de pollo, paso previo a la etapa de limpieza y preconcentración por extracción en fase sólida (SPE), se ensayaron dos procedimientos para la extracción sólido-líquido que comentamos a continuación.

5.4.1.1.1. *Extracción con disolventes presurizados*

En primer lugar se probó una extracción con disolventes presurizados (PLE), también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE) [264-268]. Este método permite la utilización de disolventes por encima de sus

[264] M.M. Schantz, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1043.

[265] E. Björklund, S. Sporning, K. Wiberg, P. Haglund, C. von Holst, *Trends. Anal. Chem.* 25 (2006) 318.

[266] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A*, 1089 (2005) 1.

[267] L. Ramos, E.M. Kristenson, U. A. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3.

[268] H. Giergielewicz-Możajska, Ł. Dąbrowski, J. Namieśnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 149.

puntos de ebullición debido al empleo de alta presión. Esta característica puede mejorar las recuperaciones y reducir el consumo de disolventes orgánicos si la comparamos con la extracción Soxhlet más tradicional. En bibliografía no se ha encontrado ningún antecedente que emplee este método de extracción para los antibióticos β -lactámicos, por lo que comenzamos haciendo pruebas tomando como referencia un método, propuesto por nuestro grupo de investigación, para la extracción de quinolonas en carne de pollo [269].

Se estudiaron los parámetros que deben optimizarse al usar PLE: temperatura de extracción (entre 75°C y 40°C), tiempo de extracción (entre 1 y 5 min), ciclos de extracción (desde 1 a 3) y el volumen de purga entre el 60 y 100 % del volumen de la celda, manteniendo un tiempo de purga de 60 s.

Como tamaño de muestra, usando una celda de 34 mL, tomamos 5 g de carne de pollo triturada, libre de los antibióticos en estudio y fortificada con los antibióticos β -lactámicos. Se homogeneiza y se deja en oscuridad durante 10 minutos, mezclados con 7 g de tierra de diatomeas. En cuanto al disolvente de extracción se probó con diclorometano ya que en la bibliografía este disolvente ha demostrado proporcionar extractos muy limpios en el análisis de quinolonas en muestras de músculo de pollo [269, 270]. Sin embargo, para los antibióticos estudiados no se obtuvieron resultados satisfactorios, ni con la temperatura más baja. Variamos el disolvente de extracción, empleando ácido metafosfórico 0.2 % en mezcla agua/acetonitrilo (70/30 (v/v) a pH 2.6; acetonitrilo/agua (70/30), (50/50) (v/v) y agua caliente. Para el aislamiento y preconcentración se recurrió al uso de los cartuchos HLB, empleando el protocolo propuesto en el capítulo anterior.

[269] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, J.M. Bosque-Sendra, *Electrophoresis*, 29 (2008) 2117.

[270] S. Bailac, D. Barrón, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 580 (2006) 163.

En ninguno de los casos obtuvimos señal alguna correspondiente a nuestros analitos. Esto puede ser debido a que se trata de compuestos muy sensibles a la temperatura y, aún aplicando la mínima temperatura posible en el equipo, al someterlos a grandes presiones se descomponen. Este hecho podría justificar el que no existan datos algunos sobre este tipo de extracción para los antibióticos β -lactámicos en bibliografía.

5.4.1.1.2. *Extracción por agitación*

La otra alternativa ensayada fue la extracción líquida con disolventes no acuosos, usando posteriormente las etapas de SPE ya optimizadas para muestras de leche en el capítulo anterior.

La extracción sólido-líquido nos permite extraer componentes solubles de sólidos con la ayuda de un disolvente. Para conseguir una extracción lo más rápida y completa posible del sólido, es necesario que haya una amplia superficie de contacto, esto lo conseguimos triturando el sólido a extraer (la carne de pollo en este caso), y para evitar el apelmazamiento y dificultar de esta forma la extracción, se somete a un proceso de agitación con lo que se homogeneiza la mezcla de la matriz con el disolvente. A continuación se separa el disolvente del sólido por centrifugación y se continúa con el tratamiento de muestra.

Tras las correspondientes modificaciones del procedimiento propuesto en el capítulo II para conseguir la extracción de todos los antibióticos β -lactámicos en estudio en la muestra de carne, el método finalmente empleado, partiendo de una muestra libre de antibióticos β -lactámicos, fue el siguiente:

Partimos de 5 g de carne de pollo triturada, libre de los analitos en estudio, fortificamos la muestra con los antibióticos β -lactámicos, homogeneizamos y la dejamos en la oscuridad durante 10 minutos.

A continuación la colocamos en un tubo de centrífuga (40 mL), añadimos 5 mL de acetonitrilo y agitamos 3 min en vortex. Seguidamente añadimos 10 mL más de acetonitrilo y volvemos a agitar otros 3 min en vortex, centrifugamos a 1800 rpm durante 5 minutos, tomamos el sobrenadante y llevamos hasta casi sequedad, en corriente de nitrógeno. Reconponemos el extracto con 3 mL de tampón fosfato 60 mM a pH 8.5 , agitando en vortex durante 1 min.

Las muestras se pasan a continuación a través de los cartuchos HLB (60 mg, 3 mL), previamente activados con 5 mL de metanol, 5 mL de acetonitrilo, 5 mL de agua milli-Q y 3 mL de tampón fosfato pH 8.5 y eluimos con 6 mL de acetonitrilo a una velocidad de 1 - 2 mL/min empleando bomba de vacío. El eluato se pasa a través de un cartucho de alúmina N (500 mg, 3 mL) fabricado en el laboratorio, previamente activado con 4 mL de agua milli-Q y 4 mL de acetonitrilo. Se eluye con 3 mL de agua y llevamos a sequedad en corriente de nitrógeno hasta 0.5 mL aprox. Finalmente, añadimos el patrón interno (LOME, 500 μ g/L) e introducimos la muestra en el equipo CE-MS.

En la Figura III-24 se adjunta un esquema de la preparación de muestra.

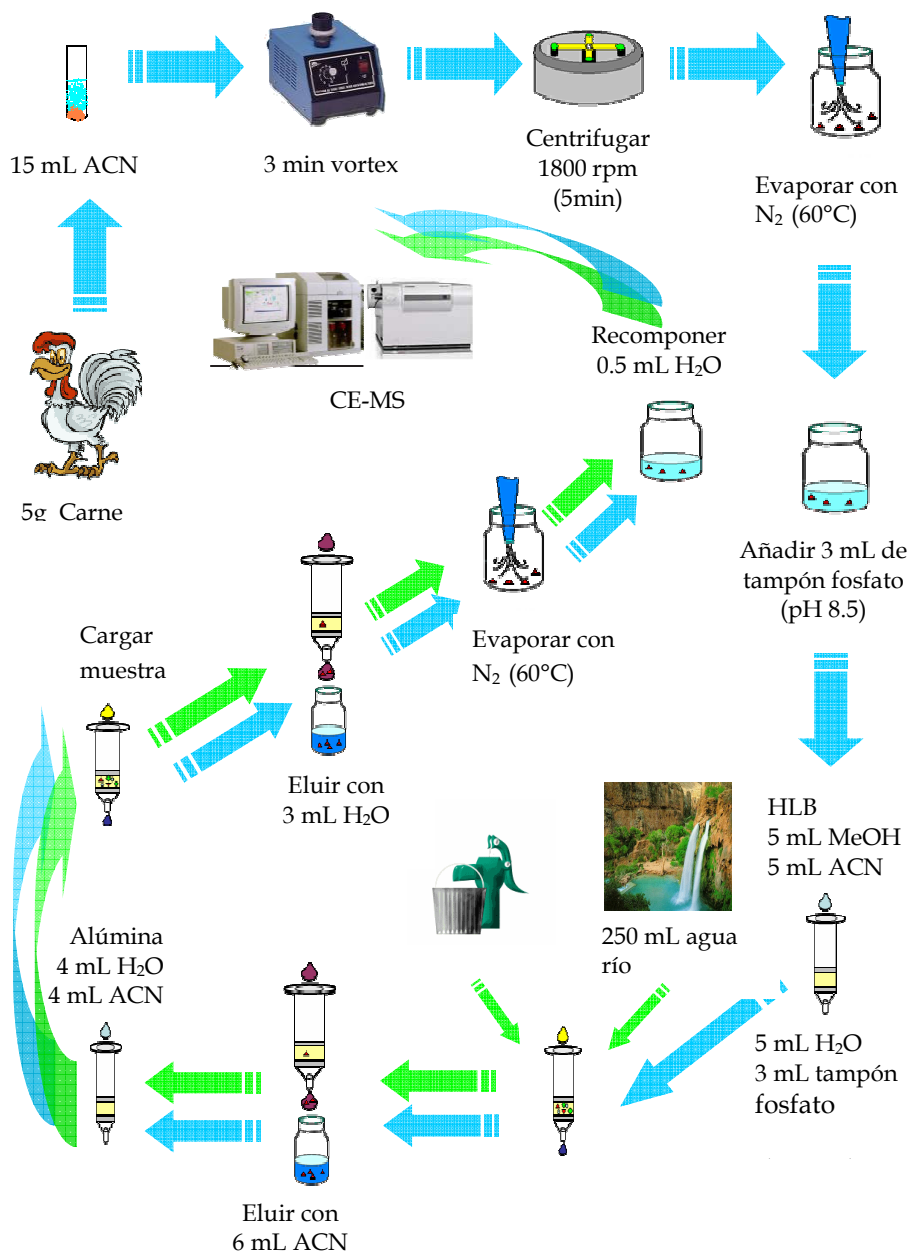


Figura III- 24. Esquema correspondiente a la preparación de muestra.

5.4.1.2. Validación de los métodos para el análisis de muestras de carne

El método analítico completo se validó en presencia de matriz en términos de linealidad, LOD, LOQ, precisión y veracidad.

5.4.1.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

Las funciones de calibrado para los antibióticos β -lactámicos seleccionados se obtuvieron empleando muestras limpias de carne de pollo y dopándolas antes del tratamiento de muestra. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 30, 60, 100, 150, 300 y 500 $\mu\text{g/L}$ para AMPI, AMOX, CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, PENV y PIPE y de 20, 60, 100, 150, 300 y 500 $\mu\text{g/L}$ para NAFCl, en CE-MS/MS. Debido a que CE-MS era menos sensible, se usaron cuatro niveles de concentración correspondientes a 100, 150, 300 y 500 $\mu\text{g/L}$ para todos los antibióticos estudiados.

En todos los casos se añadió una concentración de 500 $\mu\text{g/L}$ de LOME como PI durante la etapa final de reconstitución de la muestra. Se prepararon dos réplicas de cada nivel de concentración. Las funciones de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas (relación entre el área del pico de analito y el área del pico de PI y el tiempo de migración de ambos). Las funciones de calibrado se establecieron tanto para CE-MS, como para CE-MS/MS.

En la Figura III-25 se muestran las rectas de calibrado para CE-MS/MS. Los parámetros estadísticos, calculados mediante regresión por mínimos cuadrados, se muestran en la Tabla III-9 para el método CE-MS y en la Tabla III-10 para CE-MS/MS.

Como puede observarse, en términos generales, el método CE-MS/MS en presencia de matriz muestra igualmente una mayor sensibilidad, además de ofrecer simultáneamente la posibilidad de la separación, cuantificación y confirmación de los analitos en estudio en función de los puntos de identificación requeridos por la Decisión de la Unión Europea [263]. Como puede observarse, en ambas metodologías los límites de detección se encuentran por debajo de los LMRs legislados para estos antibióticos en músculo de pollo [20].

Tabla III-9. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para muestras de carne de pollo mediante CE-MS.*

	AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Ordenada	0.061	0.123	0.070	0.009	0.008	0.054	0.007	0.001	0.032
Pendiente	0.006	0.009	0.011	0.005	0.004	0.007	0.003	0.003	0.005
R ² (%)	99.3	99.2	99.2	99.3	99.5	99.4	99.7	99.9	99.5
LOD ^a (µg/Kg)	16	22	29	27	28	13	17	19	24
LOQ ^b (µg/Kg)	53	73	96	90	93	43	56	63	80
LMR (µg/Kg)	50	50	300	300	300	300	50	25	~
Rango lineal (µg/Kg)	16-500	22-500	29-500	27-500	28-500	13-500	17-500	19-500	24-500

(a): Tres veces la relación señal/ruido.

(b): Diez veces la relación señal/ruido.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM

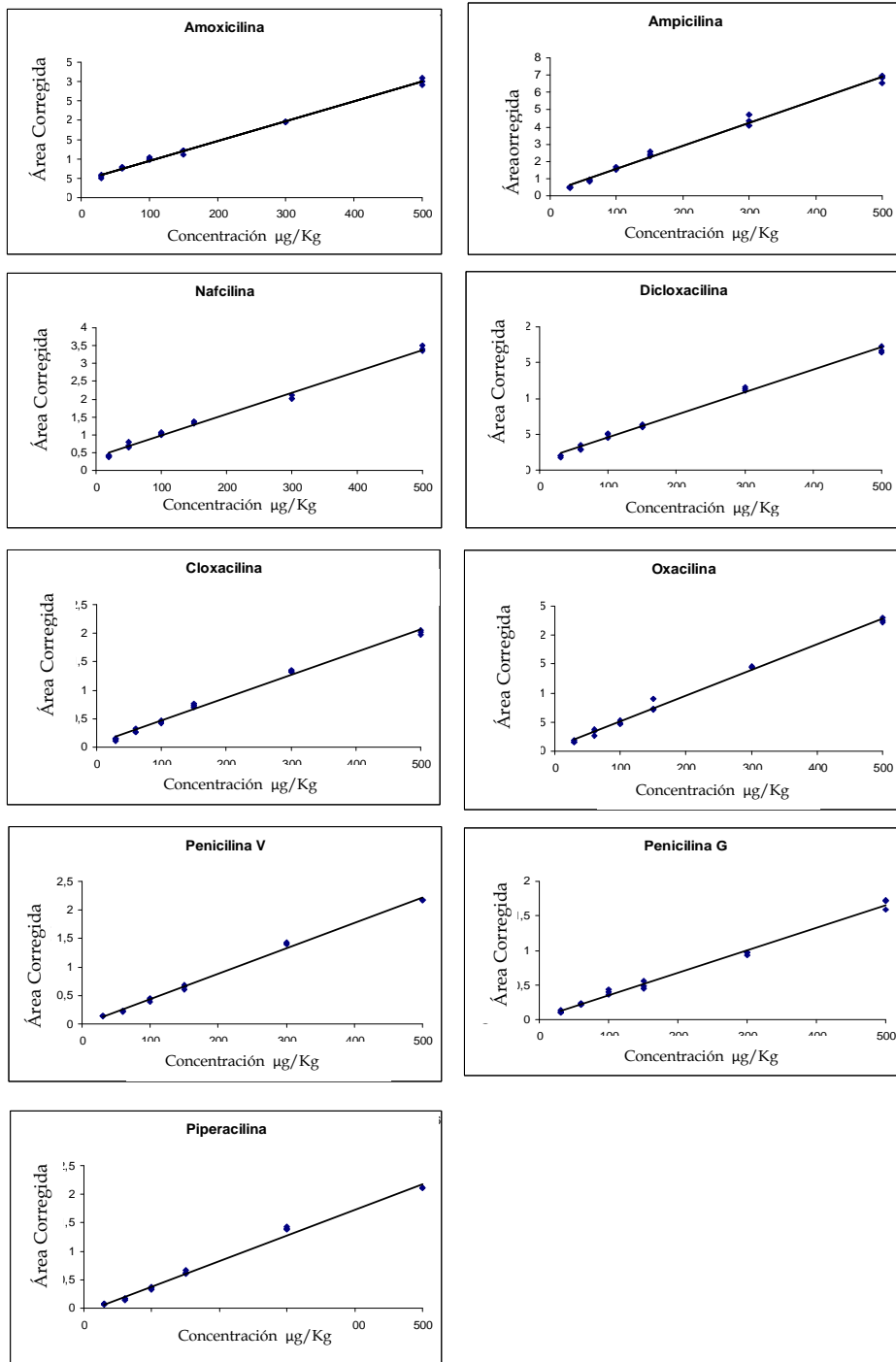


Figura III-25. Rectas de calibrado en carne de pollo mediante CE-MS/MS.

Tabla III-10. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para muestras de carne de pollo mediante CE-MS/MS.*

	AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Ordenada	0.433	0.218	0.061	0.136	0.064	0.369	0.026	-0.008	-0.066
Pendiente	0.005	0.013	0.004	0.003	0.005	0.006	0.003	0.004	0.005
R ² (%)	99.5	99.2	99.4	99.4	99.4	99.2	99.3	99.6	99.3
LMRs (µg/Kg)	50	50	300	300	300	~	50	~	~
LOD ^a (µg/Kg)	11	10	11	10	12	8	10	10	11
LOQ ^b (µg/Kg)	28	27	29	28	30	23	29	28	30
Rango lineal (µg/Kg)	11-500	10-500	11-500	10-500	12-500	8-500	10-500	10-500	10-500

(a): Tres veces la relación señal/ruido.

(b): Diez veces la relación señal/ruido.

5.4.1.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se estudió en un solo día por medio de tres aplicaciones repetitivas del procedimiento de tratamiento de muestra a tres muestras diferentes (réplicas experimentales) dopadas a dos niveles de concentración (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) para CE-MS y tres (30, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) para CE-MS/MS. La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos (tres inyecciones) con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se dan en las Tabla III-11 y Tabla III-12.

Como se puede comprobar, la precisión es muy satisfactoria para los tiempos de migración y aceptable a todos los niveles de concentración estudiados y para ambas metodologías aunque se observan desviaciones estándar⁴ relativas ligeramente inferiores en el método de CE-MS/MS.

Tabla III-11. Estudio de la precisión del método propuesto para muestras de carne de pollo mediante CE-MS.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOXA	DICLOX	PENV	PIPE
Intradía (n=9)									
100 µg/Kg DER (%)	4.4	4.9	4.1	4.2	5.2	5.3	5.2	4.1	4.1
200 µg/Kg DER (%)	5.2	4.8	4.7	4.0	5.4	4.7	5.1	3.1	4.2
Tiempo migración (min)	19.2	11.4	20.1	12.5	19.0	17.2	17.4	22.4	24.0
DER (%)	0.8	0.6	0.5	0.7	0.8	0.9	0.9	0.6	0.7
Interdía (n=15)									
100 µg/Kg DER (%)	3.6	5.4	5.0	4.7	5.3	5.8	5.1	5.2	4.6
200 µg/Kg DER (%)	3.3	5.0	4.6	4.3	4.9	5.3	4.6	4.8	4.6
Tiempo migración (min)	18.9	11.1	19.7	11.9	18.2	16.7	17.0	21.8	23.3
DER (%)	3.6	4.5	3.4	4.1	6.1	5.2	5.3	3.6	2.1

Tabla III-12. Estudio de la precisión del método propuesto para muestras de carne de pollo mediante CE-MS/MS.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOXA	DICLOX	PENV	PIPE
Intradía (n=9)									
30 µg/Kg DER (%)	3.2	4.0	4.4	5.5	5.8	4.7	4.7	3.6	4.9
100 µg/Kg DER (%)	4.3	4.6	4.2	3.6	4.8	5.1	5.9	2.9	4.2
200 µg/Kg DER (%)	4.8	3.9	3.3	4.3	5.6	3.9	4.5	3.1	3.0
Tiempo migración (min)	17.8	10.2	18.5	11.6	17.3	15.8	16.1	20.8	21.8
DER (%)	0.6	0.8	0.7	0.6	0.8	0.7	0.9	0.7	0.4
Interdía (n=15)									
30 µg/Kg DER (%)	4.3	5.2	4.9	4.3	4.8	5.3	5.1	4.7	4.4
100 µg/Kg DER (%)	3.1	4.7	4.0	3.7	5.9	6.4	7.1	5.9	6.1
200 µg/Kg DER (%)	6.3	7.1	6.6	7.3	7.9	8.3	7.9	6.8	7.2
Tiempo migración (min)	17.3	9.9	18.2	11.2	16.8	15.4	15.8	20.5	21.4
DER (%)	2.3	3.1	4.7	3.9	5.3	5.9	6.6	4.8	4.4

5.4.1.2.3. *Estudio de la veracidad*

Para demostrar la veracidad de los métodos propuestos aplicados a músculo de pollo se llevaron a cabo estudios de recuperación usando muestras libres de analito y dopadas a dos niveles de concentración (200 y 500 µg/Kg) para CE-MS y a tres niveles (30, 200 y 500 µg/Kg) para CE-MS/MS. Se prepararon tres réplicas a cada nivel de concentración. Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando áreas de pico relativas de muestras de carne de pollo dopadas antes del tratamiento de muestra con las áreas de pico relativas de disoluciones patrón mezcla de los analitos a las mismas concentraciones. El uso de este procedimiento posibilitó la extracción de los antibióticos β-lactámicos de la carne de forma cuantitativa ya que las recuperaciones estuvieron comprendidas entre el 84 y el 99 % para CE-MS y entre el 84 y el 97 % para CE-MS/MS, con valores de desviación estándar relativa aceptables en todos los casos. Los resultados se muestran en la Tabla III-13 para CE-MS y Tabla III-14 para CE-MS/MS.

Tabla III-13. *Estudio de recuperación para cada antibiótico β-lactámico en muestras de carne de pollo mediante CE-MS.*

		AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PEN G	PENV	PIPE
200 µg/Kg	R (%)	84	90	92	87	85	97	93	91	95
	DER (%)	3.9	4.8	3.2	3.9	5.0	2.7	3.1	4.1	3.9
500 µg/Kg	R (%)	90	91	90	89	85	99	94	92	96
	DER (%)	4.1	4.0	3.1	3.4	3.5	2.3	2.8	4.0	3.9

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM

Tabla III-14. Estudio de recuperación para cada antibiótico β -lactámico en muestras de carne de pollo mediante CE-MS/MS.

		AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PEN G	PENV	PIPE
30 $\mu\text{g/Kg}$	R (%)	90	88	86	87	84	96	90	92	93
	DER (%)	2.8	3.6	3.9	4.2	5.8	3.1	4.8	4.2	3.9
200 $\mu\text{g/Kg}$	R (%)	89	96	91	89	87	97	93	94	95
	DER (%)	4.7	3.9	4.9	3.7	5.3	2.5	3.8	3.9	4.2
500 $\mu\text{g/Kg}$	R (%)	89	97	93	90	89	97	94	96	96
	DER (%)	3.1	3.4	3.4	4.1	4.1	2.9	3.2	3.9	3.8

Con objeto de garantizar la ausencia de los compuestos estudiados en esta matriz y evaluar el ruido se sometió una muestra sin fortificar (blanco de muestra) al procedimiento de tratamiento de muestra y posterior medida mediante CE-MS y CEMS/MS. No se observaron picos que pudieran corresponder a los analitos ni otros compuestos interferentes que pudiesen comigrar con éstos. Las Figura III-26 y III-27 recoge los electroferogramas obtenidos para una muestra de carne de pollo dopada y para un blanco de muestra.

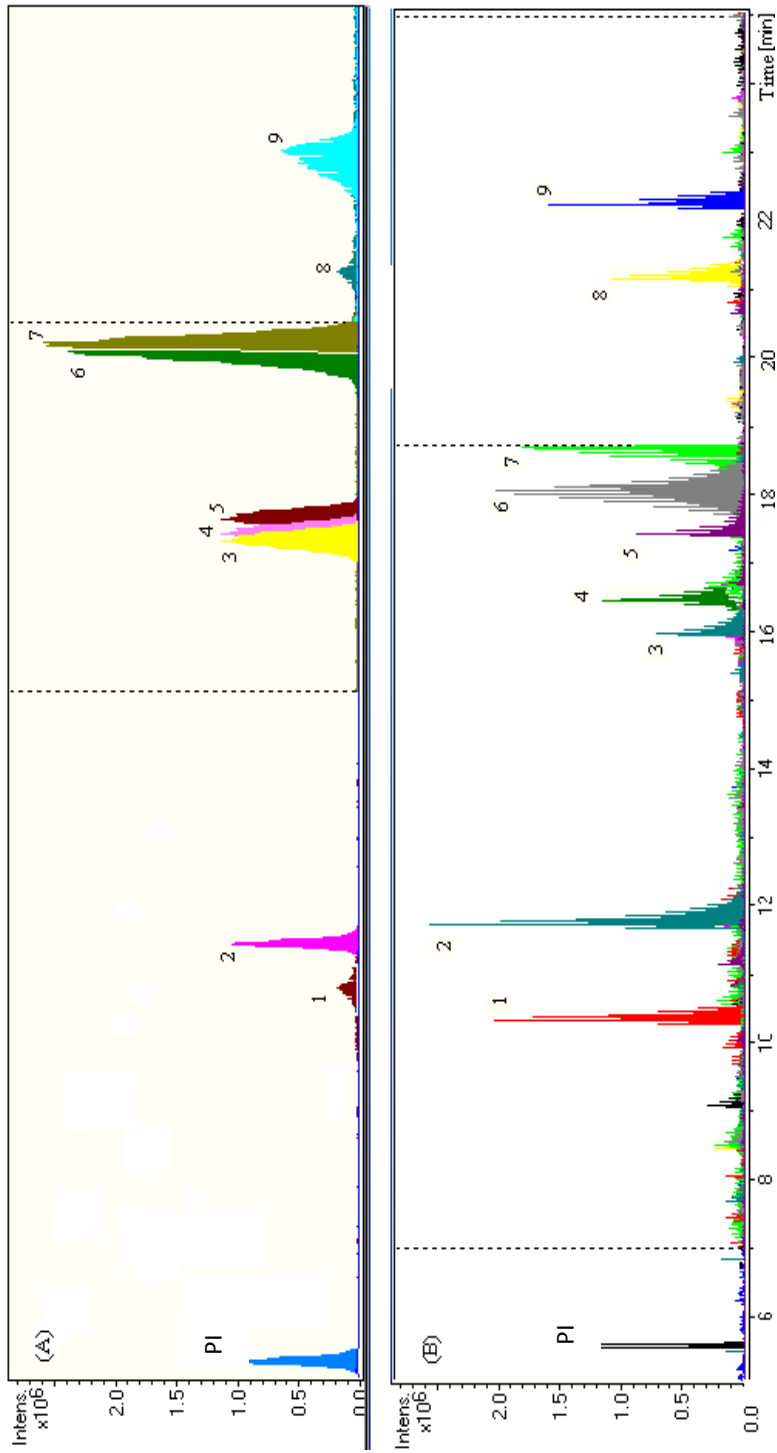


Figura III- 26. Electroferogramas obtenidos en las condiciones óptimas establecidas para el tratamiento de muestras de carne de pollo mediante (A), CE-MS, dopadas con 150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para cada analito; (B) CE-MS/MS, dopadas con 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para cada analito. LOME (PI), 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCI, 4. DICLOX, 5. CLOXA, 6. OXA, 7. PENG, 8. PENIV, 9. PIPE.

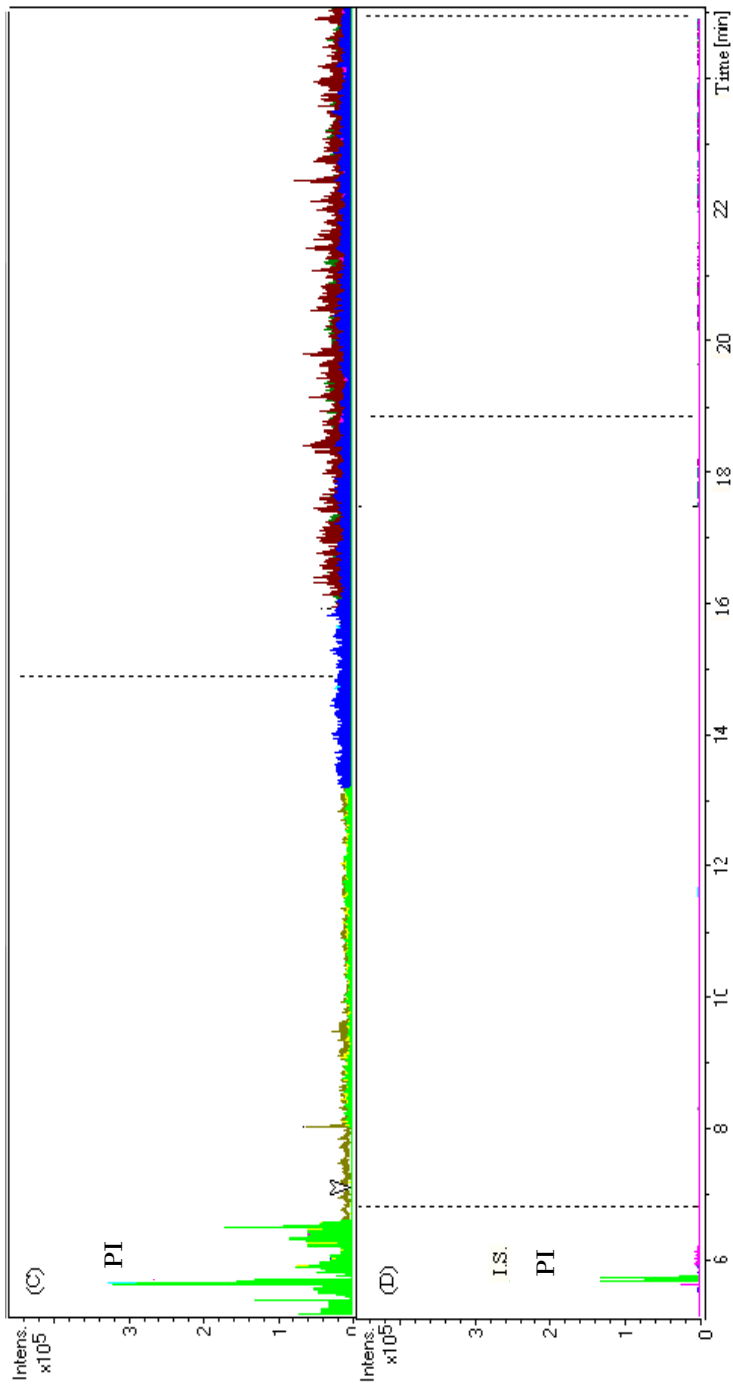


Figura III- 27. Electroferogramas obtenidos en las condiciones óptimas establecidas para el tratamiento de muestras de carne de pollo mediante (C), CE-MS, (D) CE-MS/MS, de dos muestras de carne de pollo sin dopar (blanco de muestra).

5.4.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS DE POZO Y RÍO

Para llevar a cabo esta aplicación, se seleccionaron dos tipos de muestras de agua, agua de río y agua de pozo, ambos situados en la zona de Guadix (Granada, España).

5.4.2.1. Tratamiento de las muestras de agua

El método a seguir es similar al empleado en el capítulo anterior para el análisis de muestras de agua y adaptado respecto al descrito anteriormente para la determinación de estos antibióticos en carne de pollo. La única diferencia reside en la etapa de preconcentración y limpieza, ya que en este caso únicamente emplearemos la etapa de preconcentración, pudiendo prescindir de la etapa de limpieza con cartuchos de alúmina, por lo que el tratamiento será más rápido. Los pasos a seguir en el procedimiento son los siguientes (ver Figura III-24):

1. Se toman 250 mL de agua
2. Se pasa la muestra por un cartucho HLB (60 mg, 3 mL) previamente activado con:
 - ✓ 5 mL de MeOH
 - ✓ 5 mL de Acetonitrilo
 - ✓ 5 mL de H₂O
 - ✓ 3 mL tampón fosfato pH 8.5
3. Se eluyen los antibióticos con 6 mL de acetonitrilo, a una velocidad de 1.2 mL/min.
4. Se evapora en corriente de nitrógeno a 60 °C.
5. Se recompone el residuo hasta un volumen final de 0.5 mL (que ya contiene el patrón interno LOME, 500 µg/L).

6. Se aplica el método CE-MS y CE-MS/MS con objeto de realizar la determinación de los compuestos en estudio.

5.4.2.2. Validación de los métodos para el análisis de muestras de agua

Para llevar a cabo este estudio se seleccionó como matriz representativa el agua de pozo. El método analítico completo se validó en términos de linealidad, LOD, LOQ, precisión y veracidad.

5.4.2.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

Las curvas de calibrado para los antibióticos β -lactámicos seleccionados, se obtuvieron empleando muestras de agua de pozo libres de los analitos y fortificándolas antes del tratamiento de muestra. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 0.5, 1, 3, 5, 10 y 15 $\mu\text{g/L}$ para NAFCI y 0.7 $\mu\text{g/L}$, 1.5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/L}$ para DICLOX, CLOXA, OXA, AMPI, AMOX, PENG, PENV y PIPE para el método de CE-MS/MS y cuatro niveles para el caso de CE-MS, correspondientes a 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/L}$ para todos los antibióticos. En todos los casos, 500 $\mu\text{g/L}$ de LOME se añadieron como PI durante la etapa de reconstitución. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración. Las curvas de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas corregidas (como la relación entre el área del pico de analito y el área del pico de PI y el tiempo de migración de ambos), tanto para CE-MS, como para CE-MS/MS. En la Figura III-28 se representan las correspondientes a CE-MS/MS. Los parámetros estadísticos, calculados mediante regresión por mínimos cuadrados se muestran en la Tabla III-15 para CE-MS y Tabla III-16 para CE-MS/MS, comprobándose que, en términos generales, el método CE-MS/MS muestra una mayor sensibilidad (lo que resulta muy adecuado para la detección de estos residuos en este tipo de matriz, dados los bajos niveles que cabe

esperar) además de ofrecer simultáneamente la posibilidad de la separación, cuantificación y confirmación de los analitos en estudio.

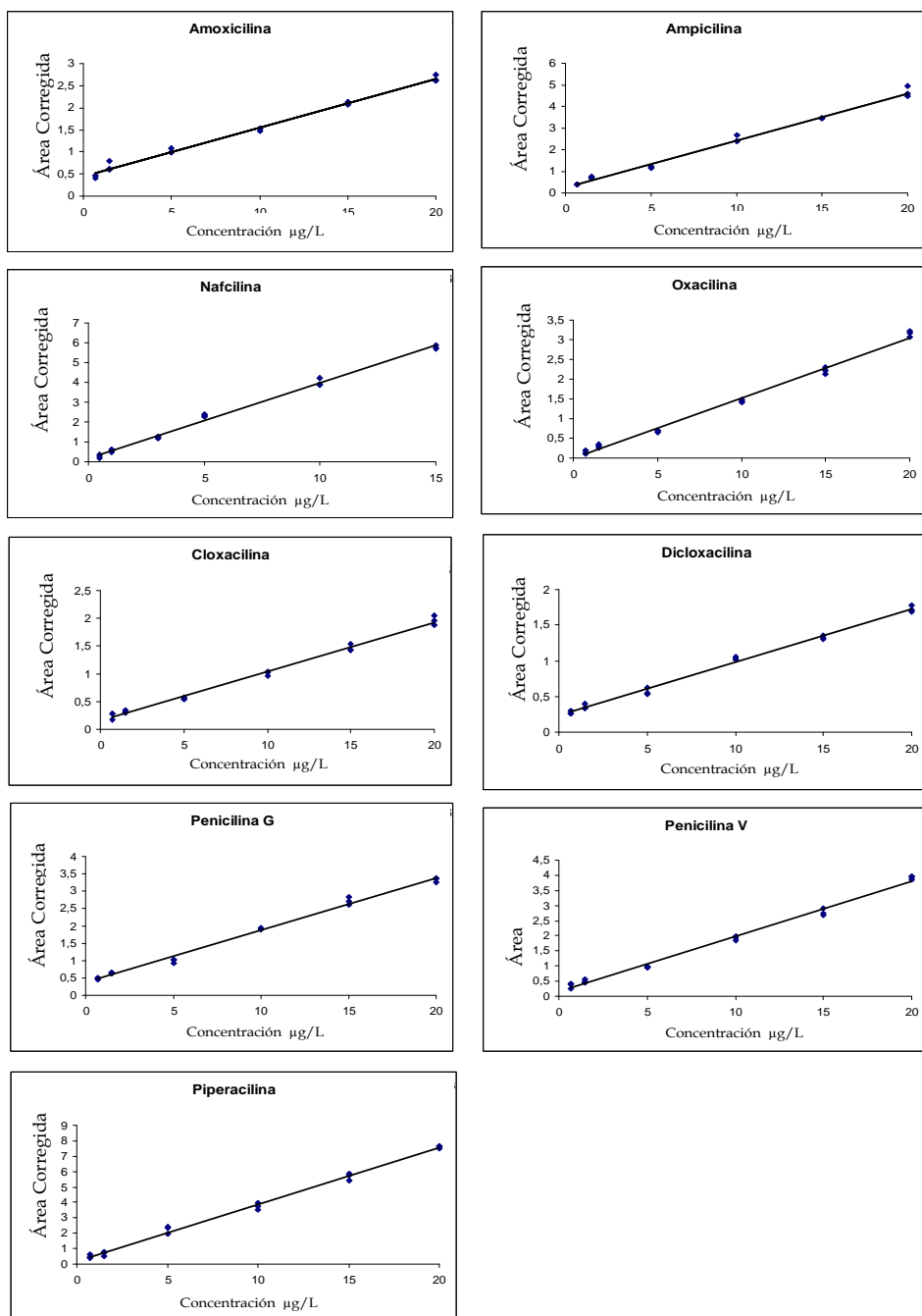


Tabla III-28. Rectas de calibrado en agua de pozo mediante CE-MS/MS

Tabla III-15. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para muestras de agua de pozo mediante CE-MS.*

	AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Ordenada	0.443	0.461	0.065	0.076	-0.047	0.139	0.067	-0.001	-0.087
Pendiente	0.387	0.441	0.172	0.327	0.196	0.487	0.218	0.223	0.308
R ² (%)	99.5	99.3	99.4	99.3	99.2	99.2	99.6	99.2	99.4
LOD ^a ($\mu\text{g/L}$)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	0.7	0.7	0.8
LOQ ^b ($\mu\text{g/L}$)	2.3	2.3	2.3	2.4	2.3	1.5	1.8	2.0	2.5
Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	0.8-20	0.8-20	0.8-20	0.8-20	0.8-20	0.6-20	0.7-20	0.7-20	0.8-20

(a): Tres veces la relación señal/ruido.

(b): Diez veces la relación señal/ruido.

Tabla III-16. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para muestras de agua de pozo para CE-MS/MS.*

	AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Ordenada	0.435	0.251	0.154	0.230	-0.003	0.175	0.362	0.163	0.216
Pendiente	0.111	0.217	0.089	0.075	0.153	0.378	0.151	0.181	0.367
R ² (%)	99.2	99.2	99.2	99.4	99.3	99.5	99.3	99.3	99.5
LOD (µg/L)	0.25	0.24	0.26	0.25	0.26	0.18	0.25	0.23	0.25
LOQ (µg/L)	0.68	0.69	0.70	0.70	0.70	0.60	0.68	0.67	0.69
Rango lineal (µg/L)	0.25-20	0.24-20	0.26-20	0.25-20	0.26-20	0.18-15	0.25-20	0.23-20	0.25-20

(a): Tres veces la relación señal/ruido.

(b): Diez veces la relación señal/ruido.

5.4.2.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se estudió en un solo día por medio de tres aplicaciones repetitivas del procedimiento de tratamiento de muestra a tres muestras diferentes (réplicas experimentales) a cada nivel de concentración. Se seleccionaron dos niveles, 10 y 20 $\mu\text{g/L}$, para el estudio en CE-MS y tres niveles para CE-MS/MS, correspondientes a 0.7, 10 y 20 $\mu\text{g/L}$. La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos (tres inyecciones por día) con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se muestran en Tabla III-17 para CE-MS y Tabla III-18 para CE-MS/MS.

Tabla III-17. Estudio de la precisión del método propuesto para muestras de agua de pozo CE-MS.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOXA	DICLOX	PENV	PIPE
Intradía (n=9)									
10 µg/L DER (%)	4.3	3.9	4.1	4.4	5.0	5.1	4.9	4.8	4.9
20 µg/L DER (%)	4.4	4.1	4.6	4.2	5.0	4.8	4.7	4.3	4.1
Tiempo migración (min)	15.3	6.9	17.6	7.5	16.8	16.0	15.6	19.7	21.6
DER (%)	1.0	1.2	0.9	1.0	1.1	0.9	0.8	0.9	1.0
Interdía (n=15)									
10 µg/L DER (%)	4.9	4.7	5.1	4.6	5.6	5.8	5.9	5.2	5.3
20 µg/L DER (%)	5.1	5.7	5.7	5.0	5.5	5.6	5.3	5.1	5.7
Tiempo migración (min)	15.4	6.6	17.7	7.7	16.9	16.2	15.8	19.8	21.9
DER (%)	2.3	2.4	3.2	2.8	1.8	1.7	3.4	2.9	3.0

Tabla III-18. Estudio de la precisión del método propuesto para muestras de agua de pozo CE-MS/MS.

	NAFCI	AMOX	PENG	AMPI	OXA	CLOXA	DICLOX	PENV	PIPE
Intradía (n=9)									
0.7 $\mu\text{g/L}$ DER (%)	4.2	4.4	3.4	3.5	4.9	5.1	4.3	4.4	4.7
10 $\mu\text{g/L}$ DER (%)	3.6	4.8	4.5	3.9	4.7	4.8	4.7	3.9	4.8
20 $\mu\text{g/L}$ DER (%)	4.8	4.3	4.4	3.3	4.9	4.7	4.9	4.5	4.3
Tiempo migración (min)	15.0	6.7	17.2	7.1	16.2	15.7	15.1	19.5	20.5
DER (%)	0.6	0.5	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	0.7	0.6
Interdía (n=15)									
0.7 $\mu\text{g/L}$ DER (%)	4.7	4.9	4.4	4.8	3.8	5.7	5.3	4.9	4.8
10 $\mu\text{g/L}$ DER (%)	4.2	4.7	4.8	4.6	4.1	4.9	5.1	4.3	4.9
20 $\mu\text{g/L}$ DER (%)	4.9	5.1	5.1	4.9	4.9	6.1	4.9	3.8	5.3
Tiempo migración (min)	15.7	6.1	17.2	7.4	15.9	15.4	14.8	19.1	20.2
DER (%)	1.9	2.7	4.6	3.0	4.0	3.9	4.7	3.7	4.7

5.4.2.2.3. *Estudio de la veracidad*

Para estudiar la eficacia de los métodos propuestos y la ausencia de errores sistemáticos se llevaron a cabo estudios de recuperación en muestras de agua de pozo y río, dopadas a dos niveles de concentración (10 y 20 µg/L) para CE-MS y tres niveles (0.7, 10 y 20 µg/L) para CE-MS/MS. Se prepararon tres réplicas a cada nivel de concentración. Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando áreas de pico de muestras de agua de pozo y río dopadas antes del tratamiento de muestra con las áreas de pico de patrones a las mismas concentraciones.

Los resultados se muestran en la Tabla III-19 para el método CE-MS y en la Tabla III-20 para CE-MS/MS.

Tabla III-19. *Estudio de recuperación para cada antibiótico β-lactámico en muestras de agua de pozo y río mediante CE-MS.*

			AMOX	AMPI	CLOX	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Agua pozo	10 µg/L	R (%)	86	88	91	87	87	90	92	90	88
		DER (%)	3.2	4.0	4.0	3.9	3.9	4.9	3.1	4.1	3.8
	20 µg/L	R (%)	90	85	85	89	90	85	89	86	90
		DER (%)	2.9	3.3	4.9	5.0	4.4	2.9	4.0	4.0	3.1
Agua río	10 µg/L	R (%)	90	90	90	86	85	91	88	86	86
		DER (%)	4.1	5.1	4.0	4.5	3.5	4.0	2.9	4.7	4.2
	20 µg/L	R (%)	91	86	91	91	90	89	91	92	90
		DER (%)	3.1	4.8	4.8	4.9	4.2	3.1	3.9	3.9	3.9

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MASAS EN TÁNDEM

Tabla III-20. Estudio de recuperación para cada antibiótico β -lactámico en muestras de agua de pozo y río mediante CE-MS/MS.

			AMOX	AMPI	CLOXA	DICLOX	OXA	NAFCI	PENG	PENV	PIPE
Agua pozo	0.7 $\mu\text{g/L}$	R (%)	94	92	94	92	89	98	95	95	97
		DER (%)	1.9	3.5	2.7	3.4	4.0	2.8	3.9	3.5	2.3
	10 $\mu\text{g/L}$	R (%)	96	96	93	95	96	99	96	96	96
		DER (%)	2.4	3.0	3.5	2.8	4.1	2.1	3.0	3.6	3.1
	20 $\mu\text{g/L}$	R (%)	97	98	95	96	96	98	96	96	96
		DER (%)	2.9	2.7	3.0	3.2	3.9	3.3	3.5	3.9	3.8
Agua río	0.7 $\mu\text{g/L}$	R (%)	93	94	95	92	93	95	94	94	96
		DER (%)	3.4	3.8	2.4	4.6	3.9	3.7	3.1	3.8	2.7
	10 $\mu\text{g/L}$	R (%)	96	96	96	92	95	97	94	94	97
		DER (%)	3.2	4.0	4.2	4.0	4.6	3.5	3.4	3.8	3.7
	20 $\mu\text{g/L}$	R (%)	96	96	96	93	96	97	96	96	96
		DER (%)	2.9	3.1	3.9	4.5	3.7	2.2	4.2	4.1	4.1

Comparando los resultados se puede observar que las recuperaciones obtenidas empleando CE-MS (entre el 83 y 92%) son ligeramente inferiores a las obtenidas con CE-MS/MS (entre 89 y 97%).

Con objeto de garantizar la ausencia de los compuestos estudiados en esta matriz y evaluar el ruido se sometió una muestra sin fortificar (blanco de muestra) al procedimiento de tratamiento de muestra y posterior medida mediante CE-MS y CE-MS/MS. No se observaron picos que pudieran corresponder a los analitos ni otros compuestos interferentes que pudiesen comigrar con éstos. Las Figuras III-29 y III-30 muestra los electroferogramas en

CE-MS/MS obtenidos para ambos tipos de aguas, tanto dopadas con los analitos en estudio como de un blanco de matriz tratada.

De los estudios llevados a cabo en este capítulo se puede concluir indicando que el método CE-MS/MS propuesto constituye una alternativa real a los métodos cromatográficos con detección por espectrometría de masas utilizados normalmente para la monitorización de estos compuestos en alimentos de origen animal. El tratamiento de muestra propuesto combinado con la técnica analítica utilizada permite llegar a límites de detección por debajo de los LMRs establecidos en la legislación para garantizar el consumo seguro del alimento, además de conseguir mediante la detección por espectrometría de masas en tándem, una identificación inequívoca de los analitos al conseguir superar el mínimo número de puntos de identificación requeridos. Igualmente el factor de preconcentración alcanzado en el tratamiento de muestras de agua permite alcanzar los bajos límites de detección que se requieren para poder controlar estos residuos en este tipo de muestras ambientales.

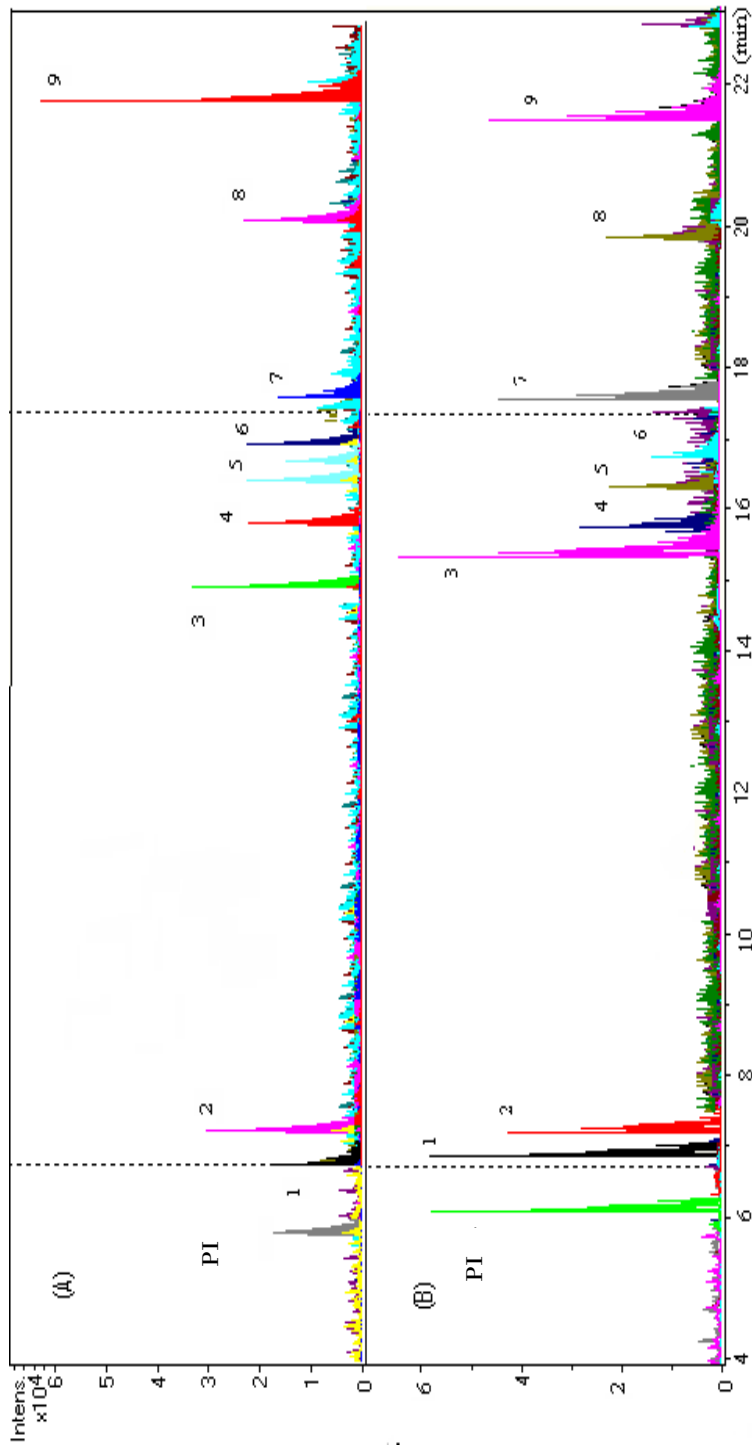


Figura III-29. Electroferogramas CE-MS/MS en condiciones óptimas obtenidas después del tratamiento de muestras de: (A) agua de pozo y (B) agua de río, dopadas con 3 $\mu\text{g/L}$ de NAFCI (4) y 5 $\mu\text{g/L}$ del resto de antibióticos β -lactámicos y 500 $\mu\text{g/L}$ de LOME (PI). 1. AMOX, 2. AMPI, 3. NAFCI 4. DICLOX, 5. CLOX, 6. OXA, 7. PENG, 8. PENIV, 9. PIPE.

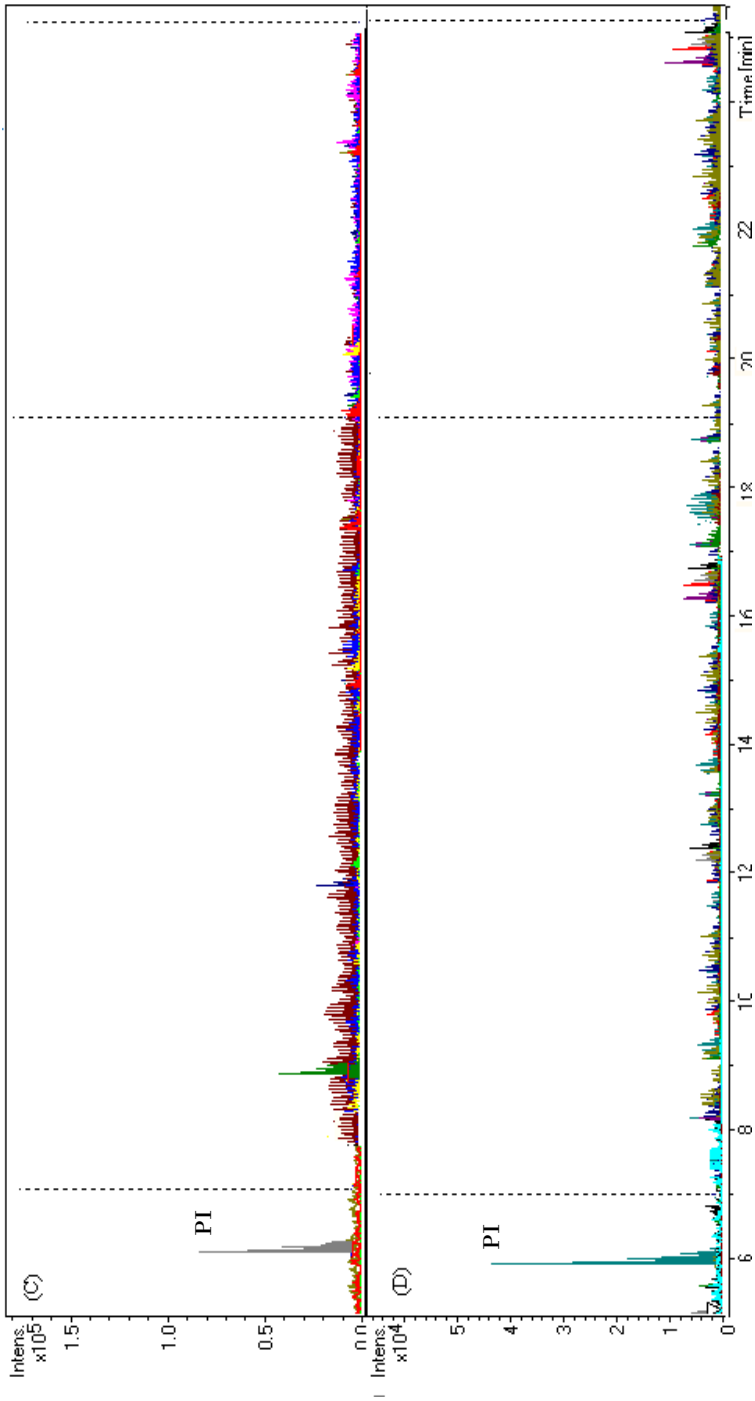


Figura III-30. Electroferogramas CE-MS/MS en condiciones óptimas obtenidas después del tratamiento de muestras de agua sin dopar: (A) agua de pozo y (B) agua de río.

CAPÍTULO IV

“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN
MUESTRAS AMBIENTALES Y DE ALIMENTOS, MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN”

1. INTRODUCCIÓN

Este capítulo muestra la aplicabilidad de la cromatografía líquida capilar de alta resolución (HPLC capilar) en el análisis de trazas de diez antibióticos β -lactámicos, incluyendo el ácido clavulánico, antibiótico que se utiliza en los fármacos mezclado con amoxicilina, ampicilina o con otros antibióticos β -lactámicos, para que inhiba la hidrólisis de este enlace. De esta forma los antibióticos son más estables y pueden actuar mejor contra las infecciones bacterianas, ya que el ácido clavulánico, como se comentó en la introducción, actúa como inhibidor de la β -lactamasa.

En este capítulo se pretende demostrar el potencial de esta técnica miniaturizada en el análisis de distintas matrices, como leche, carne de pollo y aguas naturales, usando la detección UV-Vis.

Los métodos cromatográficos descritos en bibliografía para el análisis de antibióticos β -lactámicos mediante detección UV-Vis son limitados en cuanto a sensibilidad [271,272] y por tanto difíciles de aplicar a alimentos de origen animal al nivel de los LMRs legislados por la Unión Europea [273] o a muestras medioambientales, como aguas. En algún caso se ha empleado una reacción de derivatización con objeto de mejorar los límites de detección, usando reactivos

[271] K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miayazaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 205.

[272] E. Benito-Peña, A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 415.

[273] 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.

tóxicos [274]. Recientemente se ha desarrollado un método cromatográfico para la determinación de ocho antibióticos β -lactámicos en diversos tipos de aguas mediante detección UV-Vis sin necesidad de derivatización y usando un proceso de preconcentración mediante SPE [272]. En nuestro caso, el método de análisis propuesto para los diez antibióticos seleccionados se basa igualmente en la medida directa de absorbancia, sin reacción de derivatización previa, pero usando cromatografía líquida capilar. Mediante una adecuada etapa de preconcentración y aprovechando las ventajas de este tipo de cromatografía se pretende alcanzar límites de detección suficientemente bajos como para detectar residuos de estos compuestos en aguas o en alimentos, a niveles inferiores a los LMRs establecidos.

Con este objetivo se ha llevado a cabo la separación y cuantificación de los siguientes antibióticos β -lactámicos: ampicilina (AMPI), amoxicilina (AMOX), penicilina V (PENV), penicilina G (PENG), cloxacilina (CLOXA), oxacilina (OXA), dicloxacilina (DICLOX), nafcilina (NAFCI), piperacilina (PIPE) y ácido clavulánico (CLAV) mediante HPLC capilar con detección UV-Vis, técnica que, según la bibliografía consultada, es la primera vez que se ha aplicado al análisis de esta familia de antibióticos.

Para el desarrollo de este método se siguieron los siguientes pasos:

- Optimización de la separación cromatográfica.
- Rectas de calibrado y parámetros de calidad.
- Aplicación del método a la determinación de los diez antibióticos en leche cruda de vaca.
- Aplicación del método a la determinación de los diez antibióticos en carne de pollo.

[274]L.K. Sorensen, B.M. Rasmussen, J.O. Boison, L.Keng, *J. Chromatogr. B*, 694 (1997) 383.

- Aplicación del método a la determinación de los diez antibióticos en aguas naturales.

2. REACTIVOS, DISOLUCIONES, MATERIAL Y MUESTRAS

Todos los reactivos y disolventes usados fueron de grado HPLC. Los disolventes orgánicos: acetonitrilo (ACN) y metanol, fueron suministrados por Panreac (Madrid, España). El ácido trifluoroacético (TFA) fue suministrado por Merck (Darmstad, Alemania). Los analitos AMOX, AMPI, NAFCI, CLOX, DICLOX, OXA, PENG, PENV, PIPE y CLAVU y el ácido p-aminobenzoico (PABA), usado como patrón interno (PI), fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU).

El agua utilizada (18.2 M Ω /cm) se desionizó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

Los cartuchos utilizados en la extracción en fase sólida fueron: Oasis® HLB con contenido hidrofílico-lipofílico (60 mg, 3 mL) suministrados por Waters (Milford, MA, USA) y Alúmina N, elaborados en el laboratorio (500 mg, 3 mL, E. Merck, Darmstad, Alemania). Los filtros de membrana de PTFE de 0.2 μ m, utilizados para filtrar los disolventes y las muestras de agua, fueron suministrados por Millex-GN, Millipore, (Bedford, MA, USA).

Las columnas cromatográficas usadas en el trabajo experimental fueron: Zorbax SB-C18 (150 x 0.5 mm) con un tamaño de partícula de 5 μ m, suministrada por Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) y Luna-C18 (2) (150 x 0.5 mm) de tamaño de partícula 5 μ m, de Phenomenex (Torrance, CA, EEUU).

Las disoluciones patrón (1000 mg/L) de cada analito se prepararon disolviendo la cantidad adecuada en agua desionizada. Estas disoluciones se almacenan en refrigerador en frasco topacio, preservándolas de la luz. Bajo estas

condiciones fueron estables durante al menos dos meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon antes de la medida, diluyendo alícuotas de las anteriores con agua desionizada.

La leche utilizada en el estudio fue leche cruda de vaca, suministrada por una granja local situada en Guadix (Granada, España) y la carne de pollo se adquirió en un supermercado local (Granada, España).

Las aguas utilizadas para validar el método fueron: agua de río, recogida del río Fardes en Guadix (Granada, España) y agua subterránea obtenida de un pozo situado en Guadix (Granada, España).

3. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

El método cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido capilar de alta resolución Agilent HP-1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria (con un caudal de flujo máximo de 20 μL), desgasificador, automuestreador (bucle de 8 μL), columna termostatzada y detector de diodos en fila (DAD). Los datos se trataron con el programa ChemStation version A.10.20.

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España).

En el tratamiento de muestra se empleó una picadora de cocina (Taurus, Barcelona, España) para triturar las muestras de músculo de pollo.

Para la extracción en fase sólida (SPE) se usó un dispositivo de vacío VacElut provisto de 20 posiciones de extracción, suministrado por Supelco (Park Bellefonte, EEUU).

Se utilizaron los programas Excel (Microsoft) y StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD) para procesar los datos.

4. PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO PROPUESTO

Para llevar a cabo la separación cromatográfica de los diez antibióticos β -lactámicos se empleó la columna Luna C18 (2), descrita anteriormente. Se usó un programa de gradiente para la fase móvil, donde se combinaba disolvente A (agua Milli-Q con 0.01% de TFA) y disolvente B (acetonitrilo con 0.01% de TFA), según la secuencia que se indica a continuación: 5% B (0 min), 5-60% B (8 min), 60% B (18 min). La velocidad de flujo usada fue de 14 μ L/min. La columna se mantuvo a una temperatura de 25 °C. El volumen inyectado fue de 7 μ L, y el tiempo necesario para eluir todos los analitos fue de 16 minutos aproximadamente. Se seleccionó como longitud de onda a la que monitorizar los compuestos 220 nm, con un ancho de banda de 16 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS

En primer lugar, y con objeto de conseguir una alta sensibilidad y resolución, a la vez que un método suficientemente preciso, se procedió a la optimización de todas las variables influyentes del sistema cromatográfico, tanto experimentales como instrumentales.

Como criterio para seleccionar los valores óptimos de las variables en estudio se consideraron tanto la resolución de los diferentes picos como el área de pico y el tiempo de análisis. Para el estudio se usó inicialmente una columna Zorbax-SB C18 (150 cm \times 0.5 mm, 5 μ m) como fase estacionaria, manteniéndose a una temperatura de 35 °C.

5.1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA Y EL GRADIENTE DE LA FASE MÓVIL

El estudio de la naturaleza de la fase móvil se llevó a cabo partiendo de las condiciones establecidas en un trabajo previo [275] en el que se propone la determinación de ocho antibióticos β -lactámicos en aguas residuales, mediante HPLC en fase inversa usando una columna C18 y detección UV-DAD, realizando una elución por gradiente con fase móvil consistente en agua con un porcentaje de TFA y acetonitrilo.

En nuestro estudio se ensayaron, en modo isocrático, las siguientes fases móviles, usando una disolución mezcla de los diez antibióticos β -lactámicos con una concentración de 1 mg/L para cada analito:

1.A: agua, B: acetonitrilo

2.A: agua + 0.01% TFA, B: ACN + 0.01% TFA

3.A: agua + 0.01% TFA + 1% 2-propanol, B: ACN + 0.01% TFA + 1% 2-propanol.

Los mejores resultados correspondieron a la fase móvil consistente en: A: Agua + 0.01% TFA y B: ACN + 0.01% TFA.

Una vez decidida la naturaleza de la fase móvil, y antes de optimizar el programa de gradiente, estudiamos el porcentaje de TFA. Con este propósito se estudió un rango comprendido entre 0.005% - 0.1% de TFA tanto en agua como en ACN.

[275] E. Benito-Peña, A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 415.

A continuación la Figura IV-1 muestra algunos de los cromatogramas obtenidos empleando distintos porcentajes de TFA en la fase móvil. De los resultados obtenidos se observa que el porcentaje óptimo de TFA era del 0.01% tanto para el agua como para el acetonitrilo.

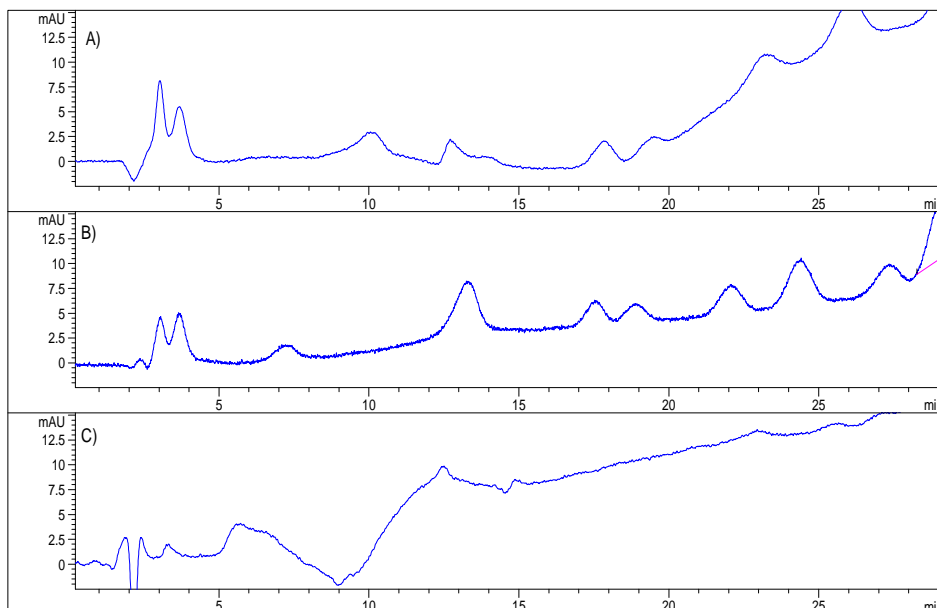


Figura IV-1. Cromatogramas obtenidos en la optimización del porcentaje de TFA. A) A: agua + 0.005% TFA, B: acetonitrilo + 0.005 % TFA, B) A: agua + 0.01% TFA, B: ACN + 0.01% TFA, C) A: agua + 0.05% TFA, B: ACN + 0.05% TFA.

El siguiente paso fue optimizar el programa de gradiente. Así, con objeto de separar los diez antibióticos β -lactámicos seleccionados en el menor tiempo posible, se probaron distintos gradientes, modificando el intervalo de tiempo en el que se aumentaba el porcentaje de B. Con esto conseguíamos acortar el tiempo de análisis y mejorar la resolución de los picos. Como resultado se observó que empezando con un alto porcentaje de A (95%) y aumentando progresivamente el porcentaje de B, hasta los 30 minutos, donde alcanzábamos un 50%, se conseguían eluir todos los analitos, obteniendo picos que

presentaban una buena resolución. El tiempo de análisis fue relativamente largo, en torno a 40 minutos. Los cromatogramas obtenidos para algunos de los gradientes ensayados se muestran en la figura IV-2.

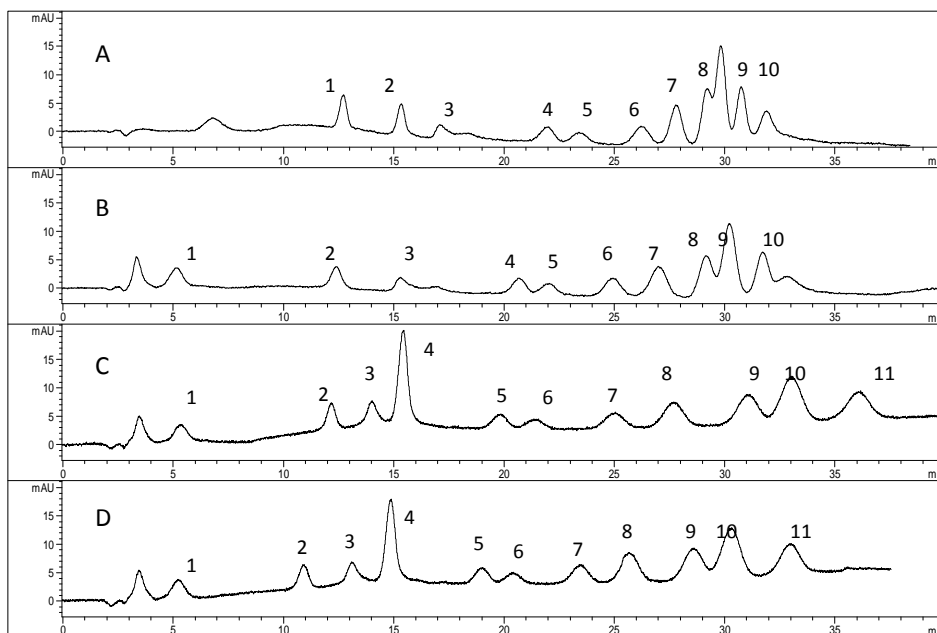


Figura IV-2. Estudio de diferentes gradientes: A) 10% B (2 min), 10-30% B (10 min), 30-40% B (20 min), 70% B (30 min). B) 10% B (2 min), 10-30% B (6 min), 30-35% B (17 min), 35-50% B (30 min). C) 10% B (2 min), 10-30% B (8 min), 30-50% B (30 min). D) 5% B (0 min), 0-30% B (8 min), 30-50% B (30 min). Mezcla de 1 mg/L para cada compuesto y 100 µg/L de PI: 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX

A la vista de los resultados, decidimos seleccionar el programa de gradiente que se recoge en la Tabla IV-1.

Tabla IV-1. Programa de gradiente seleccionado.

Tiempo (min)	% B (ACN+ 0.01% TFA)
0	5
8	30
30	50

5.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL CAUDAL DE LA FASE MÓVIL

Un parámetro importante optimizado en este punto fue el caudal de la fase móvil. Hasta ahora hemos estado trabajando con un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, por lo que el estudio se realizó entre 10 y 16 $\mu\text{L}/\text{min}$. No se probaron caudales menores ya que aumentaba el tiempo de análisis considerablemente, ni mayores para no forzar la bomba. Los resultados mostraban que al aumentar el caudal de la fase móvil mejoraba el tiempo de análisis desde 37 minutos hasta 27 minutos aproximadamente, sin empeorar la resolución de los picos, por lo que se seleccionó como caudal óptimo 14 $\mu\text{L}/\text{min}$. La Figura IV-3 muestra los cromatogramas obtenidos.

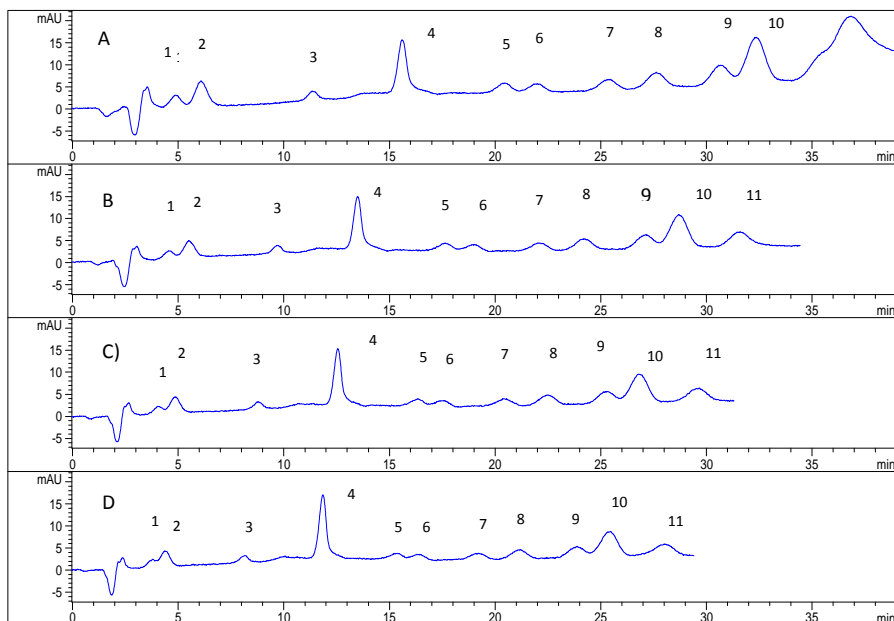


Figura IV-3. Optimización del caudal de la fase móvil. A) 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, B) 12 $\mu\text{L}/\text{min}$, C) 14 $\mu\text{L}/\text{min}$, D) 16 $\mu\text{L}/\text{min}$. Mezcla de 1 mg/L para cada compuesto y 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de PI: 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX

5.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA

En esta etapa de optimización de la separación, se modificó la temperatura de la columna en un intervalo comprendido entre 20 y 38°C. Se observó que la variación de temperatura no influía demasiado ni en la señal ni en la resolución de los picos, por lo que se seleccionó una temperatura de 25°C, próxima a la temperatura ambiente. A continuación la Figura IV-4, muestra algunos de los cromatogramas obtenidos en el estudio.

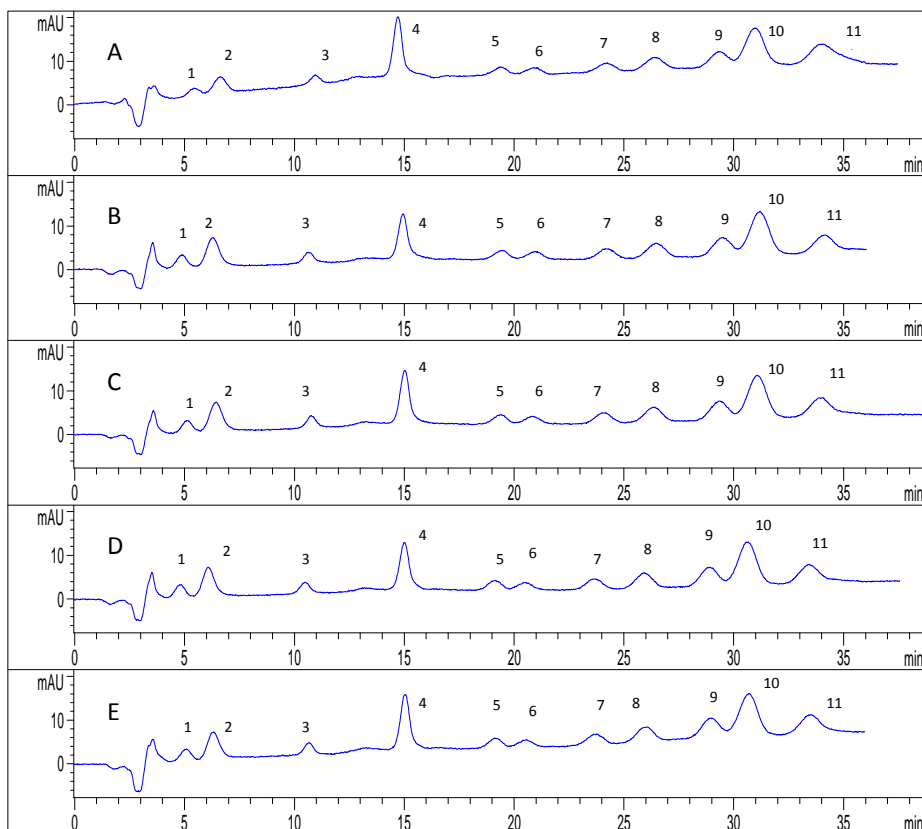


Figura IV-4. Cromatogramas obtenidos en el estudio de la temperatura de la columna. A) 20°C, B) 25°C, C) 30°C, D) 35°C, E) 38°C. Mezcla de 1 mg/L para cada antibiótico β -lactámico y 100 μ g/L de PI: 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX

5.1.4. EMPLEO DE LA COLUMNA LUNA C18

Hasta ahora, la optimización de variables se ha llevado a cabo utilizando como fase estacionaria una columna Zorbax SB-C18 (150 x 0.5 mm, 5 μ m), disponible inicialmente en nuestro laboratorio. Sin embargo no se observó una sensibilidad y forma de picos muy adecuada. Considerando las características

de las columnas Luna [276], que teóricamente pueden proporcionar una mejora sustancial tanto en la resolución como en la forma de los picos debido no solamente a la pureza de la sílice empleada (99.99%) sino al estricto control de calidad de la rugosidad superficial de las partículas, estructura de poro y consistencia para garantizar una estructura uniforme y de fortaleza mecánica aumentada, lo que puede ocasionar una elevada estabilidad del relleno, se decidió probar una columna Luna C18 (2) (150 x 0.5 mm, 5 μ m).

En la Figura IV-5 se muestra un cromatograma de una mezcla de los analitos en estudio a las condiciones óptimas, usando ambos tipos de columnas. Como puede observarse, la morfología de los picos mejora considerablemente, así como la resolución e incluso el tiempo de análisis. Se decide usar a partir de ahora esta nueva fase estacionaria dados los resultados obtenidos.

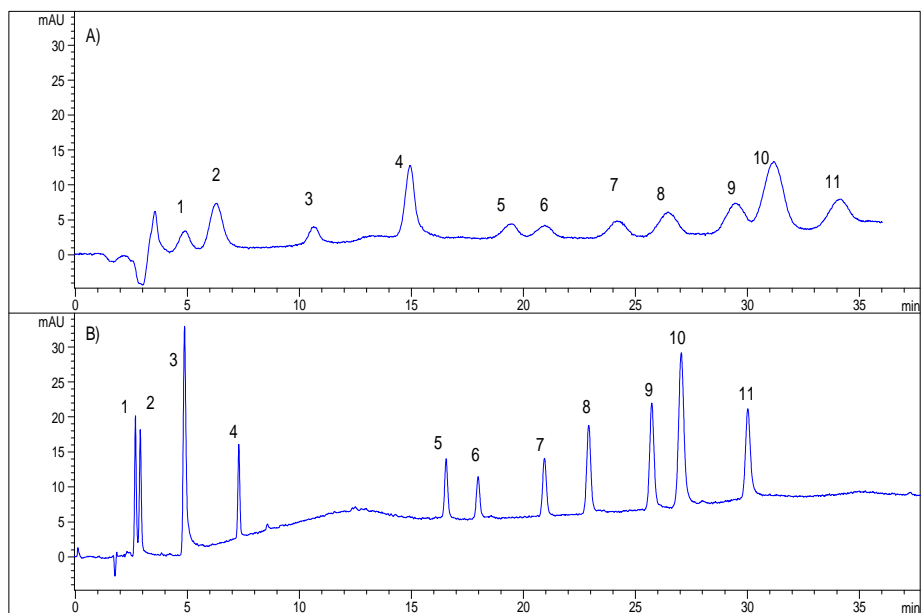


Figura IV-5. Cromatogramas obtenidos con las columnas ensayadas. A) Columna Zorbax SB-C18 (150 x 0.5 mm, 5 μ m) B) Luna-C18 (2) (150 x 0.5 mm, 5 μ m). Mezcla de 1 mg/L para cada compuesto y 100 μ g/L de PI.1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCI, 11. DICLOX

[276] <http://www.phenomenex.com/products/industry.aspx?id=162>

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

Teniendo en cuenta que con esta columna obtuvimos picos bastante más estrechos, consideramos que modificando el programa de gradiente aplicado podría acortarse el tiempo de análisis. Así, podemos aumentar de forma más rápida el porcentaje de B, consiguiendo disminuir el tiempo de elución de los analitos sin perjudicar la resolución.

En la Figura IV-6 se muestran los cromatogramas correspondientes a los distintos gradientes aplicados en este estudio. Finalmente se decidió seleccionar el programa de gradiente consistente en: 5 % B (0 min), 60 % B (8 min).

De esta forma se consigue disminuir drásticamente el tiempo de análisis (de 37 min a 16 min, aproximadamente).

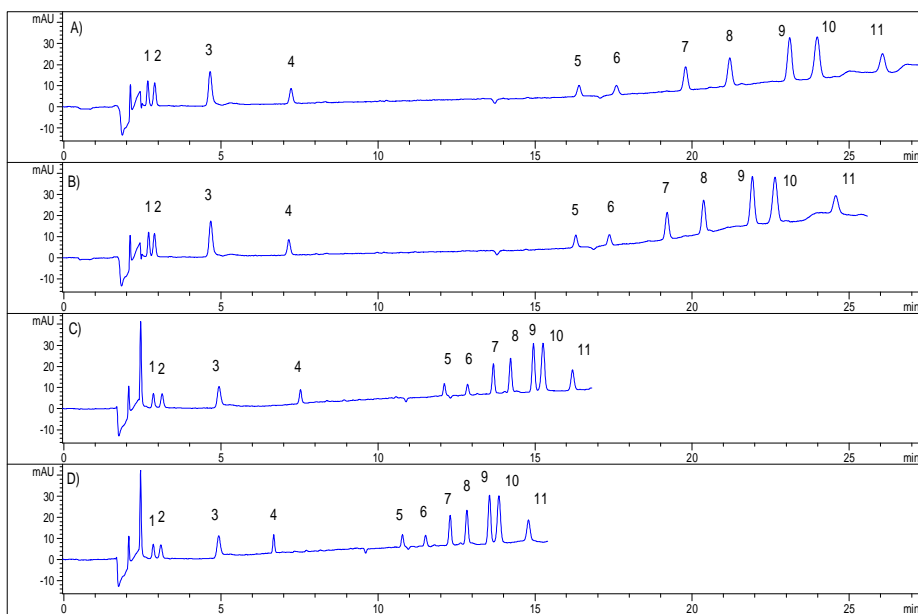


Figura IV-6. Cromatogramas obtenidos con distintos programas de gradiente. A) 5% B (0 min), 5-30% B (8 min) y 30-50% B (30 min); B) 10% B (0 min), 10-30% B (8 min) y 30-50% B (13 min); C) 10% B (0 min), 0-15% B (2 min), 15-60% B (10 min); D) 5% B (0 min), 60% B (8 min). 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX. Mezcla de 1 mg/L para cada antibiótico y 100 μ g/L para PI.

5.1.5. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN

Para optimizar la cantidad de muestra inyectada, se probaron diferentes volúmenes, entre 1 y 7 μL . Los resultados mostraron un aumento de la sensibilidad al aumentar el volumen, sin disminuir la resolución de los picos, seleccionándose finalmente un volumen de inyección óptimo de 7 μL , que es el límite impuesto por la columna.

La Figura IV-7, muestra los cromatogramas obtenidos en el estudio del volumen de inyección.

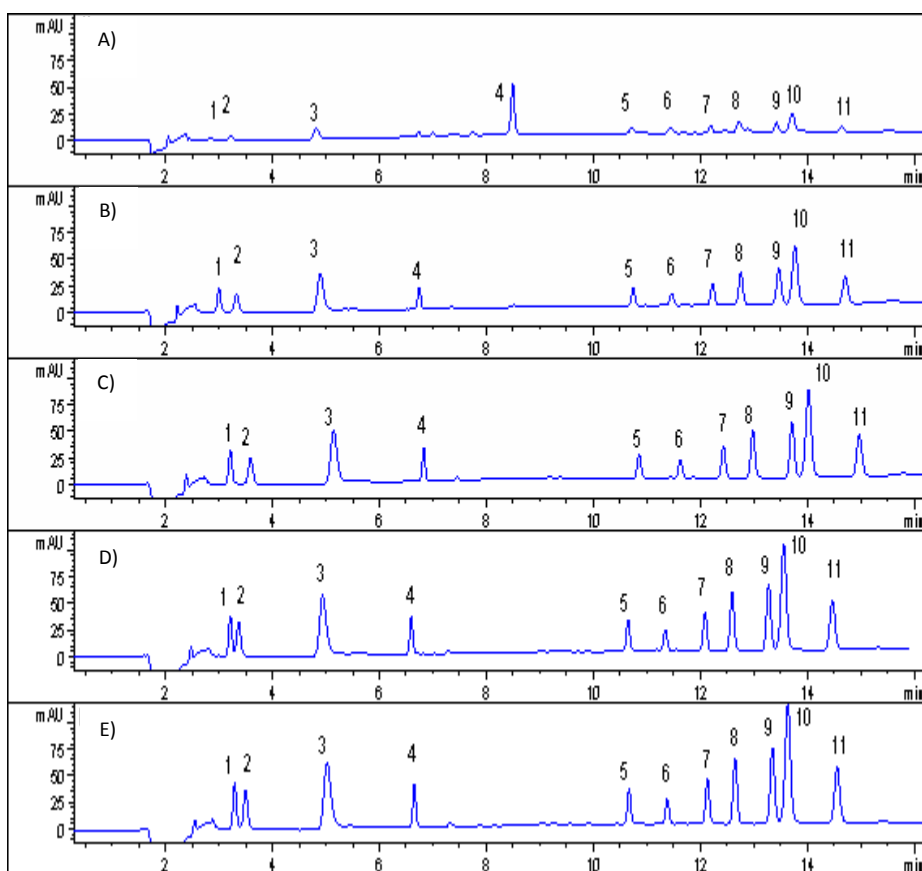


Figura IV-7. Optimización del volumen de inyección de muestra. Volumen inyección: A) 1 μL , B) 2 μL , C) 3 μL , D) 5 μL y E) 7 μL . Mezcla de 1 mg/L para cada compuesto y 100 $\mu\text{g/L}$ de PI: 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX

A continuación se muestran los valores óptimos obtenidos para la separación cromatográfica (Tabla VI-2) y un cromatograma obtenido a las condiciones óptimas y a una concentración 20 veces inferior para los compuesto estudiados y para el PI (50 $\mu\text{g/L}$) a las de los estudios anteriores, debido al aumento de sensibilidad que es posible alcanzar con esta columna (Figura IV-8).

Tabla IV-2. Valores óptimos para la separación

Columna	Luna-C18 (2) (150 x 0.5 mm, 5 μm)
Temperatura columna	25 $^{\circ}\text{C}$
Volumen de inyección	7 μL
Composición fase móvil	A: Agua con 0.01 % TFA B: Acetonitrilo con 0.01 % TFA
Gradiente	5 % B (0 min) 60 %B (8 min)
Caudal fase móvil	14 $\mu\text{L}/\text{min}$
Longitud de onda	220 nm

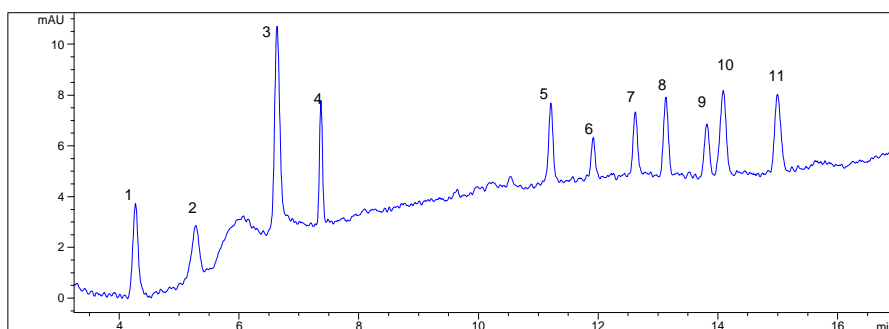


Figura IV-8. Cromatograma de una mezcla de los diez antibióticos β -lactámicos a una concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ de cada uno y 50 $\mu\text{g/L}$ de PI 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCI, 11. DICLOX

5.2. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

5.2.1. RECTAS DE CALIBRADO

La linealidad de la respuesta se comprobó a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/L para AMOX, AMPI, CLAVU, PIPE, PENG, DICLOX, OXA, PENV y CLOXA y 25, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/L para NAFCl. Se empleó PABA como patrón interno con objeto de conseguir una mayor reproducibilidad en las señales y en los tiempos de migración. En todos los casos la concentración empleada fue 50 µg/L.

Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado. Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico relativas corregidas (relación entre el área de pico del analito dividida por el tiempo de migración y el área del patrón interno dividida por el tiempo de migración) en función de la concentración de cada analito. La representación gráfica de las rectas de calibrado se muestra en la Figura IV-9.

Los parámetros estadísticos calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla IV-3. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman una linealidad satisfactoria en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

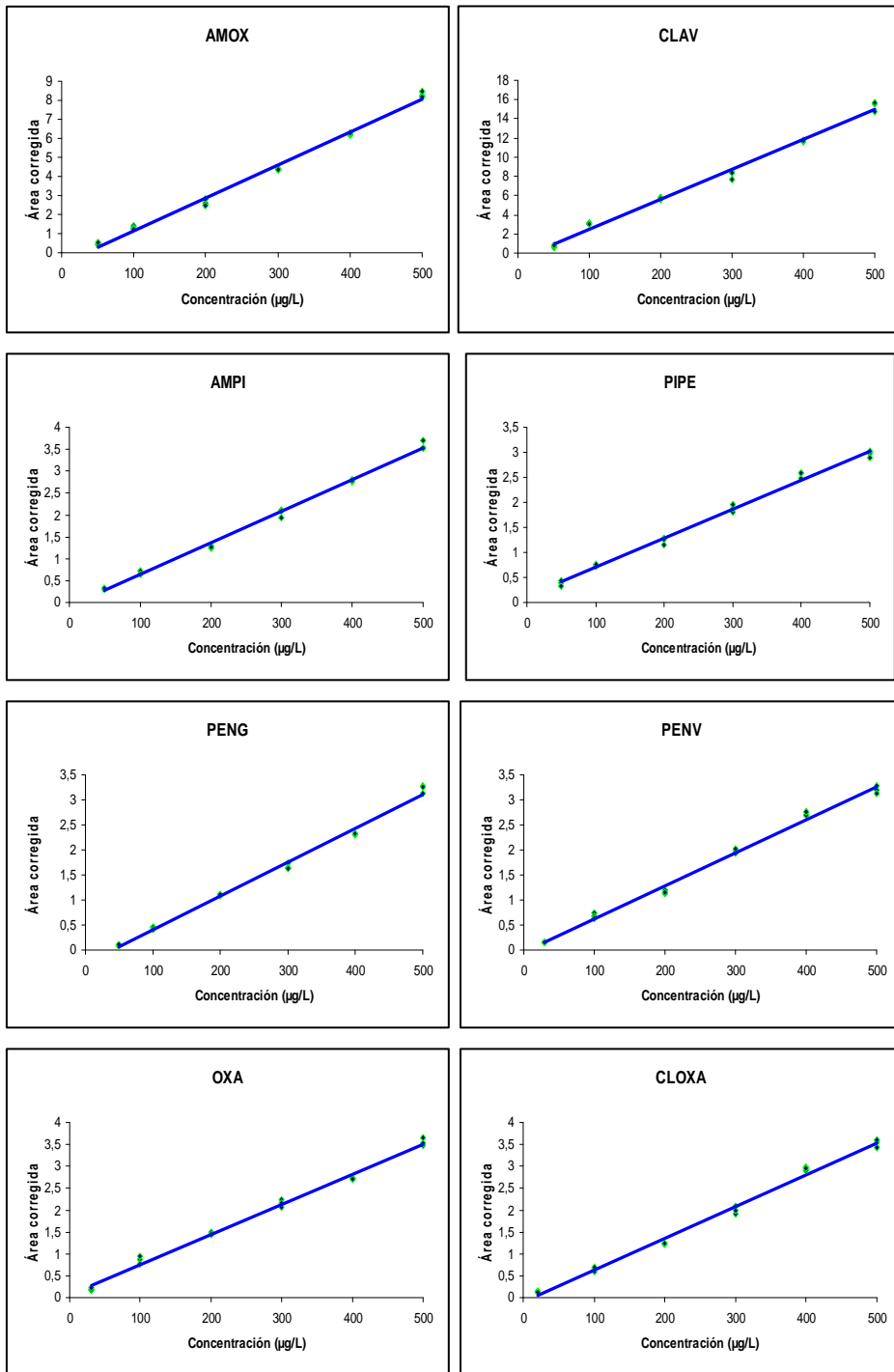


Figura IV-9. Rectas de calibrado de los compuestos en estudio.

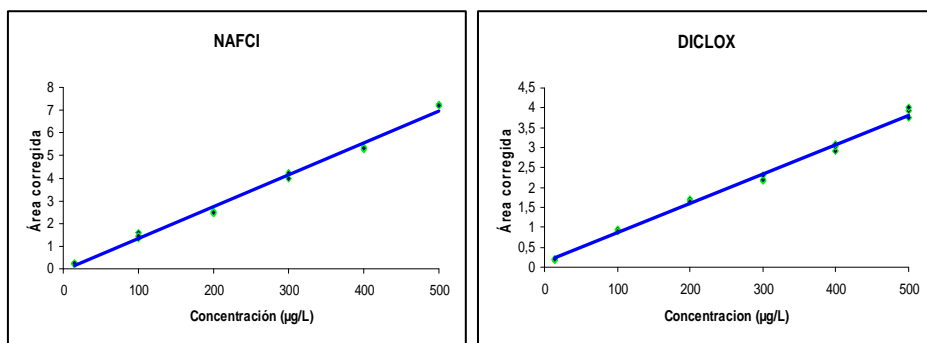


Figura IV-9 (Cont). Rectas de calibrado de los compuestos en estudio.

Tabla IV-3. Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto.

	Rango lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD ^a (µg/L)	LOQ ^b (µg/L)
AMPI	12.0-500	-0.095	0.007	99.6	12.0	40
AMOX	14.4-500	-0.556	0.017	99.4	14.4	48
PENG	11.1-500	-0.268	0.007	99.4	11.1	37
PENV	14.4-500	-0.040	0.007	99.4	14.4	48
PIPE	10.5-500	0.118	0.006	99.3	10.5	35
NAFCI	6.0-500	-0.087	0.014	99.3	6.0	20
OXA	13.5-500	0.071	0.007	99.4	13.5	45
CLOXA	13.5-500	-0.089	0.007	99.3	13.5	45
DICLOX	14.4-500	0.110	0.007	99.4	14.4	48
CLAV	14.7-500	-0.589	0.031	99.7	14.7	49

(a) Tres veces la relación señal/ruido

(b) Diez veces la relación señal/ruido.

Como puede observarse, los bajos límites de detección obtenidos con este método de HPLC capilar con detección UV-Vis nos permitirán plantear su aplicación a muestras de alimentos de origen animal e incluso, empleando un procedimiento previo de preconcentración, a la determinación de estos residuos en aguas naturales.

5.2.1. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por medio de tres muestras (réplicas experimentales) a tres niveles de concentración, 50, 100 y 300 $\mu\text{g/L}$ para cada uno de los antibióticos en estudio, y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se dan en la Tabla IV-4. Como se puede comprobar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla IV-4. Resultados obtenidos en el estudio de precisión para el método propuesto.

	CLAV	AMOX	AMPI	PIPE	PENG	PENV	OXA	CLOXA	NAFCI	DICLOX
Intradía (n=9)										
50 µg/L DER (%)	4.4	4.2	5.2	3.7	4.3	4.8	4.3	6.1	5.2	4.6
100 µg/L DER (%)	5.1	4.7	4.7	4.3	3.9	5.1	4.1	5.7	4.9	4.0
300 µg/L DER (%)	5.3	4.1	4.4	4.9	4.0	5.2	4.7	5.8	5.0	4.1
Tiempo Migración (min)	4.7	5.5	9.0	11.0	11.7	12.4	12.8	13.0	14.0	15.3
DER (%)	4.8	4.2	4.6	4.3	3.7	4.7	4.3	5.5	4.8	4.2
Interdía (n=15)										
50 µg/L DER (%)	4.4	4.7	4.8	3.9	5.3	5.7	5.7	4.9	4.6	5.2
100 µg/L DER (%)	5.2	4.8	5.0	4.2	4.4	4.8	5.3	5.5	4.2	4.3
300 µg/L DER (%)	4.6	3.9	4.4	3.6	4.9	4.7	4.3	4.8	5.5	6.1
Tiempo Migración (min)	4.9	5.4	9.2	11.2	11.5	12.1	12.7	13.2	13.8	15.2
DER (%)	4.3	4.1	4.7	3.3	4.7	3.8	4.7	4.8	5.0	5.0

5.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA, CARNE DE POLLO Y AGUAS

Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado en muestras reales, se escogieron muestras de alimentos de origen animal como leche de vaca y carne de pollo y de tipo medioambiental como aguas naturales, concretamente agua de río y de pozo.

5.3.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE DE VACA

La leche seleccionada para su estudio fue leche cruda de vaca suministrada por una granja local, situada en Guadix (Granada, España).

5.3.1.1. Tratamiento de las muestras

El tratamiento propuesto para este tipo de muestras se basó en el procedimiento ya optimizado en el capítulo II. Este método consiste en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo (ACN) y posterior uso de la extracción en fase sólida (SPE) con objeto de preconcentrar los analitos y limpiar la muestra. Para ello se utilizó un tándem de cartuchos de extracción: HLB Oasis® (60 mg, 3 mL) y Alúmina N (500 mg, 3 mL).

A continuación se recoge el tratamiento de muestra propuesto para la extracción, preconcentración y limpieza:

1. Se toman 5 mL de leche cruda de vaca, en un tubo de centrifuga (40 mL).
2. Se añaden 5 mL de acetonitrilo y se agita 1 min en vortex.
3. Se añaden 10 mL más de acetonitrilo y se agita 1 min en vortex.

4. Se centrifuga a 1800 rpm durante 5 minutos.
5. El sobrenadante se lleva a casi sequedad (0.5 mL aprox.) en corriente de nitrógeno.
6. Se recompone con 3 mL de disolución tampón fosfato de pH 8.5.
7. Se pasa la muestra a través de los cartuchos HLB Oasis, sin usar vacío, previamente activados con:
 - 5 mL de metanol
 - 5 mL de acetonitrilo
 - 5 mL de agua Milli-Q
 - 3 mL de disolución tampón fosfato pH 8.5.
8. Los compuestos en estudio se eluyen con 6 mL de ACN a una velocidad de 1 – 2 mL/min empleando bomba de vacío.
9. El eluato se pasa a través de un cartucho de Alúmina N, previamente activado con:
 - 5 mL de agua Milli-Q
 - 5 mL de acetonitrilo, a una velocidad de 1 mL/min.
10. Se eluye con 3 mL de agua MilliQ
11. Se evapora en corriente de nitrógeno.
12. Se reconstituye con 0.5 mL de agua Milli-Q, añadiendo el patrón interno (PABA, 50 µg/L) y se somete éste al análisis mediante el método propuesto (Ver Figura IV-10).

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

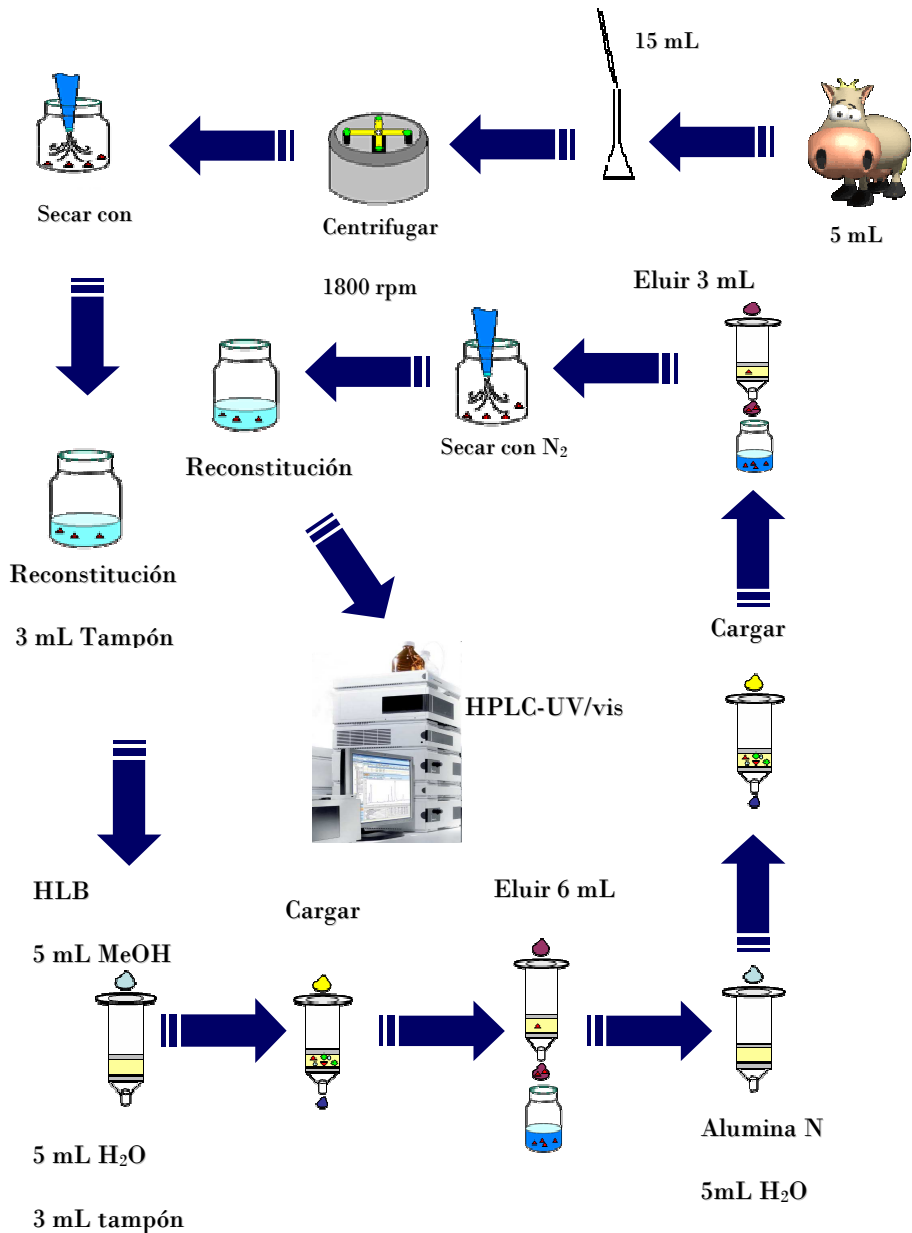


Figura IV-10. Esquema del tratamiento de muestra para el análisis de antibióticos β -lactámicos y ácido clavulánico en leche por el método propuesto.

5.3.1.2. Validación del método para el análisis de muestras de leche

El método analítico propuesto para el análisis de estos residuos en muestras de leche se validó en términos de linealidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), precisión y veracidad.

5.3.1.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

Se construyeron las correspondientes rectas de calibrado en presencia de matriz, concretamente leche de vaca sin tratar, libre de los compuestos en estudio y fortificadas antes del tratamiento, con concentraciones crecientes. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de cinco niveles de concentración correspondientes a 5, 15, 25, 50, 100 $\mu\text{g/L}$ para AMOX, AMPI, CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, PENV, PIPE, NAFCI y CLAV. En todos los casos, 50 $\mu\text{g/L}$ de PABA (PI) se añadieron durante la etapa de reconstitución del extracto, antes de la medida. Se prepararon tres muestras a cada nivel de concentración. Las funciones de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas corregidas (Figura IV-11).

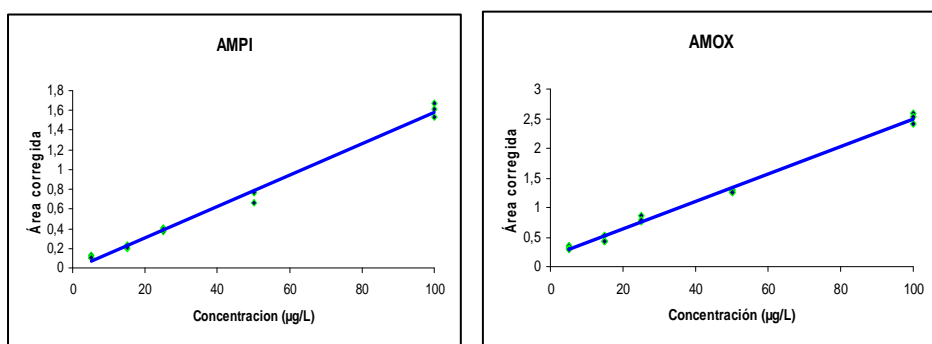


Figura IV-11. Rectas de calibrado obtenidas para los antibióticos β -lactámicos seleccionados en muestras de leche.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

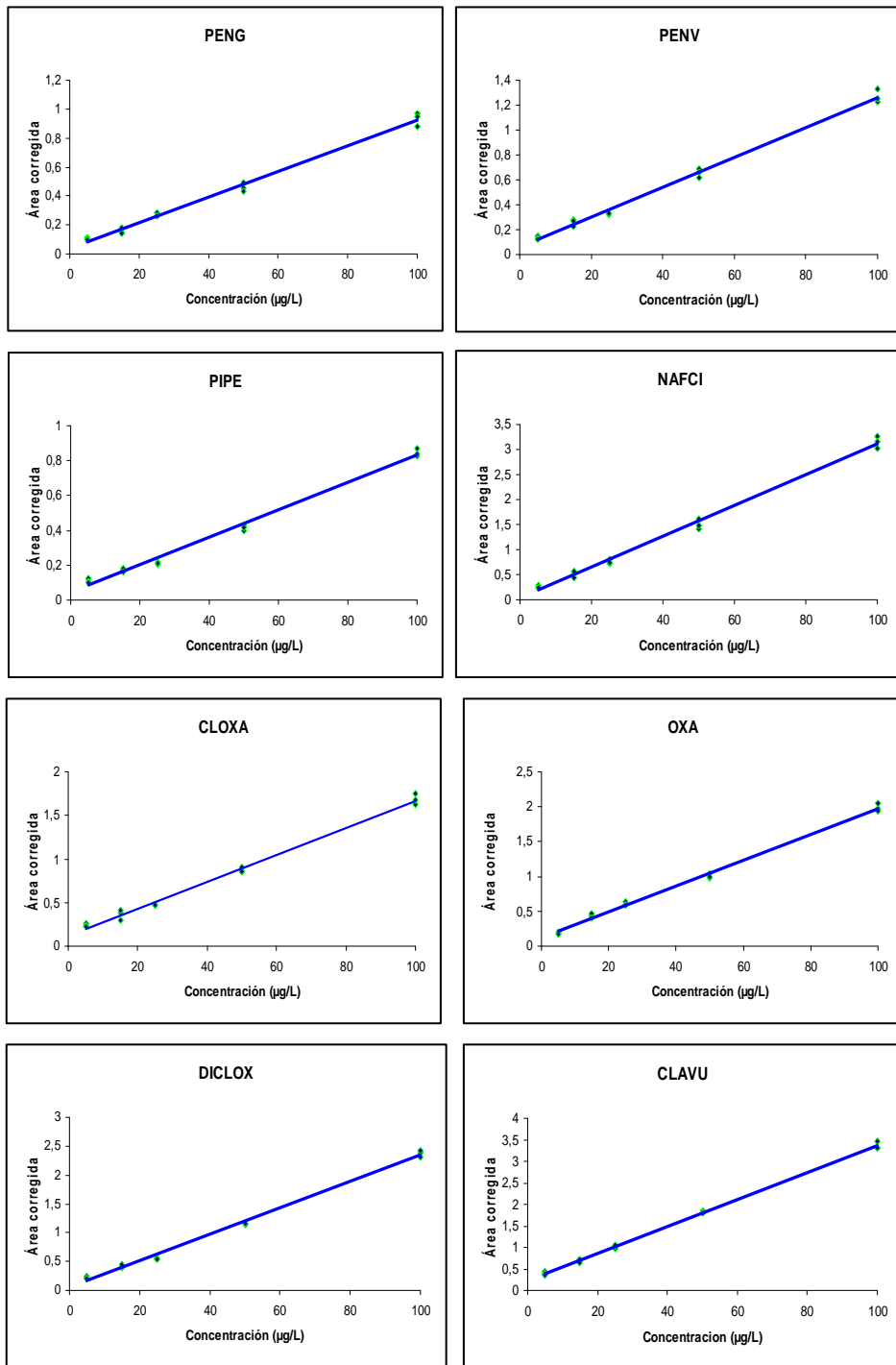


Figura IV-11. Rectas de calibrado obtenidas para los antibióticos β -lactámicos seleccionados en muestras de leche.

Tabla IV-5. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para la detección de residuos en leche. Se incluyen los LMRs legislados para estos compuestos en leche.*

	Rango lineal (µg/L)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD ^a (µg/L)	LOQ ^b (µg/L)	LMR (µg/L)
AMPI	0.9 - 100	0.001	0.015	99.2	0.9	3.3	4.0
AMOX	1.1 - 100	0.164	0.023	99.4	1.1	3.7	4.0
PENG	1.0 - 100	0.043	0.088	99.3	1.0	3.3	4.0
PENV	0.9 - 100	0.065	0.012	99.5	0.9	3.3	~
PIPE	1.2 - 100	0.047	0.008	99.3	1.2	4.0	~
NAFCI	0.8 - 100	0.054	0.031	99.5	0.8	2.8	30.0
OXA	1.2 - 100	0.099	0.019	99.5	1.2	4.0	30.0
CLOXA	1.1 - 100	0.123	0.016	99.4	1.1	3.6	30.0
DICLOX	1.0 - 100	0.079	0.023	99.3	1.0	3.3	30.0
CLAV	1.2 - 100	0.196	0.032	99.7	1.2	4.0	200.0

(a) Tres veces la relación señal/ruido

(b) Diez veces la relación señal/ruido.

Los parámetros estadísticos, calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla IV-5. Los coeficientes de determinación (R²) obtenidos confirman que las respuestas para los compuestos estudiados son lineales en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido (S/N).

Como puede observarse, los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada uno de los antibióticos en estudio se encuentran por debajo de los LMRs legislados para estos compuestos en leche.

5.3.1.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por medio de aplicaciones repetidas del procedimiento de precipitación con acetonitrilo y SPE a tres muestras (réplicas experimentales) para tres niveles de concentración, 5 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 100 $\mu\text{g/L}$ para cada uno de los compuestos en estudio, y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se dan en la Tabla IV-6. Como se puede comprobar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla IV-6. Estudio de la precisión del método propuesto para muestras de leche mediante HPLC capilar.

	CLAV	AMOX	AMPI	PIPE	PENG	PENV	OXA	CLOXA	NAFCI	DICLOX
Intradía (n=9)										
5 µg/L DER (%)	4.9	3.9	4.0	4.4	4.3	4.9	4.8	4.7	4.7	4.7
30 µg/L DER (%)	3.8	4.1	4.1	3.7	3.9	3.3	4.6	4.2	4.2	3.6
100 µg/L DER (%)	4.1	3.9	3.8	3.3	3.6	3.8	4.1	3.8	4.0	4.4
Tiempo Migración (min)	5.0	5.7	9.1	11.2	11.9	12.7	13.2	13.9	14.2	15.3
DER (%)	2.2	2.1	1.6	1.3	1.4	1.9	1.7	2.0	1.4	1.9
Interdía (n=15)										
5 µg/L DER (%)	4.0	4.8	4.4	4.8	4.3	5.0	4.3	3.9	4.6	4.6
30 µg/L DER (%)	4.9	5.9	5.1	5.4	5.7	5.1	5.5	5.0	5.3	4.8
100 µg/L DER (%)	4.1	5.4	4.7	5.0	5.3	4.7	5.3	4.7	4.6	4.4
Tiempo Migración (min)	4.8	5.6	8.9	11.3	11.8	12.6	13.0	14.0	14.1	15.1
DER (%)	3.8	3.8	4.1	5.0	4.4	4.7	3.9	4.0	4.3	3.1

5.3.1.2.3. *Estudio de la veracidad*

Para comprobar la eficacia del tratamiento de muestra se llevaron a cabo estudios de recuperación, añadiendo los diferentes antibióticos β -lactámicos a muestras de leche, libre de los mismos. Las muestras de leche se doparon con una mezcla de los diez antibióticos (AMPI, AMOX, PENG, PENV, CLOXA, DICLOX, OXA, NAFCI, PIPE y CLAV), a tres niveles de concentración (5, 30 y 100 $\mu\text{g/L}$). Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Las recuperaciones absolutas fueron calculadas comparando las áreas de pico relativas de muestras de leche dopadas antes del procedimiento de SPE con las áreas de pico relativas de los patrones correspondientes. Las recuperaciones fueron mayores del 84% en todos los casos, con DER aceptables. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla IV-7.

Tabla IV-7. *Recuperaciones obtenidas para cada compuesto en muestras de leche de vaca fortificadas a distintos niveles de concentración.*

	5 $\mu\text{g/L}$		30 $\mu\text{g/L}$		100 $\mu\text{g/L}$	
	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)
AMPI	92.6	5.7	93.5	6.1	85.7	4.1
AMOX	95.3	6.0	94.7	6.3	90.7	3.7
PENG	90.1	5.7	90.4	5.8	91.0	3.4
PENV	92.4	5.8	90.3	5.8	90.7	7.2
PIPE	92.0	6.1	93.1	5.9	92.7	5.9
NAFCI	93.2	5.1	93.5	5.8	96.3	7.8
OXA	89.9	5.8	90.5	6.3	82.9	7.9
CLOXA	91.7	6.3	92.2	6.6	88.7	6.8
DICLOX	92.3	5.9	93.2	6.6	92.7	6.1
CLAV	92.4	6.5	94.0	6.9	84.2	9.0

La Figura IV-12 presenta los cromatogramas obtenidos para una muestra de leche cruda de vaca sin fortificar con los compuestos estudiados (blanco de matriz) y el obtenido para una muestra de leche cruda de vaca a la que se han añadido las concentraciones indicadas de cada uno de los analitos. Como puede observarse, no existen compuestos de la matriz que migren a los tiempos retención de los analitos.

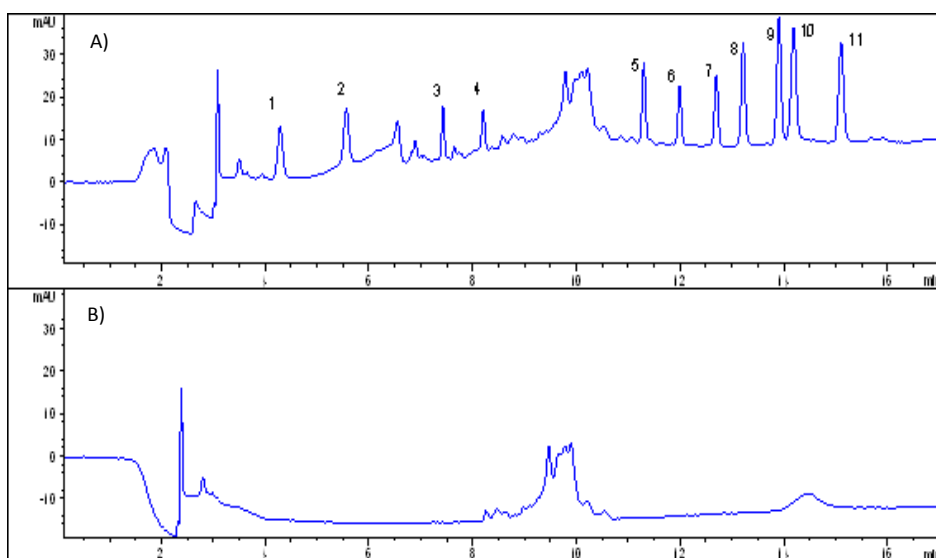


Figura IV-12. Cromatogramas de leche cruda de vaca A) fortificada con 5 $\mu\text{g/L}$ de cada compuesto y 50 $\mu\text{g/L}$ de PI. B) Blanco de matriz. 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX

Como puede observarse, el método propuesto proporciona buenos resultados en términos de precisión y veracidad, con recuperaciones cuantitativas, siendo posible su aplicación en la determinación de estos residuos en muestras de leche a niveles inferiores a los LMRs.

5.3.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CARNE DE POLLO

5.3.2.1. Tratamiento de las muestras

Como ya se vio en el capítulo anterior, para limpiar los extractos de este tipo de matriz y preconcentrar la muestra, se necesitan dos tipos de cartuchos: Oasis® HLB con contenido hidrofílico-lipofílico (60 mg, 3 mL) y Alúmina N (500 mg, 3 mL). El método empleado fue el siguiente:

1. Se toman 5 g de carne de pollo (músculo) triturada y se colocan en un tubo de centrifuga (40 mL).
2. Se añaden 5 mL de acetonitrilo y se agita 1 min en vortex.
3. Se añaden 10 mL más de acetonitrilo y se agita 1 min en vortex.
4. Se centrifuga a 1800 rpm durante 5 minutos.
5. El sobrenadante se lleva a casi sequedad (0.5 mL aprox.) en corriente de nitrógeno.
6. Se recompone con 3 mL de disolución tampón fosfato de pH 8.5.
7. Se pasa la muestra a través de los cartuchos Oasis® HLB, sin vacío, previamente activados con:
 - 5 mL de metanol
 - 5 mL de acetonitrilo
 - 5 mL de agua Milli-Q
 - 3 mL de disolución tampón fosfato pH 8.5.

8. Se eluye con 6 mL de acetonitrilo a una velocidad de 1 - 2 mL/min empleando bomba de vacío.
9. El eluato se pasa a través de un cartucho de Alúmina N, previamente activado con:
 - 5 mL de agua Milli-Q
 - 5 mL de acetonitrilo, a una velocidad de 1 mL/min.
10. Se eluye con 3 mL de agua MilliQ
11. Se evapora en corriente de nitrógeno.
12. Se reconstituye con 0.5 mL de agua Milli-Q que contiene el patrón interno (PABA, 50 µg/Kg) y se somete éste al análisis mediante el método propuesto.

En la Figura IV-13 se adjunta un esquema de la preparación de muestra.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRFIA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

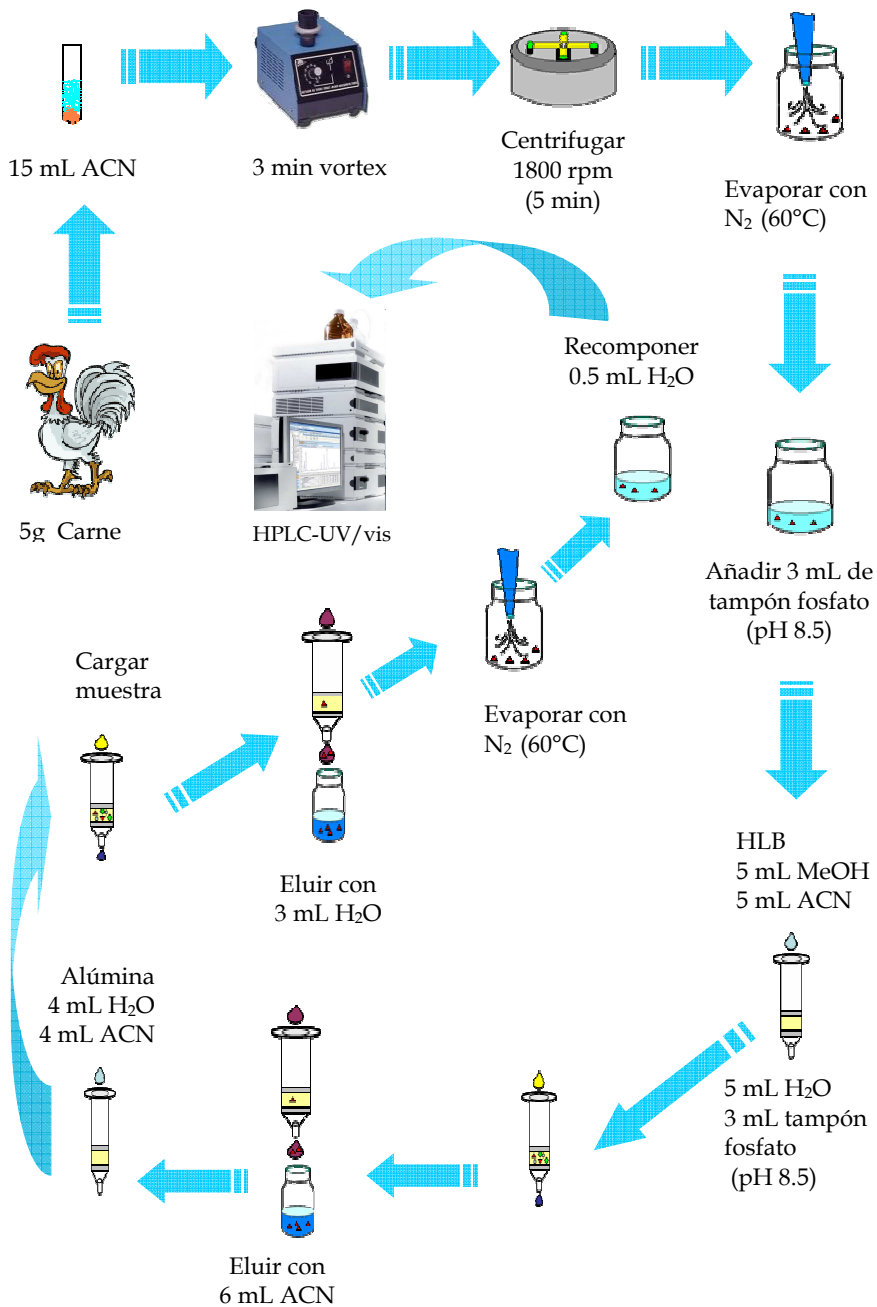


Figura IV- 13. Esquema correspondiente a la preparación de muestra de carne de pollo.

5.3.2.2. Validación del método

El método analítico se validó en términos de linealidad, LOD, LOQ, repetibilidad, precisión y veracidad.

5.3.2.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

Se establecieron las correspondientes rectas de calibrado en presencia de matriz, (músculo de pollo), libre de los compuestos en estudio. Las rectas de calibrado para los antibióticos β -lactámicos seleccionados se obtuvieron mediante fortificación de las muestras, antes del tratamiento, con concentraciones crecientes. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de cinco niveles de concentración correspondientes a 5, 25, 100, 250, 400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para AMOX, AMPI, CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, PENV, PIPE, NAFCI y CLAV. En todos los casos, 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de PABA (PI) se añadieron durante la etapa de reconstitución del extracto, antes de la medida. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración. Las funciones de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas corregidas (Figura IV-14).

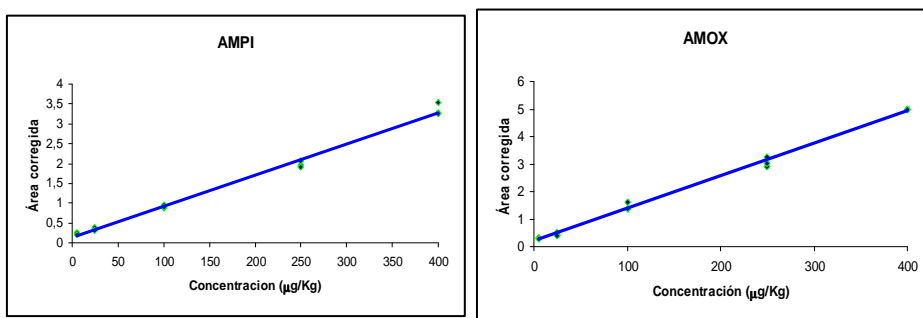


Figura IV-14. Rectas de calibrado para muestras de pollo de los antibióticos β -lactámicos seleccionados.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

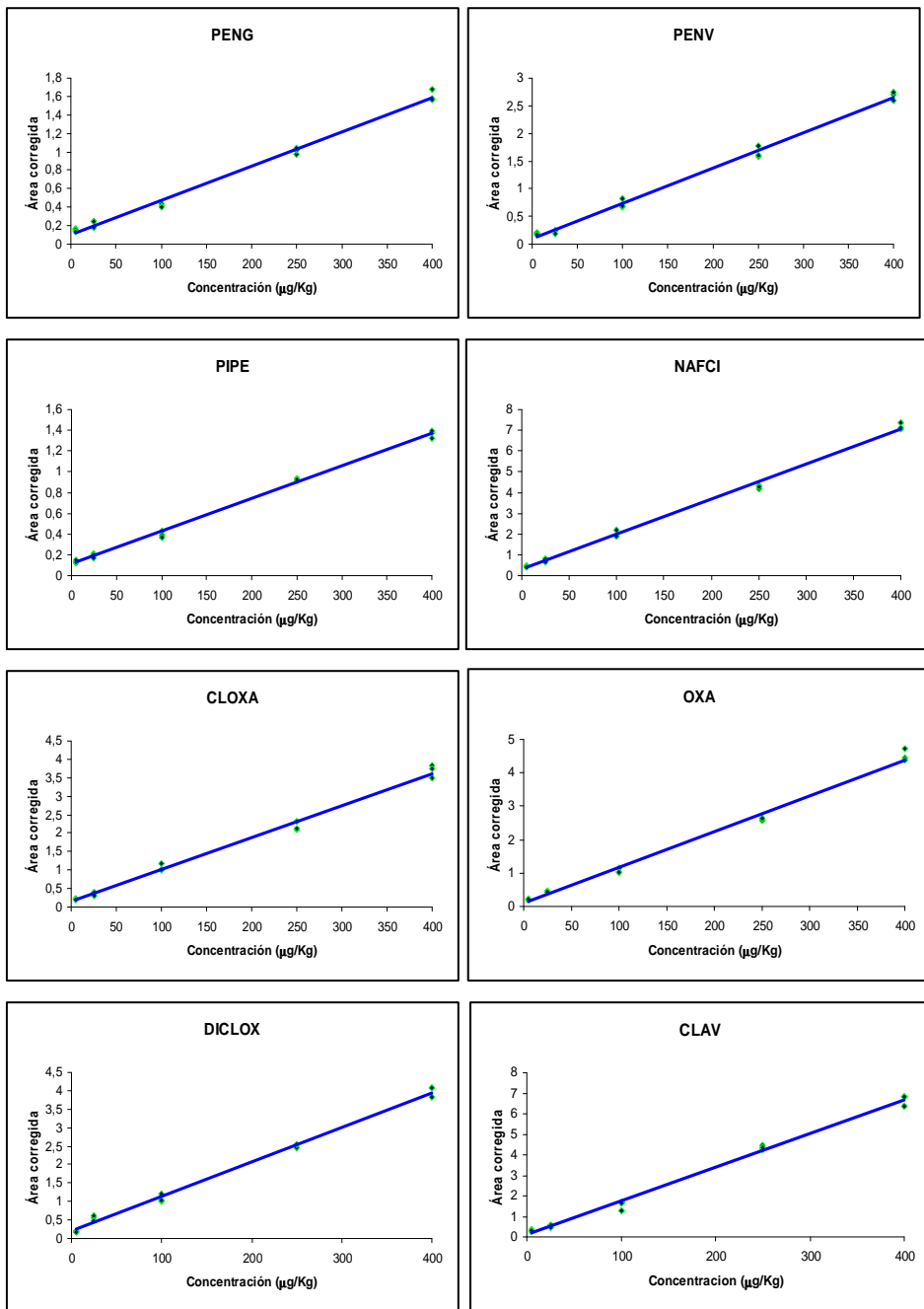


Figura IV-14 (Cont.). Rectas de calibrado para muestras de pollo de los antibióticos β -lactámicos seleccionados.

Los parámetros estadísticos, calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla IV-8. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para los antibióticos β -lactámicos son lineales en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido (S/N).

Como puede observarse, con el proceso de tratamiento de muestra aplicado se obtienen mediante este método LOQ considerablemente inferiores a los LMRs legislados para este tipo de matrices.

Tabla IV-8. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto. Se incluyen los LMRs legislados para estos compuestos en músculo de pollo.*

	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	Ordenada	Pendiente	R^2 (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LMR ($\mu\text{g/Kg}$)
AMPI	1.1 - 400	0.119	0.008	99.4	1.1	3.8	50.0
AMOX	1.1 - 400	0.155	0.012	99.6	1.1	3.8	50.0
PENG	1.2 - 400	0.076	0.004	99.1	1.2	4.0	50.0
PENV	1.2 - 400	0.079	0.006	99.5	1.2	4.0	25.0
PIPE	1.1 - 400	0.081	0.003	99.2	1.1	3.8	~
NAFCI	1.1 - 400	0.213	0.017	99.5	1.1	3.8	300.0
OXA	1.1 - 400	0.066	0.011	99.3	1.1	3.8	300.0
CLOXA	1.2 - 400	0.107	0.009	99.2	1.2	4.0	300.0
DICLOX	1.2 - 400	0.142	0.010	99.4	1.2	4.0	300.0
CLAV	1.4 - 400	0.093	0.017	99.5	1.4	4.6	~

- (a) Tres veces la relación señal/ruido
- (b) Diez veces la relación señal/ruido.

5.3.2.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

medio de aplicaciones repetidas del procedimiento de SPE a tres muestras (réplicas experimentales) para cada nivel de concentración (5, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) para cada uno de los antibióticos en estudio, y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como DER de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se dan en la Tabla IV-9. Como se puede comprobar, la precisión fue satisfactoria en todos los casos.

Tabla IV-9. Estudio de precisión para el método propuesto referido a distintos niveles de concentraciones y tiempos de migración

	AMOX	AMPI	PENG	PENV	PIPE	NAFCI	OXA	CLOXA	DICLOX	CLAV
Intradía (n=9)										
5 µg/Kg DER (%)	4.7	4.2	4.0	3.9	4.1	4.0	4.4	4.6	4.1	4.4
30 µg/Kg DER (%)	4.1	3.9	3.6	4.0	4.3	3.8	3.7	4.1	3.6	3.8
100 µg/Kg DER (%)	3.3	2.8	4.0	3.4	3.5	3.3	3.4	3.5	3.0	3.4
Tiempo Migración (min)	5.8	8.1	12.0	12.6	11.1	14.2	13.2	13.8	15.6	5.3
DER (%)	1.1	1.4	1.3	1.7	2.2	1.9	2.1	1.8	1.6	2.0
Interdía (n=15)										
5 µg/Kg DER (%)	4.4	4.7	4.9	5.0	4.7	4.9	4.4	4.6	5.0	4.8
30 µg/Kg DER (%)	4.4	4.6	4.9	4.3	4.5	4.7	4.7	4.9	4.7	4.9
100 µg/Kg DER (%)	4.0	4.2	4.4	4.0	4.3	4.4	4.3	4.4	4.3	4.1
Tiempo Migración (min)	5.7	8.0	12.1	12.5	11.3	14.0	13.1	13.9	15.1	5.0
DER (%)	5.2	4.8	4.9	5.1	4.7	5.3	4.9	5.0	4.4	4.8

5.3.2.2.3. *Estudio de la veracidad*

Para demostrar la ausencia de errores sistemáticos del método propuesto se llevaron a cabo estudios de recuperación, añadiendo los diferentes antibióticos β -lactámicos a muestras de carne de pollo (músculo), libres de los mismos. Las muestras se doparon con una mezcla de los antibióticos β -lactámicos (AMPI, AMOX, PENG, PENV, CLOXA, DICLOX, OXA, NAFCI, PIPE, CLAV) a tres niveles de concentración (5, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) de cada uno de ellos. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Las recuperaciones absolutas fueron calculadas comparando las áreas de pico relativas de muestras de carne de pollo dopadas antes del procedimiento de SPE con las áreas de pico relativas de los patrones correspondientes. Las recuperaciones fueron mayores del 83% en todos los casos con DER aceptables. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla IV-10.

Tabla IV-10. Estudio de recuperación para cada antibiótico β -lactámico en muestras de carne de pollo.

	5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$		30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	
	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)
AMPI	94.4	7.0	96.6	6.7	91.8	5.1
AMOX	94.2	6.8	97.3	5.5	88.2	5.1
PENG	94.0	6.9	95.2	6.8	88.9	4.9
PENV	91.1	6.9	91.5	5.8	94.7	5.5
PIPE	90.4	7.1	91.5	7.1	92.5	6.9
NAFCI	93.5	7.0	94.2	6.4	94.3	6.1
OXA	90.1	6.8	92.1	7.0	90.0	8.3
CLOXA	93.3	6.8	91.4	5.9	92.1	6.9
DICLOX	92.4	6.6	93.6	6.4	93.6	4.7
CLAV	90.6	7.1	94.6	6.3	83.4	9.1

Como puede observarse, el método propuesto proporciona buenos resultados en términos de precisión y veracidad, con recuperaciones cuantitativas.

La Figura IV-15 presenta los cromatogramas obtenidos para una muestra de carne de pollo fortificada con los antibióticos β -lactámicos y otra sin fortificar (blanco de muestra).

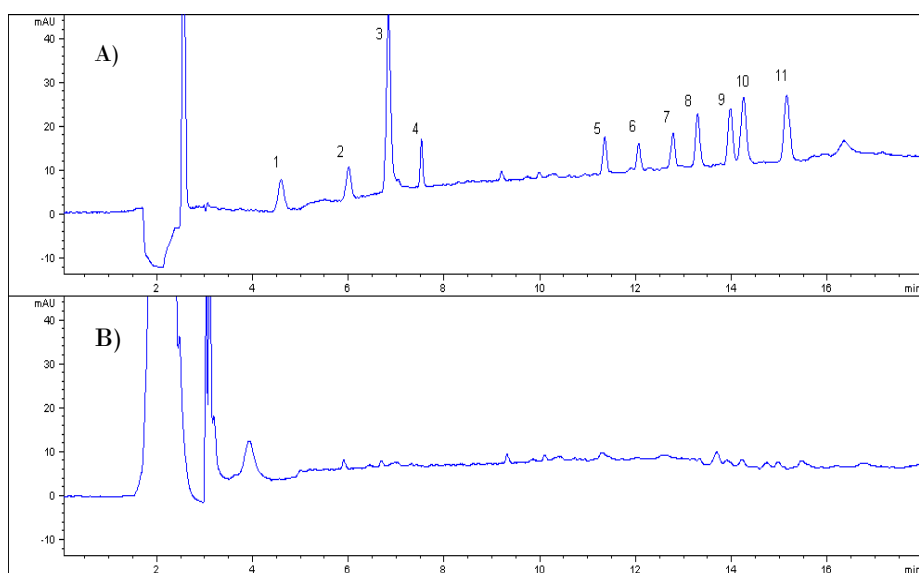


Figura IV-15. Cromatogramas de carne de pollo A) fortificada con 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de cada antibiótico β -lactámico, y 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de PI. B) Blanco de matriz. 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCL, 11. DICLOX

5.3.3. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS NATURALES

Para llevar a cabo esta aplicación, se seleccionaron dos tipos de muestras de aguas:

- Agua de río
- Agua de pozo

Ambos situados en la zona de Guadix (Granada, España).

5.3.3.1. Tratamiento de las muestras

El método a seguir es similar al empleado en el capítulo anterior para el análisis de muestras de agua y adaptado respecto al descrito anteriormente para la determinación de estos antibióticos en carne de pollo y leche. La única diferencia radica en que se puede prescindir del cartucho de Alúmina N, por lo que el tratamiento será más rápido. Los pasos a seguir en el procedimiento son los siguientes (ver Figura IV-16):

1. Se toman 250 mL de agua
2. Se pasa la muestra por un cartucho HLB Oasis® (60 mg, 3 mL), sin vacío, previamente activado con:
 - 5 mL de MeOH
 - 5 mL de Acetonitrilo
 - 5 mL de H₂O
 - 3 mL tampón fosfato pH 8.5
3. Se eluyen los compuestos con 6 mL de acetonitrilo, a una velocidad de 1-2 mL/min.
4. Se evapora en corriente de nitrógeno a 60 °C.
3. Se recompone hasta un volumen final de 0.5 mL con agua Milli-Q, añadiendo el patrón interno PABA (50 µg/L).

Ver Figura IV-16, donde se muestra un esquema del tratamiento de muestra para aguas.

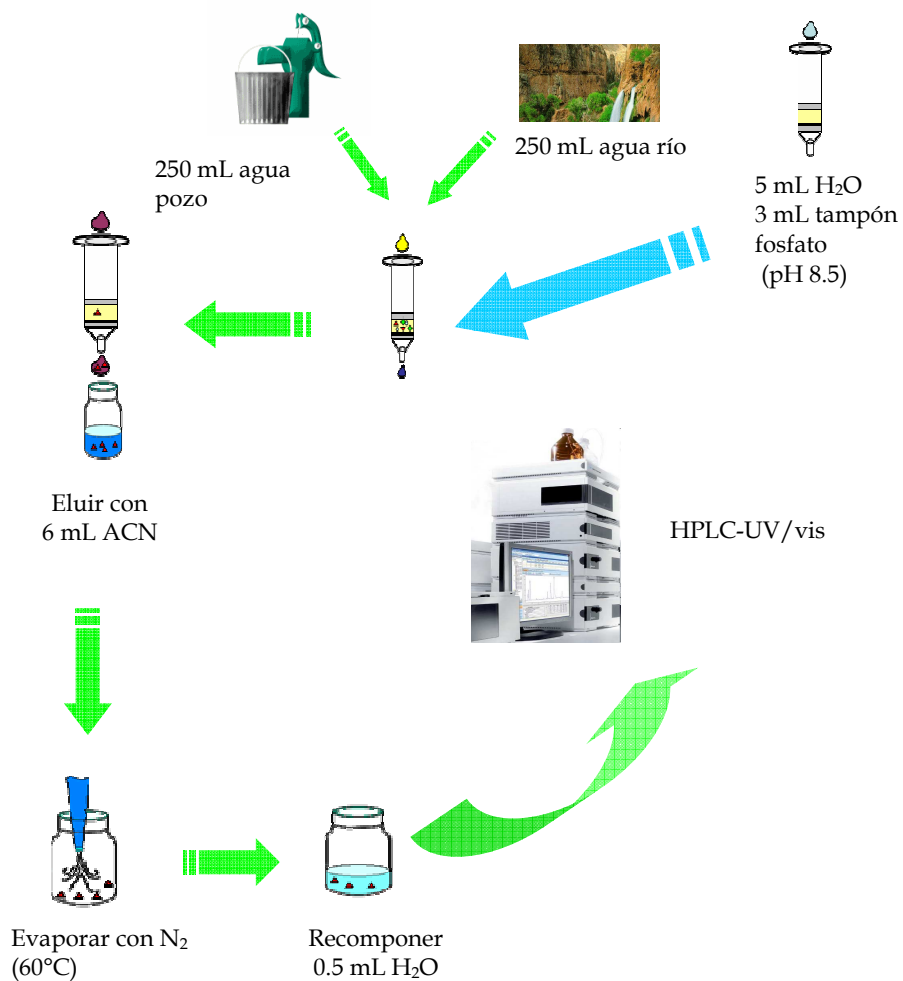


Figura IV- 16. Esquema correspondiente a la preparación de las muestras de agua.

5.3.3.2. Validación del método

El método analítico completo para aguas naturales se caracterizó en términos de linealidad, LOD, LOQ, precisión y veracidad, usando como matriz representativa un agua de pozo. El estudio de veracidad mediante ensayos de

recuperación, con objeto de comprobar la ausencia de errores sistemáticos, se llevó a cabo para ambos tipos de aguas (de río y de pozo).

5.3.3.2.1. *Rectas de calibrado y límites de detección y cuantificación*

Las curvas de calibrado para los antibióticos β -lactámicos seleccionados, se obtuvieron empleando muestras de agua de pozo en las que previamente se comprobó la ausencia de estos compuestos, fortificándolas antes del tratamiento de muestra. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 0.2, 0.5, 1.5, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/L}$ para AMOX, AMPI, PENG, PENV, PIPE, OXA, CLOXA, DICLOX, NAFCI, PIPE y CLAV. En todos los casos, 50 $\mu\text{g/L}$ de PABA se añadieron como PI durante la etapa de reconstitución. Se prepararon dos muestras a cada nivel de concentración. Las curvas de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas corregidas y el tiempo de migración de ambos. La Figura IV-17 muestra las rectas de calibrado obtenidas para el agua de pozo. Los parámetros estadísticos, calculados mediante regresión por mínimos cuadrados se muestran en la Tabla IV-11, comprobándose que, en términos generales, el método presenta muy buenos resultados en cuanto a linealidad y límites de detección y cuantificación.

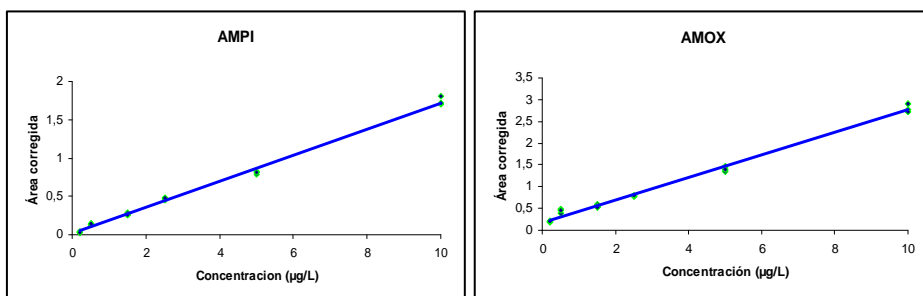


Figura IV-17. *Rectas de calibrado para muestras de agua de pozo.*

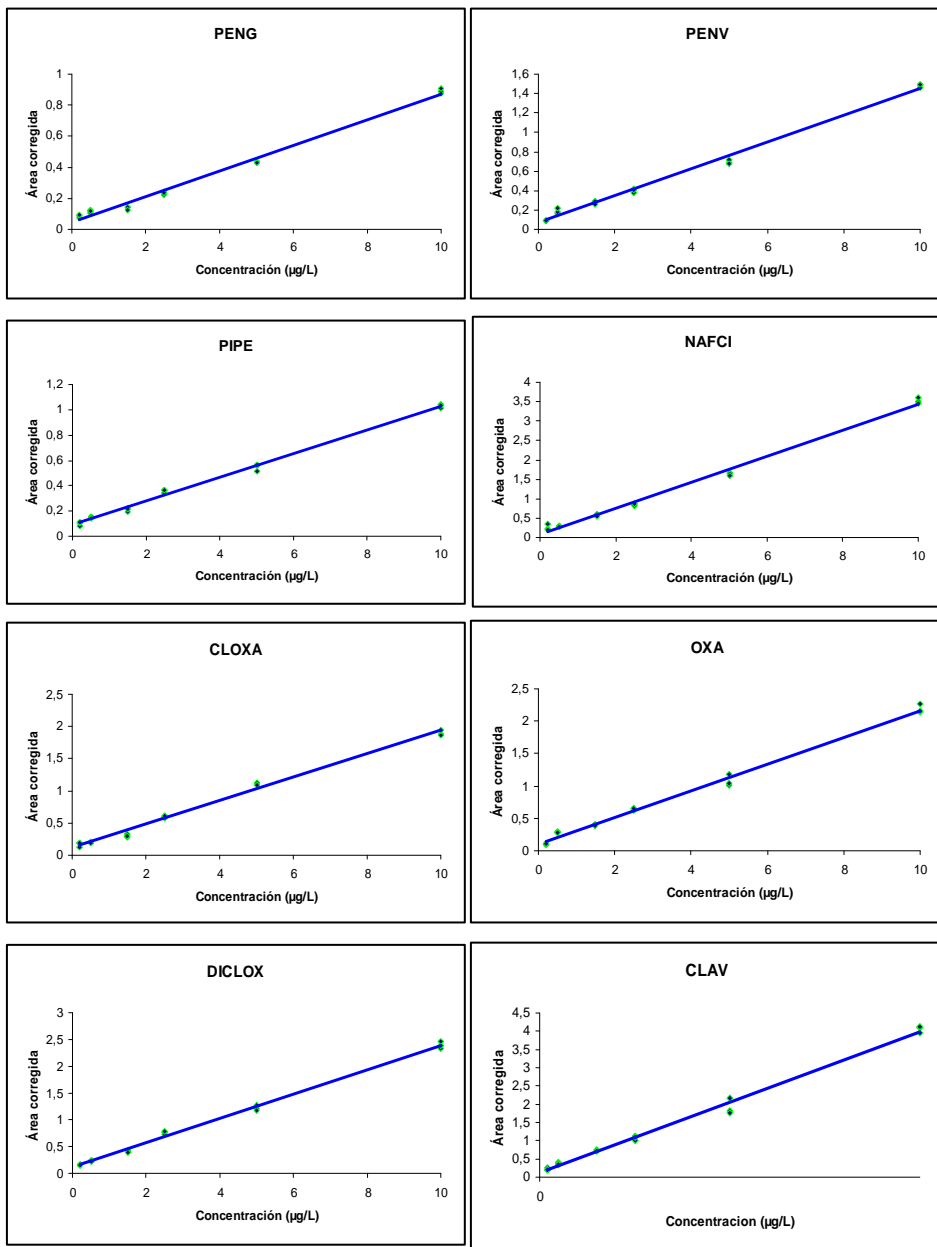


Figura IV-17 (Cont.). Rectas de calibrado para muestras de agua de pozo.

Tabla IV-11. *Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto para muestras de agua de pozo.*

	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	Ordenada	Pendiente	R ² (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
AMPI	0.06 - 10	0.019	0.170	99.5	0.06	0.20
AMOX	0.06 - 10	0.187	0.272	99.2	0.06	0.20
PENG	0.06 - 10	0.045	0.082	99.1	0.06	0.20
PENV	0.06 - 10	0.068	0.138	99.3	0.06	0.20
PIPE	0.05 - 10	0.091	0.995	99.5	0.05	0.16
NAFCI	0.04 - 10	0.088	0.035	99.4	0.04	0.13
OXA	0.05 - 10	0.106	0.206	99.3	0.05	0.16
CLOXA	0.05 - 10	0.116	0.182	99.1	0.05	0.16
DICLOX	0.05 - 10	0.117	0.278	99.6	0.05	0.16
CLAV	0.06 - 10	0.128	0.386	99.3	0.06	0.20

(a) Tres veces la relación señal/ruido

(b) Diez veces la relación señal/ ruido.

5.3.3.2.2. *Estudio de la precisión*

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por medio de aplicaciones repetidas del procedimiento de SPE a tres muestras de agua de pozo (réplicas experimentales) para tres niveles de concentración (0.2, 1.5 y 5 $\mu\text{g/L}$) para cada uno de los compuestos en estudio. Cada muestra fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante cinco días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico relativas y de los tiempos de migración se dan en la Tabla IV-12. Como se puede comprobar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla IV-12 . Estudio de precisión para el método propuesto referido a distintos niveles de concentraciones y tiempos de migración para agua de pozo.

	CLAV	AMOX	AMPI	PIPE	PENG	PENV	OXA	CLOXA	NAFCI	DICLOX
Intradía (n=9)										
0.2 µg/L DER (%)	5.8	6.2	6.8	6.3	5.9	5.8	5.7	6.2	6.0	5.5
1.5 µg/L DER (%)	4.5	4.8	4.9	5.1	5.2	4.8	5.0	4.9	5.4	5.0
5 µg/L DER (%)	3.6	4.2	3.9	4.6	4.7	4.4	3.7	4.0	4.5	3.7
Tiempo migración (min)	4.2	5.7	6.6	7.5	11.1	11.8	12.6	13.2	13.8	14.2
DER (%) (min)	1.9	2.0	2.1	2.1	1.8	1.6	2.2	1.8	1.9	2.0
Interdía (n=15)										
0.2 µg/L DER (%)	6.0	6.2	5.8	5.9	5.5	6.0	5.4	5.3	5.7	5.9
1.5 µg/L DER (%)	5.2	5.5	5.1	5.2	5.1	5.7	4.8	4.6	5.2	5.2
5 µg/L DER (%)	4.7	5.0	4.7	4.9	4.7	5.1	4.4	4.1	4.7	4.4
Tiempo Migración (min)	4.0	5.6	6.6	7.7	11.0	11.8	12.5	13.1	13.8	14.1
DER (%)	2.9	1.9	2.1	2.0	2.4	1.8	2.1	1.3	2.9	1.9

5.3.3.2.3. *Estudio de la veracidad*

El estudio de la veracidad se llevó a cabo mediante ensayos de recuperación, añadiendo los diferentes antibióticos β -lactámicos a muestras de agua de pozo y de río, libres de los mismos. Las muestras se fortificaron con una mezcla de los antibióticos β -lactámicos (AMPI, AMOX, PENG, PENV, CLOXA, DICLOX, OXA, NAFCI, PIPE) y CLAV, a diferentes niveles de concentración (0.2, 1.5, 5 $\mu\text{g/L}$) para cada uno de ellos. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Las recuperaciones absolutas fueron calculadas comparando las áreas de pico relativas corregidas de muestras de agua fortificadas antes del procedimiento de SPE con las áreas de pico relativas corregidas de los patrones correspondientes. Las recuperaciones fueron mayores del 90 % en todos los casos con DER aceptables. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla IV-13.

Tabla IV-13. Recuperaciones obtenidas en las distintas muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración.

		0.2 µg/L		1.5 µg/L		5 µg/L	
		R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)	R (%)	DER (%)
AMPI	Agua pozo	91.0	7.0	94.1	6.3	95.4	4.2
	Agua río	94.9	8.0	93.9	6.6	98.2	5.6
AMOX	Agua pozo	92.5	8.3	95.3	5.9	95.6	6.7
	Agua río	95.3	7.4	92.6	4.9	97.1	5.2
PENG	Agua pozo	93.2	7.1	95.2	6.4	95.4	5.7
	Agua río	91.9	5.4	93.9	7.0	94.5	6.0
PENV	Agua pozo	95.9	8.9	96.0	6.9	97.8	7.2
	Agua río	94.2	7.3	95.4	6.9	97.6	6.7
PIPE	Agua pozo	92.4	7.3	93.0	6.6	95.9	7.0
	Agua río	93.9	8.0	94.7	6.8	96.3	6.1
NAFCI	Agua pozo	95.9	6.1	94.2	7.2	96.1	5.4
	Agua río	97.0	7.2	95.8	6.9	97.7	6.3
OXA	Agua pozo	94.2	8.7	92.9	7.5	95.7	7.0
	Agua río	92.7	8.7	91.3	7.9	96.3	8.1
CLOXA	Agua pozo	93.8	5.6	94.8	6.2	94.1	5.5
	Agua río	91.3	7.1	93.0	6.9	90.9	6.7
DICLOX	Agua pozo	91.9	7.1	93.6	7.0	92.0	6.7
	Agua río	92.1	5.3	93.7	6.3	94.0	6.7
CLAV	Agua pozo	92.0	5.9	94.2	6.3	91.9	6.5
	Agua río	90.1	7.3	93.0	6.6	91.3	7.8

La Figura IV-18 presenta los cromatogramas obtenidos para ambas muestras de agua fortificadas con los antibióticos β-lactámicos, así como los correspondientes a las muestras tratadas sin fortificar (blancos de muestra). Como puede observarse no existen interferencias de la matriz.

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR DE ALTA RESOLUCIÓN

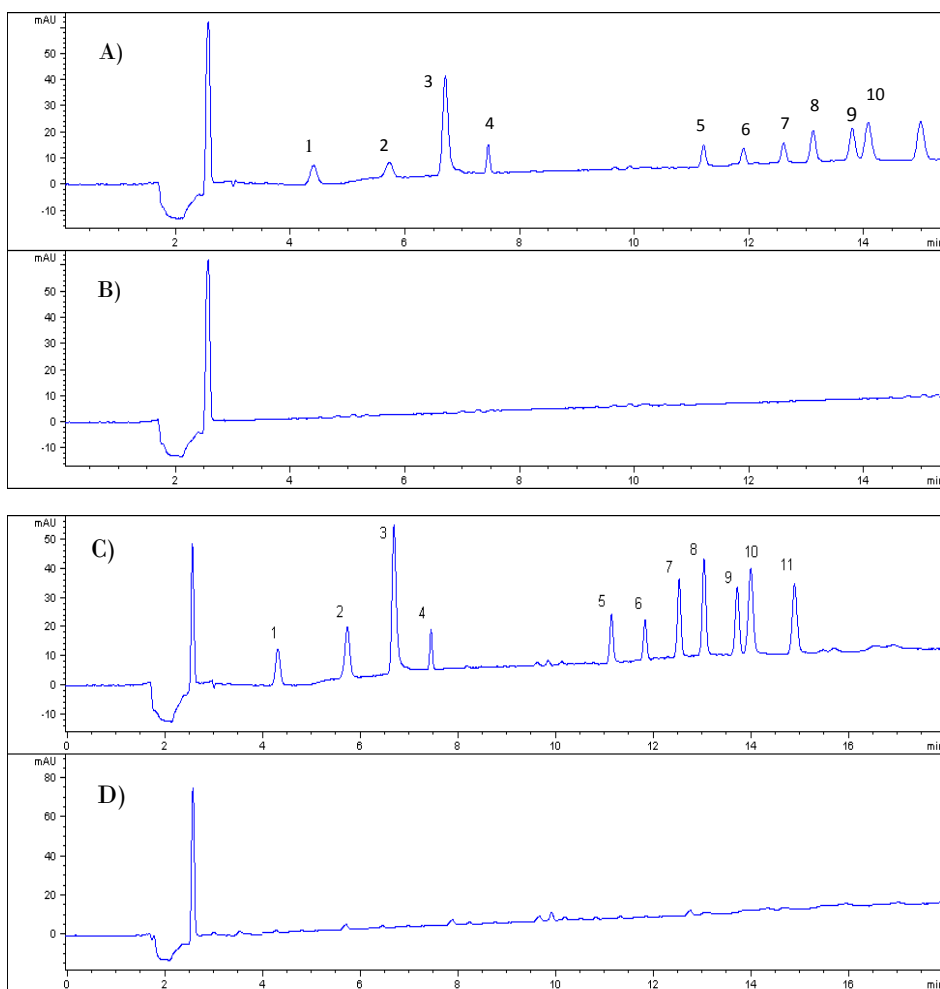


Figura IV-18. Cromatogramas obtenidos en condiciones óptimas para: A) Agua de río fortificada, B) Blanco de agua de río, C) Agua de pozo fortificada y D) Blanco de agua de pozo. Ambas fortificadas con 0.5 $\mu\text{g/L}$ de cada antibiótico y 50 $\mu\text{g/L}$ de PABA. 1. CLAVU, 2. AMOX, 3. PABA (PI), 4. AMPI, 5. PIPE, 6. PENG, 7. PENV, 8. OXA, 9. CLOXA, 10. NAFCl, 11. DICLOX

Concluimos por tanto afirmando que el método propuesto proporciona buenos resultados en términos de precisión y veracidad, por lo que proporcionará resultados exactos en la determinación de residuos de los diez antibióticos seleccionados en muestras de aguas naturales, a niveles muy bajos de concentración, como cabe esperar en este tipo de muestras.

CONCLUSIONES

1. CAPÍTULO I

Se ha propuesto un nuevo método para la determinación cuantitativa de nueve antibióticos β -lactámicos, basado en el uso de la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) como técnica separativa, con detección UV-Vis. Se ha utilizado el diseño de experimentos como estrategia para optimizar las principales variables que afectan al método analítico. Una vez establecidos los parámetros analíticos que caracterizan dicho método, se ha aplicado éste a la determinación de los antibióticos en estudio en diferentes preparados farmacéuticos. Este método constituye una fácil, rápida y económica alternativa a los métodos existentes basados en el uso de la cromatografía líquida, y puede ser empleado en el control de calidad en la industria farmacéutica.

2. CAPÍTULO II

Con objeto de mejorar la baja sensibilidad que presenta la electroforesis capilar, dado el pequeño tamaño de muestra utilizada, unida a la escasa sensibilidad también inherente a los sistemas de detección UV-Vis, en este capítulo se propone la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos mediante electroforesis capilar zonal (CZE) con detección UV-Vis, haciendo uso de una metodología de preconcentración on-line denominada apilamiento de muestra de gran volumen (LVSS). El método propuesto permite el análisis simultáneo de siete antibióticos β -lactámicos en muestras de agua de distinta procedencia, así como en leche de vaca y cabra, en aproximadamente 30 minutos. Como etapa previa al análisis mediante CZE se han desarrollado procedimientos de extracción en fase sólida (SPE) para el aislamiento y preconcentración de los analitos. Los límites de detección conseguidos son lo suficientemente bajos para permitir la detección de estos compuestos a niveles inferiores a los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por la UE para muestras de leche. En el caso de muestras de agua, actualmente no están

establecidos los LMR para estos contaminantes emergentes, pero el método muestra su capacidad para determinar estos compuestos en muestras ambientales a niveles de muy pocos $\mu\text{g/L}$.

3. CAPÍTULO III

Se ha descrito un método sensible y específico basado en el empleo de la electroforesis capilar con detección por espectrometría de masas (CE-MS) y espectrometría de masas en tándem (CE-MS/MS) para la determinación de nueve penicilinas de uso veterinario en muestras de músculo de pollo, obteniéndose límites de detección por debajo de los LMRs establecidos por la UE para estos analitos en este tipo de muestra. Además, para todos los compuestos estudiados es posible llevar a cabo una confirmación inequívoca mediante MS/MS ya que el número de puntos de identificación obtenido es superior al exigido por la legislación. El método propuesto elimina la necesidad de separar los procedimientos de cuantificación y confirmación como lo hacen la mayoría de los métodos publicados para β -lactámicos; presenta las ventajas propias de la aplicación de la CE como técnica de separación, tales como simplicidad, bajo coste y reducidos tiempos de análisis, combinada con las características inherentes a la detección por MS, observándose que la detección por MS/MS presenta mayor sensibilidad que la obtenida directamente por MS. Así mismo, el método propuesto se ha aplicado a muestras de agua de distinta naturaleza, obteniéndose límites de detección del orden de $0.2 \mu\text{g/L}$ para todos los analitos, con porcentajes de recuperación que oscilaron entre 89-99%. El procedimiento de SPE utilizado en la etapa de tratamiento de muestra resulto ser muy adecuado para matrices complejas como es el caso de las muestras de carne y, en el caso del análisis de muestras de agua naturales, permite una preconcentración adecuada para incrementar la sensibilidad del método, dados los bajos niveles de estos residuos que cabe esperar en este tipo de muestras. En definitiva, el método propuesto podría ser aplicado satisfactoriamente como

método de rutina para identificar y cuantificar antibióticos β -lactámicos de uso veterinario en laboratorios de control de calidad y seguridad alimentaria debido a su robustez y fiabilidad, lo que demuestra las posibilidades de la CE-MS/MS en este campo.

4. CAPITULO IV

Se ha desarrollado y validado un método basado en el empleo de la cromatografía líquida capilar con detección UV-Vis, para el análisis de trazas de diez antibióticos β -lactámicos de uso veterinario en distintas matrices, como leche, carne de pollo y aguas naturales, encontrándose entre los métodos más sensibles y rápidos disponibles para el análisis de este tipo de compuestos. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna LUNA C₁₈ 100 A (150×0.5 mm, 5 μ m) con un programa de gradiente para la fase móvil, donde se combina disolvente A (agua Milli-Q con 0.01% de TFA) y disolvente B (acetonitrilo con 0.01% de TFA). El tiempo necesario para eluir todos los analitos fue menor de 16 minutos. Antes del análisis por HPLC capilar, las muestras fueron extraídas, purificadas y concentradas por SPE, utilizando un tándem de cartuchos de extracción: en primer lugar HLB seguida de Alúmina N. Las recuperaciones obtenidas fueron satisfactorias en todos los casos y los límites de detección lo suficientemente bajos para permitir la cuantificación de estos residuos en carne de pollo y leche de vaca, siendo inferiores a los LMRs establecidos por la UE.

5. COMPARACION DE LOS DIFERENTES METODOS PROPUESTOS

La tabla que se muestra a continuación (Tabla C-1), recoge un resumen de las características de los diferentes métodos propuestos en esta Memoria. En ella se incluye tratamiento de las muestras, métodos de separación y detección empleados, así como el límite de detección obtenido para cada una de las matrices usadas para la validación de los métodos.

Tabla C-1. Comparativa de los distintos métodos usados en esta Tesis

ANALITO	MATRIZ	TRATAMIENTO DE MUESTRA	MÉTODO DE SEPARACIÓN Y CARACTERÍSTICAS	MÉTODO DE DETECCIÓN	LOD	LMR
CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, PENV, AMPI, NAFCI, PIPE y AMOX	Preparados farmacéuticos: .Capsulas <i>Orbenin</i> .Comprimidos <i>Britapen</i> . Inyectable <i>Veterin-Micipen</i>	Filtración	Cromatografía electrocinética micelar (MECK) 220nm. Tetraborato sódico 26mM-100mM SDS (pH 8.5), 20kV, 30°C. Capilar: 64.5 cm x 75 µm i.d.	(UV-Vis)	0.35-1.42 mg/L	-----
CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, AMPI, NAFCI y AMOX	Leche cruda de vaca, leche desnatada de vaca y leche cruda de cabra	Extracción con Acetonitrilo, evaporación y reconstitución con tampón fosfato (pH 8.5). SPE con Oasis® HLB y alúmina.	Apilamiento de muestra de gran volumen mediante electroforesis capilar zonal (LVSS-CZE-UV). (220 nm) 175 mM Tris – 20% etanol (pH 8), (-20 kV para LVSS) y 25 kV en la separación. 30 °C. Capilar: burbuja ventana de detección de 200 µm, 64.5 cm x 75 µm	(UV-Vis)	2 – 10 µg/L	4 – 30 µg/L
	Agua residual, agua de pozo y agua de río	Extracción en fase sólida (Oasis® HLB y Alúmina) en el agua residual y Oasis® HLB en el agua de pozo y río.			0.08 – 0.9 µg/L	-----

Tabla C-1 (Cont.). Comparativa de los distintos métodos usados en esta Tesis

ANALITO	MATRIZ	TRATAMIENTO DE MUESTRA	MÉTODO DE SEPARACIÓN Y CARACTERÍSTICAS	MÉTODO DE DETECCIÓN	LOD	LMR
CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, PENV, AMPI, NAFCl, PIPE y AMOX	Carne de pollo	Extracción con Acetonitrilo, evaporación y reconstitución con tampón fosfato (pH 8.5). Extracción en fase sólida (Oasis® HLB y alúmina).	Electroforesis capilar. Acetato amónico 60 mM (pH 6.0); 30 kV; 30 °C; Capilar: 96 cm x 50 µm i.d. Líquido adicional : 2-propanol/agua/ácido fórmico (40:57:3 v/v/v)	Espectrometría de masas (MS/MS)	8-12 µg/ Kg	25-300 µg/ Kg
	Agua de río y pozo	Extracción en fase sólida (Oasis® HLB)			0.18 – 0.26 µg/L	-----
CLOXA, DICLOX, OXA, PENG, PENV, AMPI, NAFCl, AMOX, PIPE y CLAV	Leche cruda de vaca	Extracción con Acetonitrilo, evaporación y reconstitución con tampón fosfato (pH 8.5). Extracción en fase sólida (Oasis® HLB y alúmina).	Cromatografía líquida capilar de alta resolución; (220 nm); Columna: Luna-C18 (150 x 0.5 mm, 5µm); Fase móvil: A: Agua con 0.01 % TFA;B: Acetonitrilo con 0.01 % TFA; Gradiente: 5% B (0 min), 60%B (8 min); 25 °C.	(UV-Vis)	0.8 – 1.2 µg/L	4-200 µg/L
	Carne de pollo				1.1 – 1.4 µg/Kg	25-300 µg/Kg
	Agua de río y pozo				0.04 – 0.06 µg/L	-----

Según se observa, la cromatografía capilar electrocinética micelar se ha usado únicamente para el análisis de preparados farmacéuticos, poniéndose de manifiesto su utilidad para el control de calidad en la industria farmacéutica; sin embargo, los límites de detección obtenidos no nos permitieron usar el método para el análisis de matrices alimentarias ya que los LMRs establecidos eran en todos los casos bastante inferiores.

Diferentes tipos de leche fueron analizados por electroforesis capilar zonal con una técnica de preconcentración on-line (apilamiento de muestra de gran volumen, LVSS) y cromatografía líquida capilar con detección UV-Vis en ambos casos, empleándose el mismo tratamiento de muestra. Los límites de detección obtenidos estaban por debajo de los LMRs establecidos en todos los casos, aunque se observa que los valores calculados haciendo uso de la cromatografía líquida capilar son inferiores que los obtenidos mediante LVSS-CZE, siendo los tiempos de análisis muy similares. La ventaja en este caso que presenta la CZE residiría fundamentalmente en el uso de disoluciones tampón como medio de separación, aunque es de destacar los bajos volúmenes de disolvente orgánico consumido y la escasa generación de residuos de la HPLC capilar al trabajar con tan bajos caudales.

Las muestras de carne de pollo se analizaron por tanto por CZE con detección MS como por HPLC capilar con detección UV-Vis, empleando el mismo tratamiento de muestra. De nuevo, la cromatografía líquida capilar proporcionó límites de detección inferiores; sin embargo CE acoplada a MS/MS permite además la identificación de los compuestos en estudio.

Finalmente, muestras de agua de distinta procedencia fueron analizadas por tres de los métodos propuestos, siguiendo en todos los casos el mismo tratamiento de muestra. Se observa que el método basado en el uso de la cromatografía líquida capilar permite obtener los límites de detección más bajos,

aunque la diferencia es pequeña con respecto a los límites obtenidos mediante electroforesis capilar con apilamiento de muestra de gran volumen.

Comparando a grandes rasgos los métodos propuestos con los existentes en bibliografía y que se recogen en la Introducción de esta Memoria, podemos señalar que:

- Las penicilinas usadas en esta Memoria han sido escasamente analizadas por electroforesis capilar zonal. Solamente hay dos trabajos publicados en los que esta técnica se aplica al análisis de muestras de leche, pero en ambos casos el número de compuestos analizado es bastante inferior al propuesto en nuestro caso. Tan sólo un método, aplicado a la determinación de OXA, CLOX y DICLOX, presenta límites de detección comparables a los obtenidos con los métodos propuestos; siendo en la otra publicación los límites de detección obtenidos muy superiores. No se ha encontrado ningún trabajo en el que se aplique esta técnica al análisis de muestras acuosas. Algo similar se puede decir en cuanto a carne de pollo, encontrándose un único método aplicado a carne de ave de corral y cerdo, que se limita al análisis de AMOX como antibiótico β -lactámico, aunque mezclado con antibióticos de otras familias. El límite de detección obtenido está por debajo del LMR establecido para este compuesto, en este tipo de matriz.
- El acoplamiento electroforesis capilar zonal con espectrometría de masas se propone solo en dos trabajos, uno aplicado al análisis de PENV junto con impurezas y productos de degradación, en un caldo de fermentación y otro que determina una mezcla de cuatro antibióticos β -lactámicos, cuatro sulfonamidas y cuatro quinolonas en muestras de pescado y animales domésticos, haciendo uso de la extracción en fase sólida dispersiva. De este modo, el acoplamiento CE-MS se plantea por primera vez en esta

Memoria como método para la determinación simultánea de un gran número de antibióticos β -lactámicos en alimentos de origen animal.

- La cromatografía capilar electrocinética micelar se ha usado también para el análisis de penicilinas, acoplada básicamente a la detección por absorción UV-Vis, aunque en bibliografía se ha encontrado también un método aplicado a la determinación de dos penicilinas y dos cefalosporinas en muestras de agua que usa la fluorescencia inducida por láser como sistema de detección, previa derivatización de los analitos con Cy5, consiguiendo límites de detección considerablemente bajos. En la mayoría de los casos las matrices utilizadas para la aplicación del método son preparados farmacéuticos, algunos de los métodos se aplican a fluidos biológicos o muestras ambientales, pero en ningún caso se analizan productos alimentarios ni se aplica a una mezcla con un número elevado de analitos, como es el caso del método presentado en esta memoria.
- Hasta la fecha no se ha encontrado ningún método que haga uso de la cromatografía líquida capilar para el análisis de compuestos β -lactámicos. No obstante, los buenos resultados obtenidos en nuestro caso en cuanto a sensibilidad, rapidez, resolución y escasa generación de residuos, garantizan su aplicación al análisis de estos compuestos en matrices muy diversas.

ABREVIATURAS



7-ACA : ácido 7-amino cefalosporánico

7-ADCA : ácido 7-amino-deacetoxi cefalosporánico

6-APA: ácido 6-amino penicilánico

AMOX: Amoxicilina

AMPI: Ampicilina

APCI: Ionización química atómica presurizada

ASPC: Aspoxicilina

BLs: β -lactamas

CAZ: Ceftazidima

CBPC: Carbenicilina

CCL: Cefaclor

CDN: Cefradina

CDX: Cefadroxil

CDZM: Cefodizima

CE: Electroforesis Capilar

CEP: Cefapirina

CFM: Cefepime

CFPM: Cefpiroma

CFX: Cefoxitina

CFZN: Cefazolin

CIPIC: 4-(2'-cianoisindolil)fenil-isotiocianato

ABREVIATURAS

CIPRO: Ciprofloxacina

CL: Quimioluminiscencia

CLIND: Hidroclorido clindamicina

CLIPHOS: Clindamicina fosfato

CLOXA: Cloxacilina

CLR: Cefaloridina

CLT: Cefalotina

CLX: Cefalexim

CMC: Concentración crítica micelar

CMD: Cefamandol

CMX: Cefmenoxim

CMZ: Cefmetazol

CMNX: Cefminox

CPDXPR: Proxetil cefpodoxim

CPIZ: Cefpimizol

CPL: Cefalin

CPLC: Cefalosporina C

CPM: Cefpiramide

CPZ: Cefoperazona

CQM: Cefquinoma

CSL: Cefsulodina

CTF: Cefotiofur

CTM: Cefotiam

CTRX: Ceftriazona

CTX: Cefotaxima

CXM: Cefuroxima

CZE: Electroforesis capilar zonal

CZX: Cefizoxima

DAD: Detección diodo-array

DCA: Acetamida- desfuroilcefotiofur

DCCD: Disulfido- desfuroilcefotiofur cisteina

DCFA: Ácido desfuroilcefotiofur libre

DECEP: Deacilcefapirina

DECTX: Deacilcefotaxima

DHS: Dihidroestreptomicina sulfato

DICLOX: Dicloxacilina

EOF: Flujo electroosmótico

ERYTHST: Estearato eritromicina

ESI: Ionización por electrospray

FASI: Inyección campo-amplificado

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IBU: Ibuprofeno

IPAD: Detección amperométrica pulsos integrados

ABREVIATURAS

IPM: Imipenem

LC: Cromatografía líquida

LIF: Fluorescencia inducida por laser

LINC: Hidroclorido lincomicina

LOD: Limite de detección

LOMX: Latamoxef

LOQ: Limite de cuantificación

LVVS: Apilamiento de muestra de gran volumen

MISPE: Extracción fase sólida impronta molecular

MEKC: Cromatográfica capilar electrocinética micelar

MEEKC: Cromatografía capilar microemulsión electrocinética

MLR: Niveles máximos de residuos

MPM: Meropenema

MS: Espectrometría de masas

MSC: Cromatografía multijeringa

NAFCI: Nafcilina

OXA: Oxacilina

PAA: Ácido fenil acético

PAPM: Panipenema

PENG: Penicilina G

PENV: Penicilina V

PG: Fenilglicina

PGM: Fenilglicine metil ester

PIPC: Piperacilina

POA: Ácido fenoxi acético

REPSM: Apilamiento modo polaridad inversa

RP: Fase reversa

RSD: Desviación estándar relativa

SBPC: Sulbenicilina

SDS: Dodecil sulfato sódico

SPE: Extracción fase sólida

SRM: Reacción selectriva monitorización

TCF: Tejido líquido interno

TET-ACA : Ácido 7-amino-3-((1-metil-tertrazol-5-il)-tiometil)-cefalosporanico

TIPC: Ticarcilina

UV: Ultravioleta

ANEXO



PUBLICACIONES



Short communication

Analysis of different β -lactams antibiotics in pharmaceutical preparations using micellar electrokinetic capillary chromatography

M.I. Bailón Pérez, L. Cuadros Rodríguez, C. Cruces-Blanco*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Received 3 March 2006; received in revised form 18 July 2006; accepted 18 July 2006

Available online 15 September 2006

Abstract

The potential of micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) for analyzing nine β -lactams antibiotics (cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, penicillin G, penicillin V, ampicillin, nafcillin, piperacillin, amoxicillin) in different pharmaceutical preparations, have been demonstrated. An experimental design strategy has been applied to optimize the main variables: pH and buffer concentration, concentration of the micellar medium, separation voltage and capillary temperature. Borate buffer (26 mM) at pH 8.5 containing 100 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) was used as the background electrolyte. The method was validated. Linearity, limit of detection and quantitation and precision were established for each compound. The analysis of some of the β -lactams in Orbenin capsules, Britapen tables and in Veterin–Micipen injectable, all used in human and veterinary medicine, have demonstrated the applicability of these technique for quality control in the pharmaceutical industry.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Antibiotics; Capillary electrophoresis; Pharmaceutical analysis**1. Introduction**

The term “antibiotic” is normally reserved for a very diverse range of compounds, both natural and semisynthetic, which are extensively used for the treatment and prevention of diseases in humans and animals because of their antibacterial activity. Among the different classes of antibiotics (penicillins, tetracyclines, macrolides, aminoglycosides and amphenicols) [1], the β -lactams and, specially, penicillins are the most widely used. Penicillins work against bacterial infections, inhibiting the formation of the cell wall in the susceptible bacteria and can be found, as residues, in the environment and in foodstuffs but, also, the production of composed drugs, always creates a challenge for the pharmaceutical drug control.

The modern analytical investigation of antibiotic drugs, content and purity estimation of active compounds, very often involves the use of high performance liquid chromatography (HPLC) [2–5] as separation technique coupled with different detection systems.

During the last years, different methods to analyze some β -lactams antibiotics in pharmaceutical preparations using HPLC have been published [6–8]. Despite good results are obtained, this technique has some disadvantages because it requires large amounts of high purity organic solvents, long system stabilization time and special sample preparation.

Trying to resolve most of the above-mentioned problems, a relative simple technique is progressively introduced and used alternatively to HPLC [9], named capillary electrophoresis (CE). This technique [10] has become one of the most powerful separation techniques for analysis of complex mixtures from biological and biomedical fields, environmental and food sciences and even public safety, as it has been extensively discussed in numerous reviews [11–15].

Due to the fact that the basic structure of penicillins is a thiazolidine ring connected to a β -lactam ring to which a side chain is attached, these compounds are neutral or weakly ionic molecules. For such a reason, the mode of CE most widely used to separate and analyze this type of compounds is micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) using sodium dodecyl sulphate (SDS) to form the micelles, and phosphate or borate solutions as the background electrolytes (BGE). The perspectives of MEKC in drug analysis were reviewed by Nishi and Terabe [16].

* Corresponding author.

E-mail address: mcruces@ugr.es (C. Cruces-Blanco).

In the literature, CE has not been very extensively applied to the analysis of β -lactams antibiotics. Most of the works found concerned with the application of MEKC to resolve penicillin mixtures in different matrices of environmental impact [17], or in biological samples [18,19]. The applications in pharmaceutical preparations for quality control are still even more scarce having found the work of Li et al. [20], which separated amoxicillin and 14 of its impurities in a commercial sample of amoxicillin sodium salt or the separation developed the separation of a complex mixture of 30 compounds of which 11 were β -lactams antibiotics (nine of which were penicillins) dissolved in deionized water in a MEKC system [21]. Another MEKC method was developed for the separation of ampicillin and its degradation products or the new CE analytical method evaluated and validated for determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical preparations [22].

In this paper, a capillary electrophoresis method with UV detection using MEKC methodology has been developed, for the first time, to separate and quantitate nine β -lactams anti-

otics (cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, penicillin G, penicillin V, ampicillin, nafcillin, amoxicillin and piperacillin) (Fig. 1). Its applicability has been carried out with the analysis of some of these compounds in different pharmaceutical preparations, being demonstrated its used to be applied in quality control [23–27].

2. Experimental

2.1. Chemicals and stock solutions

All chemicals and solvents were of analytical reagent grade (Sigma, St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide were obtained from Panreac-Quimica (Madrid, Spain). Hydrochloric acid was purchased from Scharlaub (Barcelona, Spain). Sodium tetraborate, sodium dodecyl sulphate were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Amoxicillin, ampicillin, nafcillin, cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, piperacillin, penicillin G, penicillin V and *p*-

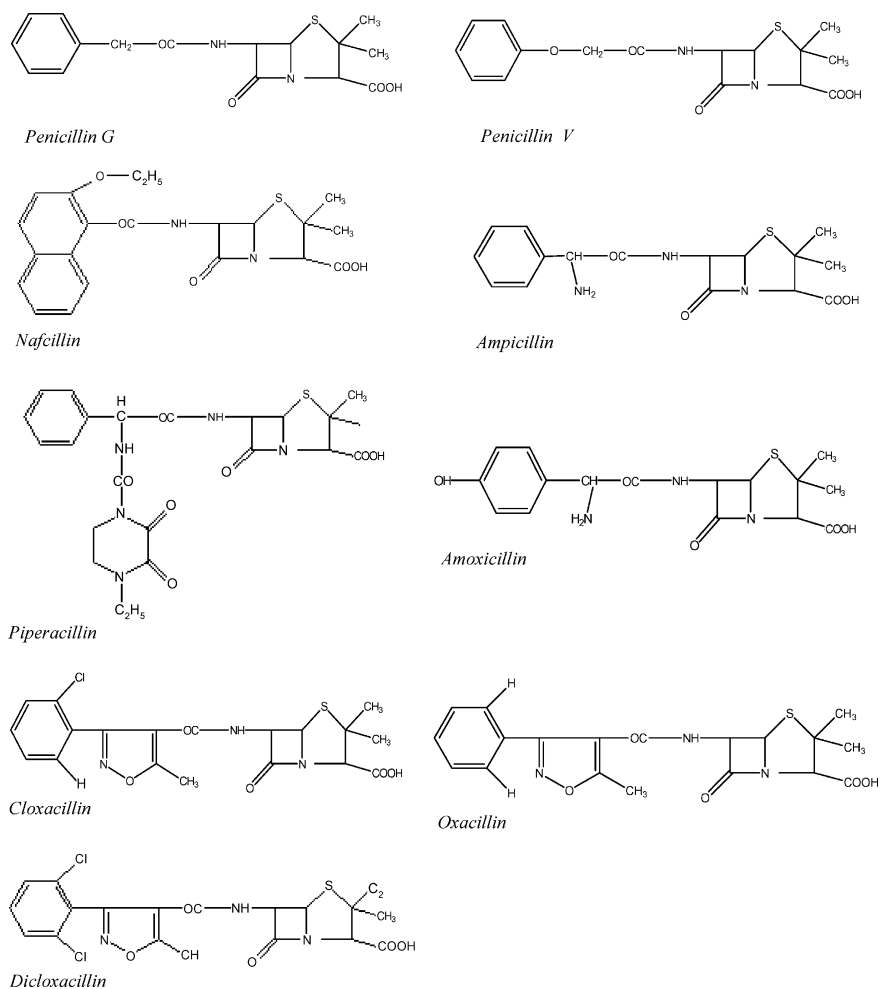


Fig. 1. Chemical structures of the studied β -lactams antibiotics.

aminobenzoic acid (PABA), used as internal standard (IS) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Deionized water ($18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$) was prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Individual standard stock solutions of each β -lactam antibiotic and PABA ($1000 \mu\text{g/ml}$) was prepared by dissolving the appropriate amount of each substance in deionized water. The working solutions were also prepared by appropriate dilution just before use. They were stored in the dark under refrigeration and the addition of ascorbic acid ($20 \mu\text{g/ml}$) was carried out to avoid possible decomposition. Under these conditions, they were stable for, at least, 2 months.

2.2. Instrumentation and statistic software

CE experiments were carried out with a HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with a diode-array detector. Data were collected using the software provided with the HP ChemStation, Version A.O9.01. Analytes were monitored at 220 nm. Separation was carried out in a silica fused capillary $64.5 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ i.d. (effective length 56 cm) in normal mode, applying a voltage of 20 kV. For pH measurements, a pH meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) was employed.

Samples injections were made in a hydrodynamic mode over 5 s under a pressure of 50 mbar. The capillary temperature was 30°C .

When a new capillary was used, it was rinsed by passing the following solutions: H_2O Milli-Q for 5 min, 0.1 M NaOH for 5 min, H_2O Milli-Q for 5 min and finally flushed with running buffer for 15 min. Before each analysis, the capillary was flushed with NaOH for 2 min, H_2O Milli-Q for 2 min, and with running buffer for 2 min.

The electrophoretic solution was prepared by adjusting the pH of a 26 mM sodium tetraborate buffer solution with 100 mM SDS to 8.5 with 1 M hydrochloric acid. This background electrolyte was filtered before use through a $0.2 \mu\text{m}$ PTFE membrane (Millex-GN, Millipore).

For the estimation of the regression model and for the application of experimental designs in the multioptimization procedure, STATGRAPHICS was used. Peak purity evaluation was carried out by CHEMSTATION software.

2.3. Pharmaceutical analysis

Britapen tablets Reig Jofré, S.A. (Spain) and Orbenin capsules (GlaxoSmithkine, S.A., Spain) were purchased from a local drugstore while Veterin–Micipen injectable were supplied by veterinarian and are produced by Intervet, S.A. (Spain).

For the analysis of Britapen tablets, 10 units were weighed, ground in a mortar and, finally, an adequate amount of the solid was taken and dissolved in an approximate volume of 75 ml with deionized water, and dissolved by immersion in an ultrasonic bath for 20 min and filtered through a filter paper. The filtrate was diluted with deionized water to a final volume of 100 ml. For CE analysis, $12 \mu\text{l}$ of this solution was spiked with $140 \mu\text{l}$ of a *p*-aminobenzoic acid solution ($1000 \mu\text{g/ml}$) and completed

with deionized water to a final volume of 10 ml, obtaining concentrations of $12 \mu\text{g/ml}$ of ampicillin and $140 \mu\text{g/ml}$ PABA.

For the analysis of Orbenin capsules, three units were taken and dissolved in an approximate volume of 75 ml with Milli-Q water and dissolved by immersion in an ultrasonic bath for 20 min and filtered through a filter paper. The filtrate was diluted with deionized water to a final volume of 100 ml. For CE analysis, $10 \mu\text{l}$ of this solution was spiked with a PABA solution ($1000 \mu\text{g/ml}$) and completed with deionized water to a final volume of 10 ml, obtaining concentrations of $5 \mu\text{g/ml}$ of cloxacillin and $14 \mu\text{g/ml}$ of PABA.

Finally, the sample preparation for Veterin–Micipen injectables, was carried out diluting the solution of an injectable in an approximate volume of 75 ml with deionized water, then dissolved by immersion in an ultrasonic bath for 15 min and filtered through a filter paper. The filtrate was diluted with deionized water to a final volume of 100 ml. For CE analysis, $18 \mu\text{l}$ of this solution was spiked with $140 \mu\text{l}$ of *p*-aminobenzoic acid ($1000 \mu\text{g/ml}$) and completed with deionized water to a final volume of 10 ml, obtaining concentrations of $18 \mu\text{g/ml}$ of penicillin G and $14 \mu\text{g/ml}$ of PABA.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of electrophoretic variables

In order to select the best conditions and internal standard, the electrophoretic behaviour of each of the substances was studied using an experimental design strategy, which has been applied to optimize the main variables that could influence the separation and simultaneous quantification of the nine β -lactams antibiotics using the MEKC methodology: pH and concentration of the running buffer, concentration of the micellar medium, the separation voltage and the capillary temperature.

A face-centered Draper–Lin small composite design with four central points and 20 runs [28–30], scarcely applied in analytical chemistry, was selected as response surface design because of the number of levels are adequate for the variable ranges and because of their high efficiency compared with other composite design. Draper–Lin strategy reduces the number of points of the factorial design [31], obtaining a so-called “small composite design”, for which a minimum experimental work is required to calculate the coefficient of the mathematical function for the response surface [31–33].

The criterion to select the optimum values for the electrophoretic variables under study was based on obtaining a maximum for a multiple response function established as a combination of the corresponding efficiencies for the nine antibiotics to obtain the best resolution of all of them in the shortest analysis time possible.

The experimental domain for the study of the selected variables was defined based on different considerations [34]. In order to predict the optimum pH range for the separation of all the β -lactams antibiotics under study, it was necessary to identify the pH values, at which the differences between their mobility was greatest.

Because it was observed that at pH values below 8, an inadequate resolution was obtained, the present design was studied varying the pH in the range from 8 to 11.

In order to predict the optimal buffer solution for carry out the separation of the compounds in these pH ranges, it was necessary to select concentration and composition of buffer at which the differences between the mobilities of the studied substances, were greatest. Buffer solutions such as borate, ammonium acetate, glycine, sodium carbonate, citrate and phosphate were proved, selecting borate buffer for giving the best results. Borate buffer concentration was modified between 20 and 150 mM in order to obtain the better resolutions of the compounds and adequate current, avoiding the Joule effect.

The addition of a micellar media to the electrophoretic buffer was taken into account because some of the drugs have very similar migration times and, therefore, it was not possible to develop a CE method with the capillary zone electrophoretic procedure (CZE) for which it was necessary to introduce a micellar media to modify the viscosity of the electrophoretic medium and, resulting in working with the MEKC methodology. The

micellar medium most widely used in this type of methodology is sodium dodecyl sulphate (SDS) trying with concentrations ranging from 50 to 150 mM.

The separation voltage [35,36] was modified between 10 and 25 kV so as to obtain a good compromise between good separation and analysis time. The separation temperature was varied around room temperature to avoid temperature gradients in the capillary.

All the runs of the experimental design were carried using working solutions containing between 5 and 300 µg/ml for each β-lactam antibiotic. The matrix of experiments corresponding to this design is shown in Table 1.

From the multioptimization procedure [37–39], pH, buffer concentration and separation voltage were found significant on efficiency with optimum values of 26 mM borate buffer at pH 8.5 in presence of 100 mM SDS and carrying out the separation at 25 kV with a capillary temperature of 30 °C.

Under these conditions, a good resolution was achieved (higher than 1.5), obtaining the separation of the nine β-lactams antibiotics in 22 min. Fig. 2 shows the separation of the nine selected compounds at the optimum conditions.

Table 1

Experimental design showing the real and coded levels for all the studied variables in the optimization of the separation of nine β-lactams antibiotics under study

Runs	pH	Voltage (kV)	Buffer concentration (mM)	[SDS] (mM)
1	10.25 (1)	22.5 (1)	50 (1)	75 (−1)
2	8.75 (−1)	22.5 (1)	50 (1)	125 (1)
3	8.75 (−1)	17.5 (−1)	50 (1)	75 (−1)
4	10.25 (1)	17.5 (−1)	30 (−1)	125 (1)
5	8.75 (−1)	22.5 (1)	30 (−1)	125 (1)
6	10.25 (1)	17.5 (−1)	50 (1)	125 (1)
7	10.25 (1)	22.5 (1)	30 (−1)	75 (−1)
8	8.75 (−1)	17.5 (−1)	30 (−1)	75 (−1)
9	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
10	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
11	8.44 (−1.41)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
12	10.56 (1.41)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
13	9.5 (0)	16.5 (−1.41)	40 (0)	100 (0)
14	9.5 (0)	23.5 (1.41)	40 (0)	100 (0)
15	9.5 (0)	20 (0)	26 (−1.41)	100 (0)
16	9.5 (0)	20 (0)	54 (1.41)	100 (0)
17	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	64.75 (−1.41)
18	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	135.3 (1.41)
19	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)
20	9.5 (0)	20 (0)	40 (0)	100 (0)

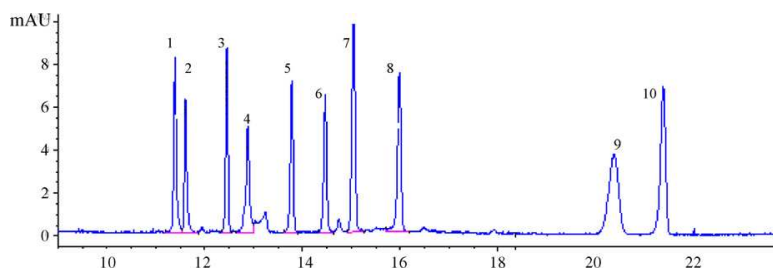


Fig. 2. MEKC separation of the nine β-lactams antibiotics and the internal standard *p*-aminobenzoic acid (PABA) under optimized conditions: pH 8.5 using 26 mM sodium tetraborate buffer containing 100 mM SDS. Separation voltage: 20 kV; capillary temperature: 30 °C. (1) ampicillin; (2) amoxicillin; (3) penicillin G; (4) piperacillin; (5) oxacillin; (6) penicillin V; (7) PABA; (8) cloxacillin; (9) nafcillin; (10) dicloxacillin.

In all cases, *p*-aminobenzoic acid (PABA) was chosen as internal standard because it is stable, commercially available in a high purity form, inexpensive, non-toxic and possessing acceptably high UV activity at the desired wavelength, giving good peak shape.

3.2. Calibration curves

Six calibration standard solutions corresponding to 1.5, 4, 8, 12, 16 and 20 mg/l were prepared for amoxicillin, 1, 5, 10, 15, 20 and 30 mg/l for ampicillin, 0.8, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/l for cloxacillin, dicloxacillin and oxacillin, 0.8, 1, 2, 3, 4 and 5 mg/l for nafcillin, 1.5, 5, 10, 15, 20 and 30 mg/l for penicillin G and piperacillin and 1, 4, 8, 12, 16 and 20 mg/l was prepared for penicillin V; and spiked with a constant concentration of *p*-aminobenzoic acid used as internal standard (IS). Two replicates were prepared at each concentration level and each was injected in triplicate. Calibration curves were established by considering the relative corrected peak height as a function of the analyte standard concentration. Performance characteristics, calculated from the calibration data set for each compound as well as the calibration parameters obtained from the least-square regression are listed in Table 2.

The *P*-values for the lack of-fit test ($\alpha = 0.05$) show absence of curvature. The linearity (expressed as relative standard deviation (R.S.D.)) of slope was satisfactory in all cases.

3.3. Detection and quantitation limits

The limit of detection (LOD) was determined by using three times the standard deviation of the intercept divided by slope of each calibration curve. The limit of quantification (LOQ) was calculated by using 10 times the standard deviation of the intercept divided by the slope. Numerical data of the LOD and LOQ for the analyzed antibiotics are collected in Table 2.

Standard deviation of residuals was obtained by analysis of variance (ANOVA) in validation of the calibration model. The proposed methods allow β -lactams antibiotics to be determined with LODs between 0.35 and 1.42 mg/l.

The detection limits obtained in this work are low enough to determine concentrations of the studied antibiotics in numerous matrices where they could be found, such as environmental

media, veterinary residues, foodstuffs or in pharmaceutical quality control.

3.4. Precision

The precision of relative corrected areas was evaluated with mixed standard solutions at three concentration levels (10, 20 and 30 mg/l of each compound) under repeatability and intermediate precision (interday) conditions. For repeatability studies, five replicate experiments were carried out on the same day. For intermediate precision, three replicate experiments were carried out on each of 5 days using the same stock buffer solution. The results, expressed as the relative standard deviation (R.S.D.) of relative corrected areas are given in Table 2. The mean migration times obtained from intermediate precision conditions was 11.3 min (1.7% R.S.D.) for ampicillin, 11.7 min (1.7% R.S.D.) for amoxicillin, 12.5 min (1.5% R.S.D.) for penicillin G, 13 min (1.6% R.S.D.) for piperacillin, 13.7 min (1.7% R.S.D.) for oxacillin, 14.5 min (1.5% R.S.D.) for penicillin V, 15 min (1.8% R.S.D.) for PABA (as internal standards), 16 min (1.7% R.S.D.) for cloxacillin, 20.2 min (1.7% R.S.D.) for nafcillin and 21.5 min (1.5% R.S.D.) for dicloxacillin, concluding that the proposed method at the studied concentrations provided acceptable precision.

3.5. Application of the proposed method in pharmaceutical preparations

Pharmaceutical containing β -lactams antibiotics both for human or animal use, are commercialized under different presentations such as capsules, tables and injections.

To demonstrate the applicability of the present methodology for the analysis of different β -lactams antibiotics in different presentations, three pharmaceutical preparations: Orbenin capsules that contains as active principle cloxacillin; Britapen tablets, whose active principle is ampicillin. These two pharmaceutical preparations are used in humans for the treatment of diverse types of infections by staphylococcus, such as mastitis, wounded and infected burns, endocarditis, meningitis, infections of the breathing tract, urinal and genito-urinal tract.

Also, the determination of another of the studied antibiotics, penicillin G, in an injectable named Veterin–Micipen which is

Table 2
Statistics and performance characteristics of the proposed method

Antibiotic	Linearity range (mg/l)	Calibration parameters			LOQ (mg/l)	LOD (mg/l)
		Intercept	Slope	R^2 (%)		
Amoxicillin	1.5–20	−0.19	0.40	99.31	2.73	0.82
Ampicillin	1–30	0.34	0.23	99.23	3.10	0.93
Cloxacillin	0.8–10	−0.28	0.73	99.27	1.18	0.36
Dicloxacillin	0.8–10	−0.10	0.62	99.14	1.27	0.38
Nafcillin	0.8–5	−0.01	0.65	99.63	1.18	0.35
Oxacillin	0.8–10	−0.14	0.65	99.11	1.23	0.37
Penicillin G	1.5–30	−0.16	0.27	99.19	3.03	0.91
Penicillin V	1–20	0.08	0.32	98.94	2.69	0.81
Piperacillin	1.5–30	−0.21	0.24	99.16	5.74	1.42

Table 3
Composition of the pharmaceutical preparations and recovery results

Presentation	Source	Composition	Values		Recovery (%)
			Nominal ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	
Orbenin (capsules)	GlaxoSmithkline, S.A.	Cloxacillin (sodium salt, monohydrate); magnesium stearate	500	478	95.6
Britapen (tablets)	Reig Jofré, S.A.	Ampicillin (trihydrate); magnesium stearate; cellulose	1000	923	93
Veterin–Micipen (injections)	Intervet Laboratory, S.A.	Penicillin G (potassium salt); Penicillin G; procaine; dihydrostreptomycin sulphate	600	546	91

specially used in animals for the treatment of mastitis, metritis and pneumonia, have been carried out.

Table 3 shows the composition of the pharmaceutical preparations analyzed, their presentation, manufacturing source and the recoveries obtained using the MEKC conditions selected for each compound. The content of each analyte in the pharmaceutical formulations was determined by triplicate injections of three independently prepared solutions.

As can be observed in Table 3, the recoveries obtained for all compounds studied in the different preparations were close to 100%, with values ranging from 93 to 96%, which agree with the tolerances indicated by the USP pharmacopoeia [40]

Determinations were made in triplicate for each sample. The results obtained are summarized in Table 3, showing good results in the application of the method to the quality control of pharmaceutical preparations containing antibiotics of the β -lactam group that are used intensely in dairy farming, particularly to combat mastitis or in numerous human infections. It is important to notice that the determination of these antibiotics in the pharmaceutical preparations cited above was directly carried out without any pre-concentration step or interference from the different excipients present together with the three active compounds.

4. Conclusions

A new MEKC method with UV detection has been developed for quantitative determination of nine antibiotics of the β -lactam group, described for the first time, for its determination in different pharmaceutical preparations, demonstrating that CE is a good alternative to HPLC methods because it is simple, cheaper and offers short analysis times with very similar analytical characteristics.

Acknowledgement

The National Institute of Agricultural and Food Research and Technology (INIA; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Project Ref. CAL 03-096-C2-2) and EU fund supported this work.

References

- [1] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A. Hewitt, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 77–98.
- [2] T. Heberer, S. Butz, H.J. Stan, *J. Environ. Anal. Chem.* 58 (1995) 43–53.
- [3] Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, T. Kagami, K. Takeba, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 247–253.
- [4] G. Pajchel, K. Pawlowski, S. Tyski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 75–81.
- [5] K.-H. Yoon, S.-Y. Lee, W. Kim, J.-S. Park, H.-J. Kim, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 121–127.
- [6] J.C. García-González, R. Mendez, J. Martín-Villacort, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 197–204.
- [7] S. Horimoto, M. Shingo, A. Tsuyoshi, N. Keiichi, S. Noriyuki, T. Sato, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1093–1102.
- [8] S. Riediker, A. Rytz, R.H. Stadler, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 359–363.
- [9] P. Kowalski, I. Olędzka, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937–947.
- [10] S. Hu, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2833–2850.
- [11] K.D. Altria, *J. Chromatogr.* 646 (1993) 245–257.
- [12] C.A. Mommings, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* 66 (1994) 280R–314R.
- [13] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 22 (2001) 4249–4261.
- [14] F.-M. Matysik, *Electrophoresis* 23 (2002) 400–407.
- [15] A. Di Corcia, M. Nazzari, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 53–89.
- [16] H. Nishi, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 3–27.
- [17] L. Nozal, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 21–28.
- [18] M. Hernández, F. Borrull, M. Callul, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416–427.
- [19] M. Hernández, F. Borrull, M. Callul, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 309–315.
- [20] Y.M. Li, A. Van Schepdael, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 227–236.
- [21] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 97–104.
- [22] G. Pajchel, K. Pawlowski, S. Tyski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 75–81.
- [23] J. Demonty, De la penicilline aessor des B: lactamines *Reu Med Liege* 51 (1996) 47–49.
- [24] Penicilins systemic. *Drug Information for the Health Care Professional*, vol. 1, 1994, pp. 751–777.
- [25] B. Barnes, N. Nimphius, *Antibiotic Guide*, Wisconsin Medical College, 1996.
- [26] V. Calderón, J.A. Berenguer, J. González, P. Díez, Post-screening of antibiotic residues in meat and kidney samples, in: N. Haagsma (Ed.), *EuroResidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, Veldhoven, 6–8 May, 1996, pp. 305–309.
- [27] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, *Carme Aguilar, Electrophoresis* 26 (2005) 954–961.
- [28] R. Draper, *Technometrics* 27 (1985) 173–180.
- [29] N.R. Draper y, D.K.J. Lin, *Technometrics* 32 (1990) 187–194.
- [30] R.L. Plackett y, J.P. Burman, *Biometrika* 33 (1946) 305–325.
- [31] *Statgraphics Plus 5.0*, Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., Rockville, USA, 2000.
- [32] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García-Campaña y, J.M. Bosque Sendra, *Anal. Lett.* 29 (1996) 1231–1239.
- [33] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Schiewe, A. Härtl, *J. Chromatogr. B* 690 (1997) 321–326.

- [34] Y.M. Li, D. Vanderghinste, D. Pecanac, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Electrophoresis* 19 (1998) 2890–2894.
- [35] A. Van Schepdael, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 303–311.
- [36] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *Electrophoresis* 23 (2002) 506–511.
- [37] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 20 (1999) 3269–3279.
- [38] Y. Zhu, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 417–422.
- [39] Y.M. Li, A. Van Schepdael, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 227–236.
- [40] Real Farmacopea Española (RFE). Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.

M. Isabel Bailón-Pérez
Ana M. García-Campaña
Carmen Cruces-Blanco
Monsalud del Olmo Iruela

Department of Analytical
Chemistry,
Faculty of Sciences,
Campus Fuentenuueva,
University of Granada,
Granada, Spain

Received April 21, 2007
Revised June 13, 2007
Accepted June 21, 2007

Research Article

Large-volume sample stacking for the analysis of seven β -lactam antibiotics in milk samples of different origins by CZE

A method for the simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics (nafcillin, cloxacillin, oxacillin, dicloxacillin, ampicillin, amoxicillin, and penicillin G) in fortified milk samples of different origins has been proposed by using CZE with diode-array detection (CZE-DAD). Optimum separation was obtained on a 64.5 cm \times 75 μ m bubble cell capillary using 175 mM Tris buffer with 20% ethanol at pH 8.0. Methylparaben has been used as an internal standard (IS). Taking into account the lack of sensitivity of the UV-Vis detection, a solvent extraction/SPE method was applied for off-line preconcentration and sample cleanup, and also an on-line preconcentration methodology, such as large-volume sample stacking (LVSS) with polarity switching, was developed, providing LODs ranging from 2 to 10 μ g/L. The method permits the quantification of these residues below the levels established in milk by the EU Regulation. Satisfactory recoveries ranging from 86 to 93% were also obtained in milk samples of different origins.

Keywords:

CZE / β -Lactam antibiotics / Milk / Sample stacking DOI 10.1002/elps.200700305

1 Introduction

β -Lactam antibiotics, including penicillins and cephalosporins, are widely used as pharmaceutical compounds in veterinary and human medicine. In veterinary practice, they are used for disease treatment and prevention, resulting in the presence of residues in edible tissues or derived products which can lead to health problems for individual who are hypersensitive, increasing also the incidence of microbial resistance against the compounds [1]. The most frequent use of these antibiotics in the dairy industry is to combat mastitis-causing pathogens, a disease which produces significant economic losses. The EU Directive (96/23/CE) [2] established the control measures and the alert plans which has to be applied for the detection of special substances and their residues, potentially toxic for the consumer, in animals alive or products of animal origin used in human feeding. The maximum residue limits (MRLs) of these substances in foodstuffs of animal origin, including β -lactam antibiotics, are established in 2377/90/EEC Regulation [3].

Microbiological assays are the most commonly used techniques to detect antibiotics in foods, providing an accept/reject decision at the farm level. However, their lack of specificity and precision makes them not suitable for quantification and/or individual identification of antibiotics [4]. Thus, sensitive multiresidue methods are required. HPLC has been mainly used to analyze antibiotics in different matrices, usually coupled with MS, as is shown in some review articles [5–8]. Specifically, some methods have been established for the analysis of β -lactams in milk, using mainly UV detection [9, 10] or MS [9, 11–17]. CE is becoming a useful alternative technique in this field due to simplicity, short separation times, and lower consumption of reagents and solvents. Some reviews have included the applications of CE in the analysis of antibiotics [18–23]. MEKC has been applied to the simultaneous separation of several penicillins together with sulfonamides [24], to the control of amoxicillin and its impurities in a commercial formulation [25] and in plasma [26], to the separation of ampicillin and its degradation products [27], to the screening of penicillin compounds in farm water samples [28], to the separation of cephadrine and its main impurity, cephalixin, in drugs [29], to the determination of piperacillin in drugs [30] or benzilpenicillin salts [31], and for the analysis of nine compounds in pharmaceutical preparations [32]. Capillary ITP has been applied for the analysis of penicillins and cephalosporins in pharmaceutical preparation [33]. Also, CZE has been used for the analysis of penicillin G [34] and amoxicillin [35] together with other veterinary drugs. UV and electrospray-MS detection have

Correspondence: Professor Ana M. García-Campaña, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuentenuueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: amgarcia@ugr.es
Fax: +34-958-249510

Abbreviations: IS, internal standard; LVSS, large-volume sample stacking; MRL, maximum residue level

been applied for the separation of penicillin V and related substances by CE in a real fermentation broth. Aqueous and nonaqueous electrolytes were investigated concluding that best results in term of selectivity and sensitivity were obtained in aqueous solution [36]. Using a sheathless interface for coupling CE to MS, a mixture of nine-peptide standard solution containing bacampicillin and ampicillin was resolved, studying the parameters that influence the separation and the stability of the spray [37]. Recently, a CZE-DAD method has been proposed for the simultaneous screening of six antibiotics, including four penicillins (penicillin G, amoxicillin, ampicillin, and cloxacillin) in milk, using phosphate/borate buffer pH 8 and C₁₈ SPE cartridges [38]. However, the obtained LODs were between 0.48 and 1.09 mg/L (higher than the MRLs for these compounds in milk) and amoxicillin could not be quantified because of the low recovery indices obtained.

Taking into account the requirements imposed by EU Directive in relation to the low MRLs for these type of compounds in foods of animal origin, including milk, and considering the limited sensitivity usually inherent to CE methods using UV-Vis detection, online sample preconcentration procedures have shown to be useful for determining analytes at low concentrations. Among the different modes [39–45], the simplest one is normal stacking mode (NSM), which is done by dissolving the sample in a low-conductivity matrix and by injecting the resulting sample solution hydrodynamically. Focusing happens at the interface between the low-conductivity matrix and the buffer due to the abrupt change in electrophoretic velocity. A limitation of NSM is the short optimum sample plug length that can be injected into the capillary without loss of separation efficiency or resolution [20]. Large-volume sample stacking (LVSS) [46], also named "stacking matrix removal", implies the introduction of a volume greater than the found one as optimum in NSM. In this case, the sample matrix is pumped out from the capillary in order to preserve separation efficiency. Pumping is carried out with external pressure or with EOF, being the direction of pumping always opposite to the electrophoretic movement of charged solutes and its velocity lower than the electrophoretic velocity of the charged solutes. Using this strategy, only positive or negative solutes can be effectively concentrated at one time. Concentration factors of more than 100 are reported for LVSS, improving LOD from two orders of magnitude. For the case of anions, LVSS with polarity switching is a mode that permits to control the EOF in CZE separations involving high EOF conditions to carry the separate analytes to the detector. This is done by introducing hydrodynamically a large plug of low-conductivity sample into the capillary and applying negative voltage at the injection end. The large solvent plug is then electroosmotically pushed out the capillary while the negative species stack-up at the boundary between the sample zone and the BGE. Once the main part of the low-conductivity zone has been pushed out of the capillary, the positive voltage is applied to carry out the separation. This methodology, slightly modified, has

been used for the analysis of eight penicillins by using MEKC (also named reverse electrode polarity stacking mode, REPSM), but no application to real samples has been developed [47]. Field-amplified sample injection (FASI) has been also applied for the CZE analysis of amoxicillin in plasma [26] and LVSS was applied for the detection of oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin in milk using an electrolyte containing 2-hydroxypropyl- β -CD [48].

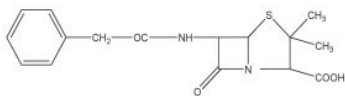
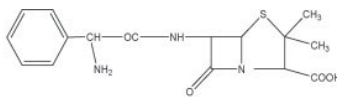
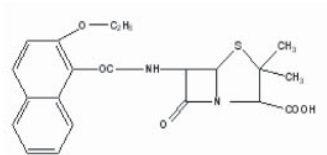
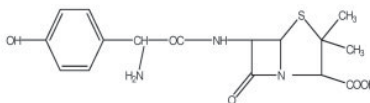
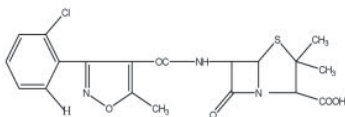
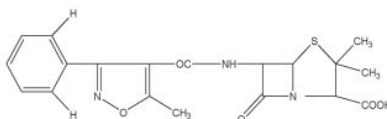
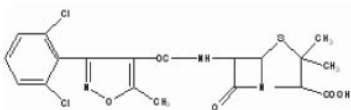
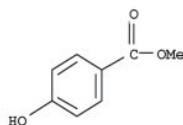
In this paper, we have developed a new method for the extraction and sensitive determination by CZE of seven very commonly used β -lactam antibiotics in milk, such as nafcillin, cloxacillin, oxacillin, dicloxacillin, ampicillin, amoxicillin, and penicillin G, which MRLs are regulated by the EU. Their chemical structures are shown in Fig. 1. Off- and on-line preconcentration steps have been developed and applied for the simultaneous analysis of these compounds by CE, improving significantly the detection limits. The combination of an adequate SPE procedure with the selection and optimization of a LVSS procedure and the use of a bubble cell capillary permit the accurate quantitative determination of these β -lactam antibiotics. This SPE-LVSS-CZE method is to the best of our knowledge the first proposal of the combination of CZE with a stacking procedure for the sensitive multiresidue analysis of such a high number of β -lactams in milk samples.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and solvents

All reagents were of analytical reagent grade, unless indicated otherwise. Ultrapure water (Milli-Q plus system, Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the work. The organic solvents employed, such as ACN and methanol, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and were of HPLC grade.

The running buffer was prepared from Tris supplied by Merck and the pH was adjusted to 8 with 1 M sodium hydroxide obtained from Panreac-Química (Madrid, Spain). The buffer used for the sample preparation was a sodium dihydrogen phosphate 1-hydrate solution prepared by dissolving 1.2 g of the product, supplied by Panreac-Química, in a volume of 100 mL of deionized water and adjusted to pH 8.5 with 1 M NaOH. The antibiotics nafcillin, CAS [147-52-4], dicloxacillin, CAS [3116-76-5], cloxacillin, CAS [61-72-3], oxacillin, CAS [66-79-5], ampicillin, CAS [69-53-4], penicillin G, CAS [61-33-6], amoxicillin, CAS [26787-78-0], were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Stock standard solutions (1000 μ g/L) of each compound were prepared by dissolving the appropriate amount of each substance in deionized water, stored at 4°C in the dark, and then diluted to the desired concentration prior to use. In such conditions, they were stable for at least 2 months. Methylparaben, used as internal standard (IS), was also purchased from Sigma. A stock solution of 500 μ g/L of the IS was prepared by dissol-

*Penicillin G* $pK_a = 2.5$ *Ampicillin* $pK_{a1} = 2.4$ $pK_{a2} = 6.8$ *Nafcillin* $pK_a = 2.4$ *Amoxicillin* $pK_{a1} = 2.4$ $pK_{a2} = 6.9$ *Cloxacillin* $pK_{a1} = 2.4$ *Oxacillin* $pK_a = 2.4$ *Dicloxacillin* $pK_a = 2.4$ *Methylparaben (I.S.)* $pK_a = 8.30$ **Figure 1.** Chemical structures of the studied β -lactam antibiotics and methylparaben (used as IS).

ving 500 µg of the product in 1 L of water. The solution was stable for at least 1 month. This IS was chosen because it is stable, commercially available in a high-purity form, inexpensive, nontoxic, and possessing acceptable high UV activity at the working wavelength, giving good peak shape and not increasing the analysis time.

Extraction cartridges containing an Oasis[®] hydrophilic-lipophilic balance (HLB; 60 mg, 3 cc; Waters, Milford, MA, USA) and laboratory-made cartridges with Alumina N (500 mg, 3 cc; E. Merck) were used.

2.2 Instrumentation

All CE experiments were carried out on an HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a DAD. Data were collected using the software provided with the HP ChemStation version A.09.01. Electrophoresis experiments were performed in a 64.5 cm × 75 µm id, uncoated fused-silica capillary with an optical path length of 200 µm (bubble cell capillary from Agilent Technologies) and an effective length of 56 cm.

For pH measurements, a pH meter (Crison model pH 2000; Barcelona, Spain) was employed with a resolution of ±0.01 pH unit. The extraction and preconcentration processes were achieved with a vacuum manifold system from Supelco (Bellafonte, PA, USA) coupled with a vacuum pump (Büchi model B-121; Switzerland). A vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA) and a Hettich Centrifuge (Universal 32; Germany) were used for the preparation of the samples.

2.3 Electrophoretic procedure

Before the first use, the new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 10 min, then with deionized water for 10 min, and finally with the BGE solution for 15 min. A N₂ pressure of 7 bar was applied. Before each run, the capillary was prewashed with 0.1 M NaOH, at a N₂ pressure of 7 bar for 3 min, then with deionized water for other 3 min, and finally with the running buffer for 5 min. After each run, the capillary was flushed for 1 min with 0.1 M NaOH, 1 min with deionized water, and, finally, 2 min with the running buffer at a pressure of 7 bar to maintain an adequate reproducibility of run-to-run injections. At the end of the day, the capillary was cleaned with 1 M NaOH for 2 min, then with deionized water for 5 min and finally flushed with air for 3 min.

The antibiotics were analyzed using a BGE consisting of an aqueous solution of 175 mM Tris adjusted to pH 8 with HCl 1 M and containing 20% v/v ethanol. A voltage of 25 kV (normal mode) was applied. All the β-lactam antibiotics were monitored at 220 nm with a bandwidth of 16 nm. The temperature of the capillary was kept constant at 30°C. Samples were introduced by hydrodynamic injection at a N₂ pressure of 7 bar for 1 min. Injection of the sample occurred using the following LVSS procedure.

Methylparaben was used as IS because better precision was achieved for the LVSS procedure and also in the analysis of real samples.

2.4 LVSS procedure

Firstly, standard solutions or samples containing the analytes were loaded at a pressure of 7 bar for 1 min into the electrophoretic system so that the whole capillary was filled with the sample solution. Water was used as the sample solvent to produce a low-conductivity analyte matrix. A negative voltage (−20 kV) was then applied and the sample stacking started. Sample matrix removal from the capillary was indicated by monitoring the electric current, which progressively increased to its normal value as the low-conductivity injected zone was eliminated from the capillary. When the 95% of the normal current was reached, the voltage was stopped and at this stage, the stacking process could be considered complete. A positive voltage (25 kV) was then applied to separate the compounds.

2.5 Preparation of milk samples for analysis

Bovine raw milk was purchased from Puleva Biotech (Granada, Spain), bovine skimmed milk was purchased from a local market, and goat raw milk was purchased from a local farm (Granada, Spain).

A sample treatment for extraction, preconcentration, and cleanup has been developed based on a one previously reported [11] and carefully optimized and adapted in order to obtain satisfactory recoveries. It consists of the use of ACN for sample extraction and SPE cartridges for sample cleanup. A sample aliquot of 5 mL of milk was spiked with different concentration levels of β-lactam antibiotics. After spiking and homogenizing, 5 mL of ACN was added and the samples were vortexed for 1 min. Additional ACN (10 mL) was added, followed by mixing for 1 min. The sample was centrifuged at 1800 rpm for 5 min, and the clear extract was transferred to a glass tube. The extract was evaporated to approximately 0.5 mL using a stream of N₂ at 60°C, then 3 mL of phosphate buffer (pH 8.5) was added and the sample was mixed by vortex mixer for 1 min.

Therefore, two different SPE cartridges were selected in order to clean up and concentrate the samples. The first one was an Oasis HLB cartridge in which the analytes were retained. It was previously washed sequentially with 5 mL of methanol, 10 mL of ACN, 5 mL of deionized water, and 3 mL of phosphate buffer at pH 8.5. Without using vacuum, the sample extract was passed through the column. The antibiotics were eluted with 6 mL of ACN at 1–2 mL/min, using a vacuum manifold. The eluate was passed through the second cartridge, an Alumina N, which is a polar sorbent SPE cartridge which allows a sample cleanup, at a flow rate of approximately 1 mL/min. The β-lactam antibiotics were eluted with 3 mL of deionized water. This final solution was evaporated to dryness under a gentle N₂ current at 60°C, and then

reconstituted with 1 mL of deionized water containing the IS. With this optimized procedure, the highest recoveries (ranging from 95 to 99%) were obtained in the simultaneous extraction of the studied compounds.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of CE experimental conditions

All the preliminary studies were focused on the optimization of the experimental parameters affecting the CE separation of the target compounds by UV–Vis detection. The UV–Vis spectra of the analytes were registered choosing a wavelength of 220 nm with a bandwidth of 16 nm for monitoring the selected β -lactams. With the aim to increase sensitivity, we used a 64.5 cm \times 75 μ m id uncoated fused-silica capillary with an optical path length of 200 μ m (bubble cell capillary). To optimize the separation, the influence of the running buffer nature, its concentration and the pH were studied. The pH of the running electrolyte is one of the critical factors in resolution due to its impact on EOF in a fused-silica capillary, and the possible effect on solute charge altering relative migrations. Resolution can be improved by reducing EOF or by increasing the difference in the electrophoretic mobility of analytes. This can be achieved by changing pH and composition of the buffer. The effect of pH value on the resolution was investigated over the range of pH 7–10, using different buffers (ammonium acetate, 100 mM; ammonium carbonate, 60 mM; sodium tetraborate, 60 mM; Tris, 150 mM). Values of pH lower than pH 7.0 did not produce minimum separation for the studied compounds. The best resolution was obtained using a Tris buffer at pH 8.0, which was selected for the rest of the experimental work. The obtained current was stable (below 130 μ A). The concentration of Tris buffer (50–200 mM, step 25 U) was investigated. The best results were obtained using a concentration of 175 mM, obtaining also an adequate electric current.

The addition of organic solvents to the electrophoretic buffer can affect several parameters such as viscosity, dielectric constant, and zeta potential. A significant improvement in resolution was obtained in the presence of ethanol. In this study, percentages of 5, 10, 15, 20, and 25% were tested. An important interaction was observed between the pH and the ethanol percentage, achieving the best results for a pH 8.0 and 20% ethanol (adjusting the pH after the addition of ethanol), with a resolution higher than 1.5 for all the peaks.

A voltage of 25 kV was applied as optimum so as to achieve a good compromise between the running time, the resolution and the electric current. The effect of the temperature on the separation was investigated in the range of 15–35°C, lower values did not provide an adequate resolution for all the analytes. A capillary temperature of 30°C was selected as optimum.

3.2 Optimization of the LVSS with polarity switching procedure

As previously stated, CE using UV–Vis detection is not a very sensitive technique and present limitations in some applications related with food safety (*e.g.*, analysis of antibiotics in foodstuffs of animal origin) because it is probable to obtain LODs above the MRLs imposed by legislation. To enhance the detection limits in the present work, we have combined the SPE with an online preconcentration protocol, providing a simple and inexpensive methodology for improving sensitivity. The buffer conditions and polarity allowed the use of LVSS with polarity switching for anions, considering that all the molecules are negatively charged.

In LVSS we have optimized three significant parameters: sample solvent, size of the plug sample, and voltage. The most relevant variable in this type of preconcentration methodology is the sample solvent, because it requires a very low conductivity to obtain the best focusing of the analytes. Different sample solvents were studied: water, methanol, and ethanol, considering their low conductivity and a suitable pH in which all the β -lactams are negatively charged. Diluted BGE was not tested as sample solvent, because it provides higher conductivity than the other tested solvents, decreasing the effectiveness of the LVSS. Using methanol or ethanol, the β -lactams were decomposed, so the best results were obtained in the presence of water.

To optimize the size of plug sample, different percentages (50, 70, 90, and 100%) of the capillary were filled in each experience. These percentages were estimated, based on the diameter and length of the capillary and the applied pressure. The results showed that it was possible to fill the whole volume of the capillary by applying a pressure of 7 bar for 1 min. The negative voltage was studied in the interval of –15 to –30 kV. Finally, –20 kV was selected as optimum, as this value permits a rapid filling of the capillary in a stable system. Values higher than –20 kV frequently produce the capillary rupture. Once all these optimum values were selected, the whole LVSS process was completed in around 5 min, getting an improvement of the sensitivity of around eight times. Electropherograms corresponding to a mixture of the selected antibiotics, before and after the application of LVSS are shown in Fig. 2, where a significant increase in the signal scale is observed, after the application of the LVSS procedure.

3.3 Validation of the electrophoretic procedure

3.3.1 Statistical and performance characteristics

The calibration curves were established for the studied analytes in milk samples, treated according to the optimized SPE procedure described above in order to characterize this method for this kind of matrices. These matrix calibration curves were obtained using clean bovine raw milk samples spiked before SPE treatment. The linearity of the response was established for six calibration levels corresponding to 40,

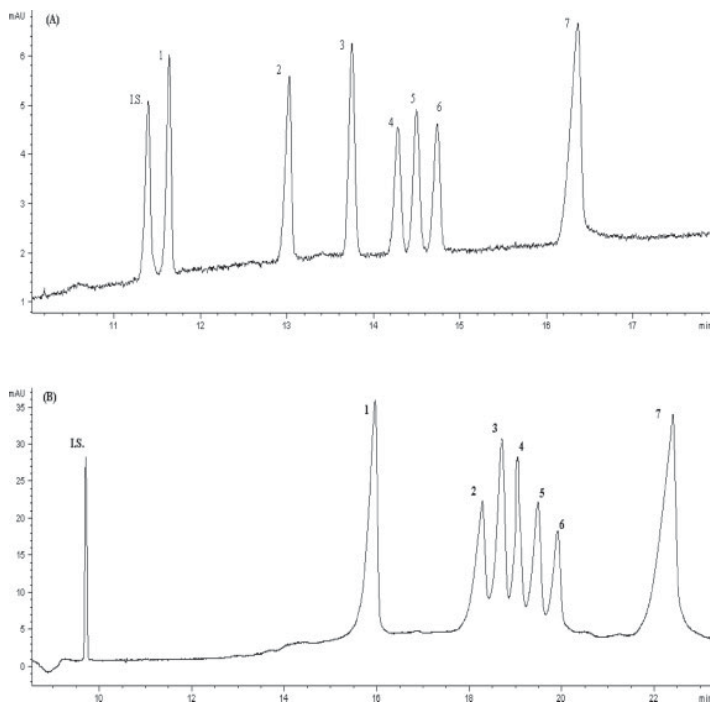


Figure 2. Electropherograms of a standard solution mixture of the studied β -lactams, each one at a concentration of (1) amoxicillin, 1000 $\mu\text{g/L}$; (2) ampicillin, 1000 $\mu\text{g/L}$; (3) nafcillin, 100 $\mu\text{g/L}$; (4) dicloxacillin, 500 $\mu\text{g/L}$; (5) cloxacillin, 500 $\mu\text{g/L}$; (6) oxacillin, 500 $\mu\text{g/L}$; (7) penicillin G, 1000 $\mu\text{g/L}$. (A) Before application of LVSS and (B) after application of LVSS.

100, 200, 400, 800, and 1600 $\mu\text{g/L}$ for amoxicillin and ampicillin; 40, 100, 200, 400, 1000, and 2000 $\mu\text{g/L}$ for penicillin G; 20, 40, 100, 200, 400, and 800 $\mu\text{g/L}$ for dicloxacillin, cloxacillin, and oxacillin; and 4, 10, 20, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/L}$ for nafcillin. In all cases, 20 $\mu\text{g/L}$ methylparaben was added as IS. Each concentration level was injected by triplicate, and the same as in the previous case, calibration curves were established by considering the relative corrected peak areas (as the ratio of analyte peak *per* migration time to IS peak *per* migration time) as a function of the analyte standard concentration.

The statistic parameters calculated by least-square regression and the performance characteristics of the SPE-LVSS-CE method for milk samples are presented in Table 1. In all cases, the satisfactory determination coefficients confirm that β -lactams responses were linear over a wide concentration range studied. As can be seen, for all the studied compounds, the LODs are below to the MRLs regulated in the EU Directive for milk.

The precision of the whole method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was assessed on the same day by means of repetitive application of the SPE procedure to two samples (experimental replicates) at each concentration level

(50, 20, and 10 $\mu\text{g/L}$ for nafcillin; 400, 200, and 100 $\mu\text{g/L}$ for amoxicillin, penicillin G, and ampicillin; and 200, 100, and 40 $\mu\text{g/L}$ for oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin), and each one was injected in triplicate (instrumental replicates). Intermediate precision was assessed for three consecutive days with a similar procedure for repeatability studies. The results related to concentrations and migration times, expressed as RSD of relative peak areas and migration times, are given in Table 2. As can be observed, acceptable precision was obtained in all cases.

3.3.2 Analysis of spiked milk samples of different origins

In order to check the applicability of the proposed methodology for the analysis of β -lactams residues in milk, recovery experiments were carried out in three different β -lactam-free kind of milks: bovine raw milk, bovine skimmed milk, and goat raw milk. The free analyte milk samples were spiked with a mixture of the seven β -lactams studied (amoxicillin, ampicillin, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, penicillin G, and nafcillin) at different levels (100, 200, and 500 $\mu\text{g/L}$ for

Table 1. Statistics and performance characteristics of the SPE-LVSS-CE method for the analysis of β -lactam antibiotics in milk samples (analytical response = concentration vs. relative corrected peak areas)

Analyte	Linear dynamic range ($\mu\text{g/L}$)	Intercept (s_a)	Slope (s_b)	$S_{y/x}$	R^2	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	MRLs (milk) ($\mu\text{g/L}$)
Ampicillin	2–1600	−0.026 (0.002)	3.8 (0.35)	0.481	0.993	2	7	4
Amoxicillin	2–1600	0.079 (0.008)	2.6 (0.14)	0.263	0.999	2	8	4
Dicloxacillin	10–800	0.071 (0.011)	10.4 (0.50)	0.265	0.992	10	19	30
Cloxacillin	9–800	0.046 (0.005)	5.3 (0.25)	0.135	0.994	9	20	30
Oxacillin	9–800	0.058 (0.009)	6.1 (0.47)	0.248	0.992	9	20	30
Penicillin G	3–200	0.096 (0.015)	3.0 (0.29)	0.414	0.992	3	10	4
Nafcillin	2–200	0.091 (0.008)	37.6 (1.58)	0.216	0.992	2	4	30

MRLs legislated by the EU in milk.

s_a , Intercept SD; s_b , Slope SD; $S_{y/x}$, Regression SD.

Table 2. Precision study of the proposed method for concentrations and migration times

	Nafcillin	Amoxicillin	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Cloxacillin	Dicloxacillin
Intraday RDS (%)							
Level 1	4.8	4.3	4.4	2.5	2.8	2.7	5.7
Level 2	4.9	5.1	4.7	3.0	3.4	3.1	6.3
Level 3	5.1	5.3	4.9	5.3	3.7	4.9	4.5
Mig. time (min)	23.7	18.8	29.1	21.8	25.6	25.1	24.4
RDS (%)	0.7	0.8	0.5	0.4	0.6	0.7	0.6
Interday RDS (%)							
Level 1	4.0	4.2	3.9	3.1	2.8	2.3	4.1
Level 2	6.1	5.7	4.3	6.7	3.9	5.4	7.1
Level 3	8.3	7.1	5.4	6.3	5.9	6.1	6.7
Mig. time (min)	24.7	21.7	31.0	26.7	28.9	28.1	28.5
RDS (%)	2.7	2.1	2.7	3.9	3.3	2.9	3.6

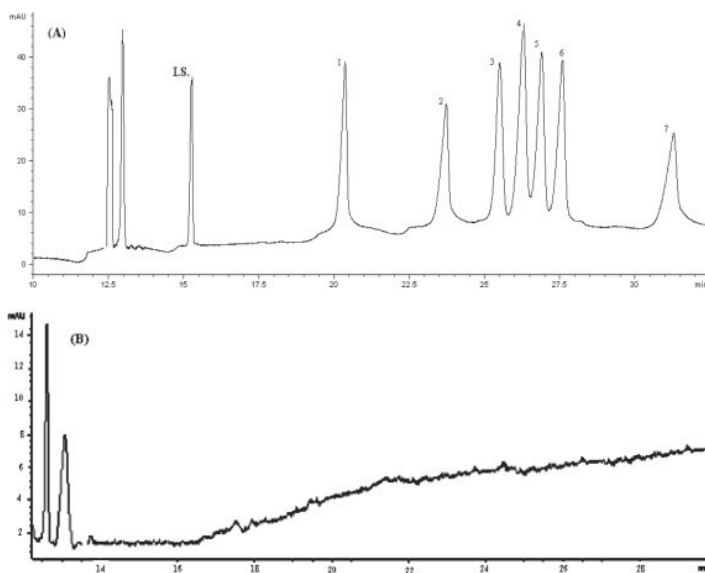
Level 1: 50 $\mu\text{g/L}$ for nafcillin; 400 $\mu\text{g/L}$ for amoxicillin, penicillin G, and ampicillin; 200 $\mu\text{g/L}$ for oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. Level 2: 20 $\mu\text{g/L}$ for nafcillin; 200 $\mu\text{g/L}$ for amoxicillin, penicillin G, and ampicillin; 100 $\mu\text{g/L}$ for oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. Level 3: 10 $\mu\text{g/L}$ for nafcillin; 100 $\mu\text{g/L}$ for amoxicillin, penicillin G, and ampicillin; 40 $\mu\text{g/L}$ for oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin.

each one). Each level was prepared in triplicate and injected three times. The identification of each β -lactam was based on both their migration times and absorption spectra. Absolute recoveries were calculated by comparing relative peak areas corresponding to milk samples spiked before the SPE treatment with relative peak areas corresponding to standard solutions prepared with the same amount of analyte. This

allowed us to evaluate the errors inherent to the sample pre-treatment, matrix effect and LVSS-CE procedure. The results are shown in Table 3. The proposed method provides satisfactory results in terms of both, trueness and precision, so method accuracy for the analysis of this kind of samples was demonstrated. Electropherograms of a treated blank sample and a spiked bovine milk sample are presented in Fig. 3.

Table 3. Recovery study for each β -lactam antibiotic at different spiked levels in different milk samples

			Amoxi- cillin	Ampi- cillin	Cloxa- cillin	Dicloxa- cillin	Oxacillin	Nafcillin	Penicillin G
Bovine raw milk ($\mu\text{g/L}$)	500	R(%)	88	89	88	89	90	91	93
		RSD(%)	3.3	3.8	2.9	4.9	3.2	5.0	4.5
	200	R(%)	88	90	88	87	89	90	90
		RSD(%)	4.2	2.5	2.6	5.6	2.7	4.8	4.4
	100	R(%)	87	86	88	87	88	90	91
		RSD(%)	4.4	3.1	3.5	4.6	3.1	3.9	4.1
Bovine skimmed milk ($\mu\text{g/L}$)	500	R(%)	90	92	92	93	92	92	93
		RSD(%)	4.2	2.9	3.2	3.5	4.1	4.7	3.9
	200	R(%)	88	92	92	92	90	93	92
		RSD(%)	3.5	3.7	4.2	5.0	4.9	3.9	4.8
	100	R(%)	88	92	90	90	90	93	91
		RSD(%)	4.9	3.4	4.8	5.2	4.5	3.8	4.4
Goat raw milk ($\mu\text{g/L}$)	500	R(%)	90	89	90	89	88	90	91
		RSD(%)	4.6	2.3	3.7	3.1	4.5	3.8	3.9
	200	R(%)	89	88	87	89	88	88	89
		RSD(%)	3.7	3.2	3.7	2.8	6.1	5.4	4.4
	100	R(%)	88	88	87	88	87	88	90
		RSD(%)	4.9	3.7	4.9	3.8	4.1	4.4	5.1

Mean value ($n = 9$).**Figure 3.** Electropherograms of treated bovine milk samples analyte-free, at optimum conditions: (A) sample spiked with (1) amoxicillin, 200 $\mu\text{g/L}$; (2) ampicillin, 200 $\mu\text{g/L}$; (3) nafcillin, 20 $\mu\text{g/L}$; (4) dicloxacillin, 100 $\mu\text{g/L}$; (5) cloxacillin, 100 $\mu\text{g/L}$; (6) oxacillin, 100 $\mu\text{g/L}$; (7) penicillin G, 200 $\mu\text{g/L}$. (B) Blank sample. Methylparaben (IS), 20 $\mu\text{g/L}$.

4 Concluding remarks

A sensitive and rapid electrophoretic method has been developed and validated for the analysis of β -lactam antibiotics in milk. Previously to the CZE analysis, a solvent extrac-

tion/SPE procedure has been applied for extraction, off-line preconcentration and sample cleanup. Also, an on-line preconcentration using LVSS has been carried out, improving the sensitivity of the detection and making it suitable for monitoring these residues in foodstuffs of animal origin

(bovine raw milk, bovine skimmed milk, and goat raw milk). The simultaneous separation of the seven compounds takes place in around 30 min and satisfactory recoveries have been provided for bovine raw milk (86–93%), for bovine skimmed milk (88–93%), and for goat raw milk (87–91%). The LODs obtained are low enough for detecting these residues below the legislated MRLs established in milk by the EU, being among the fastest and sensitive methods for the simultaneous monitoring of a high number of common β -lactams in foodstuffs of animal origin. The method could be an alternative in laboratories of food quality and safety control.

The authors thank the financial support from the National Institute of Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Project Ref. CAL03-096-C2-2) and EU Funds.

5 References

- [1] Piddock, L. J. V., *J. Antimicrob. Chemother.* 1996, **38**, 1–3.
- [2] Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* 1996, **L25**, 10–32.
- [3] Establishment of Maximum Residues Levels of Veterinary Medical Products in Foodstuffs of Animal Origin. European Community Council Regulation 2377/90. *Off. J. Eur. Commun.* 1990, **L224**, 1.
- [4] MacGrane, M., O'Keefe, M., Smyth, M. R., *Analyst* 1998, **123**, 2779–2783.
- [5] Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Cannavan, A., Hewitt, S. A., *J. Chromatogr. A* 1998, **812**, 77–98.
- [6] Di Corcia, A., Nazzari, M., *J. Chromatogr. A* 2002, **974**, 53–89.
- [7] Petrović, M., Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2005, **1067**, 1–14.
- [8] Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, **386**, 973–985.
- [9] Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Straub, R. F., Aronson, A. L., *J. AOAC Int.* 1994, **77**, 1122–1131.
- [10] Moats, W. A., Romanowski, R. D., *J. Chromatogr. A* 1998, **812**, 237–247.
- [11] Straub, R. F., Linder, M., Voyksner, R. D., *Anal. Chem.* 1994, **66**, 3651–3658.
- [12] Holstege, D. M., Puschner, B., Whitehead, G., Galey, F. D., *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 406–411.
- [13] Ghidini, S., Zanardi, E., Varisco, G., Chizzolini, R., *Food Addit. Contam.* 2003, **20**, 528–534.
- [14] Sonja, R., Diserens, J. M., Standler, R. H., *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 4171–4176.
- [15] Bruno, F., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Samperi, R., *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 3463–3470.
- [16] Sonja, R., Standler, R. H., *J. Chromatogr. A* 2004, **1054**, 359–363.
- [17] Sonja, R., Rytz, A., Standler, R. H., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 1614–1621.
- [18] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 1997, **18**, 2427–2437.
- [19] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 1999, **20**, 3269–3279.
- [20] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 2001, **22**, 4229–4261.
- [21] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 2003, **24**, 4116–4127.
- [22] Hernández, M., Borull, F., Calull, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, **22**, 416–427.
- [23] García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2006, **27**, 266–282.
- [24] Hows, M. E. P., Perret, D., Kay, J., *J. Chromatogr. A* 1997, **768**, 97–104.
- [25] Li, Y. M., Van Schepdael, A., Zhu, Y., Roerts, Hoogmartens, J., *J. Chromatogr. A* 1998, **812**, 227–236.
- [26] Hernández, M., Borull, F., Calull, M., *J. Chromatogr. B* 1999, **731**, 309–315.
- [27] Zhu, Y., Hoogmartens, C., Van Schepdael, A., Roets, E., Hoogmartens, J., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1999, **22**, 1403–1415.
- [28] Nozal, L., Arce, L., Rios, A., Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta* 2004, **523**, 21–28.
- [29] Emaldi, P., Fapanini, S., Baldini, A., *J. Chromatogr. A* 1995, **711**, 339–346.
- [30] Pajchel, G., Tysky, S., *J. Chromatogr. A* 1999, **846**, 223–226.
- [31] Pajchel, G., Michalska, K., Tysky, S., *J. Chromatogr. A* 2004, **1032**, 265–272.
- [32] Bailón-Pérez, M., Cuadros-Rodríguez, L., Cruces-Blanco, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, **43**, 746–752.
- [33] Tsikas, D., Brunner, G., *Chromatographia* 1990, **30**, 657–662.
- [34] Michalska, K., Pajchel, G., Tysky, S., *J. Chromatogr. B* 2004, **800**, 203–209.
- [35] Kowalski, P., Oledzka, I., Lamparczyk, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, **32**, 937–947.
- [36] Hilder, E. F., Klampfl, C., Buchberger, W., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2002, **23**, 414–420.
- [37] Samskog, J., Wetterhall, M., Jacobsson, S., Markides, K., *J. Mass Spectrom.* 2000, **35**, 919–924.
- [38] Santos, S. M., Henriques, M., Duarte, A. C., Esteves, V. I., *Talanta* 2007, **71**, 731–737.
- [39] Shihabi, Z. K., *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 107–117.
- [40] Quirino, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 119–135.
- [41] Hirokawa, T., Ikuta, N., Yoshiyama, T., *J. Chromatogr. A* 2000, **894**, 3–9.
- [42] Urbánek, M., Křivánková, L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, **24**, 466–485.
- [43] Chien, R. L., *Electrophoresis* 2003, **24**, 486–497.
- [44] Simonet, B. M., Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, **22**, 605–614.
- [45] Malá, Z., Křivánková, L., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2007, **28**, 243–253.
- [46] Burgi, D. S., Chien, R. L., *Anal. Biochem.* 1992, **202**, 306–309.
- [47] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 2005, **26**, 954–961.
- [48] Zhu, Z., Zhang, L., Marimuthu, A., Yang, Z., *Electrophoresis* 2003, **24**, 3089–3096.



Trace determination of β -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis[☆]

M.I. Bailón-Pérez, A.M. García-Campaña^{*}, C. Cruces-Blanco, M. del Olmo Iruela

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva, s/n, E-18071 Granada, Spain

Received 13 September 2007; received in revised form 27 December 2007; accepted 31 December 2007

Available online 12 January 2008

Abstract

A sensitive and reliable method using capillary zone electrophoresis with UV-diode array detection (CZE-DAD) has been developed and validated for trace determination of β -lactam antibiotics in waste, well and river water matrices. Due to the lack of sensitivity of the UV–vis detection, a solvent extraction/solid-phase extraction (SPE) method applied for off-line preconcentration and cleanup of water samples, in combination with an on-line preconcentration methodology named large volume sample stacking (LVSS) have been applied. The analytes included nafcillin, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, ampicillin, penicillin G and amoxicillin. Average recoveries for water samples fortified with the studied β -lactams at different concentration levels (1.0, 2.0 and 4.0 $\mu\text{g/L}$) were ranging between 94 and 99%, with relative standard deviations (RSDs) lower than 10%. The precision, calculated as intra-day and inter-day standard deviations fell within acceptable ranges (3.3–7.2%). The limits of detection were estimated to range between 0.08 and 0.80 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the studied compounds. All the samples analyzed were negative for all the analytes at these levels of concentration and the method showed its usefulness for the detection of these widely applied β -lactam antibiotics in different kinds of waters.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: β -Lactam antibiotics; Capillary zone electrophoresis; Sample stacking; Wastewater; River water; Well water

1. Introduction

In addition to pesticides, industrial chemicals and their metabolites, pharmaceutical substances have experienced a fast growing interest and recent studies have shown that a multitude of drugs are present in aquatic systems [1]. The importance of the determination of antibiotic residues in environment samples arises from the fact that they are suspected of being responsible for the appearance of bacterial strains that are resistant to antibiotics [2]. Also, it is important to consider that the large amount of antibiotics which are continuously introduced to the environment make them potential pollutants that are incorporated from a variety of sources, including discharges from domestic wastewater treatment plants and pharmaceutical com-

panies, runoff from animal feeding operations, infiltration from aquaculture activities or from compost made of animal manure containing antibiotics [3,4].

β -Lactam antibiotics have been the most widely used as antimicrobial drugs for more than 80 years and still constitute the most important group of antibiotics. These antibiotics are used to treat bacterial infection of various organs [5]. A high percentage of antibiotics consumed by humans and animals in hospitals or by prescription are excreted uncharged via urine and feces into domestic sewage, and are discharged to wastewater treatment plants effluent into the aquatic environment. Thus, the origin of antibiotic contamination in surface and ground waters is considered to be point and non-point source discharges of municipal and agricultural wastewater [6]. Even the poor stability of the β -lactam ring that can be opened by β -lactamases, a widespread enzyme in bacteria, or by chemical hydrolysis, it is not possible to exclude the presence of these compounds in aquifers, where manure or sludge is applied to soils, or where hospital wastewaters is discharged, via a relatively small sewage treatment plant, into the nearest stream [7,8].

[☆] Presented at the 7th Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Granada, Spain, 17–19 October 2007.

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 958 248594; fax: +34 958 249510.

E-mail address: amgarcia@ugr.es (A.M. García-Campaña).

Several analytical methods have already been described for simultaneous determination of antibiotic residues in the aqueous environment. Most of the described methods refer to the use of HPLC both with UV [9,10] or mass spectrometry (MS) [11,12] detection and GC–MS [13–15], which require large volumes of solvents and/or derivatizing treatments. Usage of GC–MS also involves high costs, thus limiting accessibility. Specifically for β -lactams, solid-phase extraction (SPE) and LC with DAD have been recently applied to detect these residues or a combination with other pharmaceutical compounds in water samples [9,16] and with MS detection for its control in tap and surface water [17] and in surface water and urban wastewater [8].

In recent years, the use of capillary electrophoresis (CE) for the determination of antibiotics has gained considerable importance because it is an effective and economic approach for the separation of a large variety of substances, as well as the increasing availability of automated CE instruments that have promoted the exploration of an increasing number of CE methods for routine analysis [18–23]. Mainly, micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) has been applied to the simultaneous separation of several penicillins [24–31] in different matrixes and specifically to the screening of penicillin compounds in farm water samples [32]. Capillary isotachopheresis has been applied for the analysis of penicillins and cephalosporins in pharmaceutical preparation [33]. Also, CZE has been used for the analysis of penicillin G [34] and amoxicillin [35] together with other [36] and for the simultaneous screening of six antibiotics, including four penicillins (penicillin G, amoxicillin, ampicillin and cloxacillin) in milk [37].

Considering that these compounds are most likely to be found at very low concentrations in the different aquatic environments, like sewage treatment plants, influents and effluents, surface, ground and drinking water, it is necessary to use sufficiently sensitive analytical techniques. This is normally a problem for CE using UV–vis detection. Recently MEKC has been combined with a very sensitive detection technique, laser-induced fluorescence (LIF) detection, for the separation and determination of ampicillin, amoxicillin, cephadrine and cephalexin in environmental waters, involving a previous derivatization step top from the fluorescent products and obtaining limits of detection (LODs) from 30 to 45 ng L⁻¹ [38]. Several preconcentration procedures have been shown to be useful for determining analytes at low concentrations [39], based on the manipulation of the electrophoretic velocity of the analyte (sample stacking) or related to the ability of the analyte to partition into a pseudostationary phase (sweeping and analyte concentrators). The simple-one is sample-stacking (SS) which is an inherent and exclusive feature of CE, taking place when the sample compounds encounter isotachopheretic concentration at the interface between sample zone and buffer (isotachopheretic sample stacking, ITPSS) or when the conductivity of the sample is smaller than that of the buffer (field-amplified sample stacking, FASS) [40]. Additionally, large-volume sample stacking (LVSS), also named stacking with matrix removal (SWMR), has demonstrated to improve detection limits of charged analytes by more than 1000-fold and it can be easily automated and controlled by software [41]. Using this methodology, slightly modified, the analysis of eight

penicillins by MEKC has been carried out [42]. Field amplified sample injection (FASI) has also been applied for the CZE analysis of amoxicillin [26] and LVSS was applied for the detection of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin [43].

The aim of this work was to develop a very sensitive method to the analysis of β -lactams at trace level in environmental water samples of different origins. The chemical structures of the studied compounds are shown in Fig. 1. For this purpose an on-line preconcentration procedure based on LVSS has been optimized and combined with the utilization of a SPE cartridge for the off-line preconcentration of the analytes in aquatic samples. The CE separation method has been optimized using DAD.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solvents

The β -lactam antibiotics nafcillin, CAS [147-52-4], dicloxacillin, CAS [3116-76-5], cloxacillin, CAS [61-72-3], oxacillin, CAS [66-79-5], ampicillin, CAS [69-53-4], penicillin G, CAS [61-33-6], amoxicillin, CAS [26787-78-0], were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The organic solvents employed (acetonitrile, methanol, and ethanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and all reagents were of analytical reagent grade.

The running buffer was prepared from tris(hydroxymethyl)aminomethane supplied by Merck and the pH was adjusted to 8 with 1 M sodium hydroxide obtained from Panreac-Química (Madrid, Spain). Methylparaben, used as internal standard (I.S.), was also purchased from Sigma.

Ultrapure water (Milli-Q plus system, Millipore Bedford, MA, USA) was used throughout the work.

Extraction cartridges containing an Oasis hydrophilic-liphophilic balance (HLB; 60 mg, 3 mL; Waters, Milford, MA, USA) and alumina N (500 mg, 3 mL; E. Merck) in laboratory-prepared cartridges were used.

2.2. Preparation of standards

Stock standard solutions (1000 μ g mL⁻¹) of each compound were prepared by dissolving the appropriate amount of each substance in deionized water, stored at 4 °C in the dark, and then diluted to the desired concentration prior to use. Under such conditions, they were stable for at least 2 months.

A stock solution of 0.5 mg L⁻¹ of the methylparaben (I.S.) was prepared by dissolving 0.5 mg of the product in 1000 mL of water. The solution was stable for at least 1 month.

2.3. Instrumentation

The pH of the running buffer was adjusted with a pH meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) and was employed with a resolution of ± 0.01 pH unit. Solid-phase extraction was carried out on a vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled with a vacuum pump (Büchi model B-121, Flawil, Switzerland).

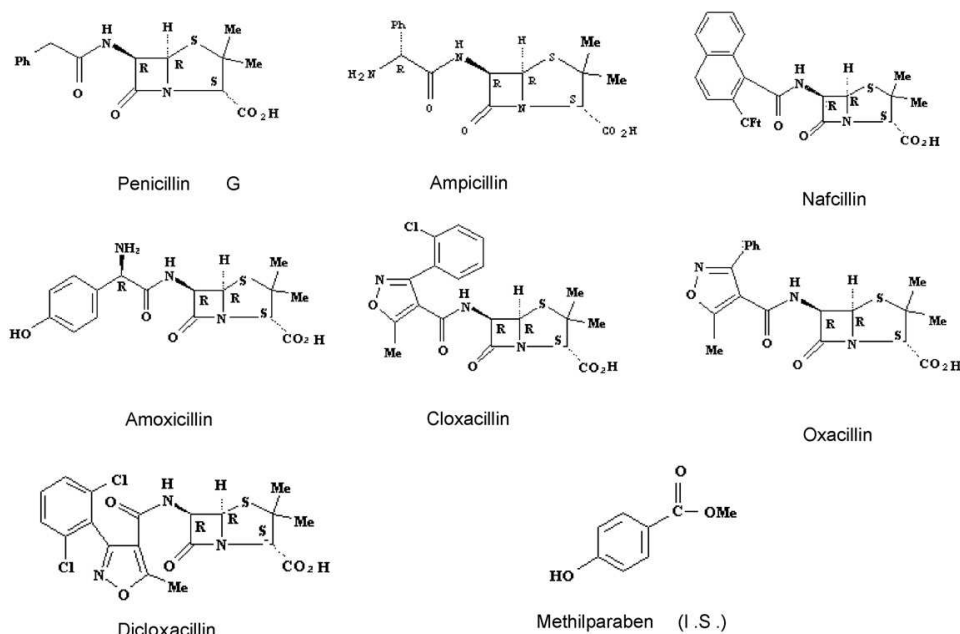


Fig. 1. Chemical structures of the studied β -lactam antibiotics.

For the preparation of the samples, a vortex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia (NY), USA), was used.

Electrophoresis experiments were performed in a $64.5\text{ cm} \times 75\ \mu\text{m}$ I.D., uncoated fused-silica capillary with an optical path length of $200\ \mu\text{m}$ (bubble cell capillary from Agilent Technologies) and an effective length of 56 cm.

All CE experiments were carried out on an HP3D CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a DAD system. Data were collected using the software provided with the HP ChemStation version A.09.01.

2.4. Electrophoretic procedure

Before the first use, the new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 10 min, then with deionized water for 10 min, and finally with the BGE (background electrolyte) solution for 15 min. A N_2 pressure of 7 bar was applied. Before each run, the capillary was prewashed with 0.1 M NaOH, at a N_2 pressure of 7 bar for 3 min, then with deionized water for other 3 min and finally with the running buffer for 5 min. After each run, the capillary was flushed for 1 min with 0.1 M NaOH, 1 min with deionized water, and, finally, 2 min with the running buffer at a pressure of 7 bar to maintain an adequate repeatability of run-to-run injections. At the end of the day, the capillary was cleaned with 1 M NaOH for 2 min, then with deionized water for 5 min and finally flushed with air for 3 min.

The antibiotics were analyzed using a BGE consisting of an aqueous solution of 175 mM Tris adjusted to pH 8 with 1 M HCl and containing 20% (v/v) ethanol. A voltage of 30 kV (normal mode) was applied. All the β -lactam antibiotics were monitored at 220 nm with a bandwidth of 16 nm. The temperature of the

capillary was kept constant at $30\ ^\circ\text{C}$. Samples were introduced by hydrodynamic injection at a N_2 pressure of 7 bar for 1 min. Injection of the sample occurred using the following LVSS procedure.

2.5. LVSS procedure in CE

For the proposed method, firstly standard solutions or samples containing the analytes were loaded at a pressure of 7 bar for 1 min into the electrophoretic system so that the whole capillary was filled with the sample solution. Water was used as the sample solvent to produce a low-conductivity analyte matrix. A negative voltage ($-20\ \text{kV}$) was then applied and the sample stacking started. Sample matrix removal from the capillary was indicated by monitoring the electric current, which progressively increased to its normal value as the low conductivity injected zone was eliminated from the capillary. When the 95% of the normal current was reached, the voltage was stopped and at this stage, the stacking process could be considered complete. A positive voltage (25 kV) was then applied to separate the compounds.

2.6. Preparation of water samples for analysis

Different types of water were analyzed. Urban wastewater was collected at the effluent of a sewage treatment plant in Granada (Spain), river water was collected from a local river (Fardes, Granada, Spain), as the well water from a local well (Guadix, Granada, Spain).

A sample treatment for extraction, preconcentration, and cleanup based on one previously proposed [44] has been modi-

fied and developed. It consists of the use of acetonitrile (ACN) for sample extraction and SPE cartridges for sample cleanup. A sample aliquot of 100 mL of water was filtered through a 0.2 µm PTFE membrane (Millex-GN, Millipore) to remove suspended matter, then, these samples were spiked with different concentration levels of β-lactam antibiotics. After spiking and homogenizing, in the case of the wastewater two different SPE cartridges were needed in order to cleanup and concentrate the samples. The first one was an Oasis HLB cartridge in which the analytes were retained. It was previously washed sequentially with 2 mL of methanol, 3 mL of ACN and 5 mL of deionized water. Without using vacuum, the sample was applied to the column. The antibiotics were eluted with 6 mL of ACN at 1–2 mL/min, using a vacuum manifold. The eluate was passed through the second cartridge, an alumina N, which is a polar sorbent SPE cartridge which allows a sample cleanup, it was previously washed sequentially with 5 mL of deionized water and 5 mL of ACN at a flow rate of approximately 1 mL/min. The β-lactams antibiotics were eluted with 3 mL of deionized water. This final solution was evaporated to dryness under a gentle N₂ current at 60 °C, and then reconstituted with 1 mL of deionized water containing the I.S.

In the case of both, river and water samples, only a SPE cartridge was needed in order to concentrate the samples, so an Oasis HLB cartridge was used, in which the analytes were retained. It was previously washed sequentially with 2 mL of methanol, 3 mL of ACN and 5 mL of deionized water. Without using vacuum, the sample extract was applied to the column. The antibiotics were eluted with 6 mL of ACN at 1–2 mL/min, using a vacuum manifold. This final solution was evaporated to dryness under a gentle N₂ current at 60 °C, and then reconstituted with 1 mL of deionized water containing the I.S.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of electrophoretic variables

In order to select the best conditions and to know the electrophoretic behaviour of each compound, preliminary studies were focused on the optimization of the main variables that could influence the separation and simultaneous quantification of the seven β-lactam antibiotics by UV–vis detection. The effect of pH value on the resolution between peaks was investigated over the range of pH 7–10 using different buffer solutions (ammonium acetate, 100 mM; ammonium carbonate, 60 mM; sodium tetraborate, 60 mM; Tris, 150 mM). The best resolution was obtained using a Tris (hydroxymethyl aminomethane) buffer at pH 8.0. Subsequently, the Tris buffer concentration was modified between 50 and 200 mM. From the experimental study, it was concluded that the best results were obtained using a concentration of 175 mM, with an adequate electric current (around 100 µA). The addition of organic solvents to the electrophoretic buffer was considered. A significant improvement in resolution was obtained in the presence of ethanol and percentages of 5, 10, 15, 20 and 25% were tested. An important effect of the ethanol percentage was observed, achieving the best results in terms of resolution in presence of a 20%

ethanol (adjusting the pH after the addition of ethanol). The separation voltage was modified between 10 and 30 kV so as to obtain a good compromise between satisfactory separation, analysis time and adequate current, avoiding the Joule effect. A voltage of 30 kV was applied as optimum to achieve a short running time and low electric current. The effect of the temperature on the separation was investigated in the range of 15–35 °C, observing that lower values did not provide an adequate resolution for all the analytes. A capillary temperature of 30 °C provided the separation of all the β-lactams with satisfactory resolutions, thus this value was selected as optimum. The UV–vis spectra of the analytes were registered choosing a wavelength of 220 nm with a bandwidth of 16 nm for monitoring the selected β-lactams.

3.2. Optimization of the LVSS with polarity switching procedure

Taking into account the poor sensitivity of CE using the UV–vis detection, the direct use of this technique for the analysis of β-lactams would not be appropriate for the monitoring in water, because the LODs could not reach the desired levels in the range of low µg L⁻¹. For this reason, in the present work off-line SPE procedure and on-line preconcentration protocol have been combined, providing a simple and inexpensive methodology for improving sensitivity.

LVSS with polarity switching for anions was chosen as the preconcentration technique because the buffer conditions and polarity allowed its use, considering that all the molecules are negatively charged at the working pH. At the beginning, a large volume of sample prepared in a low conductivity matrix is injected, and a negative polarity voltage is applied for focusing of zones and removal of sample matrix. When the anions are completely focused and most of the sample matrix is removed, voltage is stopped and polarity is reversed. This occurs when the current reached 95–99% of its value. Finally a voltage at positive polarity is applied in order to separate and detect the focused zones. For LVSS, two significant parameters have to be reoptimized: buffer concentration and applied voltage and two new ones have to be optimized: size of plug sample and current inversion value. In this case, the same value for buffer concentration (175 mM in presence of 20% of ethanol) was selected. The values of voltage tested were from 10 to 30 kV; so 25 kV

Table 1
Statistics and performance characteristics for the SPE-LVSS-CE method for the determination of β-lactam antibiotics in well water samples (analytical response = concentration vs. relative corrected peak areas)

Compound	Linear dynamic range (µg L ⁻¹)	R ²	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
Ampicillin	0.80–40	0.997	0.80	1.6
Amoxicillin	0.80–40	0.996	0.80	2.0
Dicloxacillin	0.25–15	0.998	0.25	0.7
Cloxacillin	0.30–15	0.996	0.30	0.8
Oxacillin	0.30–15	0.999	0.30	0.8
Penicillin G	0.90–40	0.993	0.90	2.0
Nafcillin	0.08–3	0.999	0.08	0.2

Table 2
Precision study of the proposed SPE-LVSS-CE method for concentrations and migration times

	Nafcillin	Amoxicillin	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Cloxacillin	Dicloxacillin
Intraday RSD (%)							
3.0 µg L ⁻¹	4.5	7.1	5.1	4.3	6.6	5.4	4.8
2.0 µg L ⁻¹	5.4	7.9	6.1	3.9	6.7	6.0	5.0
1.0 µg L ⁻¹	3.3	6.5	6.9	4.6	7.1	6.3	6.2
Migration time (min)	22.6	19.6	27.5	21.9	24.0	23.7	23.4
RSD (%)	1.8	2.3	1.9	2.2	3.1	2.9	1.7
Interday RSD (%)							
3.0 µg L ⁻¹	5.1	6.9	4.3	6.3	7.0	5.8	5.7
2.0 µg L ⁻¹	6.0	6.9	4.9	7.1	7.3	7.1	4.9
1.0 µg L ⁻¹	6.3	7.2	5.5	7.4	6.9	7.2	5.8
Migration time (min)	22.0	18.7	26.3	20.1	24.2	23.6	22.8
RSD (%)	4.3	3.8	2.9	3.7	3.5	4.9	4.8

was applied as optimum to achieve a good compromise between the migration time and the electric current generated.

3.2.1. Optimization of the sample plug

To optimize the size of sample plug, different percentages (50, 70, 90, and 100%) of the capillary were filled in each experience. These percentages were estimated based on the diameter and length of the capillary and the pressure applied. The results

showed that it was possible to fill the whole volume of the capillary, being achieved by applying a pressure of 7 bar for 1 min.

3.2.2. Optimization of the current inversion value

In most publications the polarity switching in LVSS is recommended when the electric current reaches 95–99% of the initial current value. Usually, the higher the percentage, the higher the

Table 3
Recovery study for each β-lactam antibiotic at different spiked levels in different water samples

	Amoxicillin	Ampicillin	Cloxacillin	Dicloxacillin	Oxacillin	Nafcillin	Penicillin G
Well water							
4.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	97	96	98	99	97	97	99
RSD (%)	7.4	9.2	5.8	3.8	5.2	6.2	5.1
2.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	95	96	98	97	98	95	98
RSD (%)	6.6	4.6	3.1	2.8	3.6	4.5	4.0
1.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	94	94	96	97	96	95	96
RSD (%)	5.6	4.5	9.5	3.7	8.1	6.0	6.2
River water							
4.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	96	97	98	96	97	99	98
RSD (%)	6.6	4.7	4.6	4.4	7.0	5.2	3.9
2.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	96	95	96	95	96	99	96
RSD (%)	7.1	3.8	5.3	4.7	4.0	3.0	7.8
1.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	94	95	96	96	96	97	95
RSD (%)	9.1	5.4	7.3	6.3	4.2	6.2	5.9
Waste water							
4.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	95	98	97	97	98	98	97
RSD (%)	4.7	4.2	5.6	5.2	5.5	4.8	5.7
2.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	94	95	96	98	97	97	95
RSD (%)	5.8	5.2	5.7	4.3	8.3	6.3	7.4
1.0 (µg L ⁻¹)							
Recovery (%)	94	95	97	97	97	95	95
RSD (%)	3.9	4.8	6.3	4.9	7.9	6.0	6.4

Mean value (n = 9).

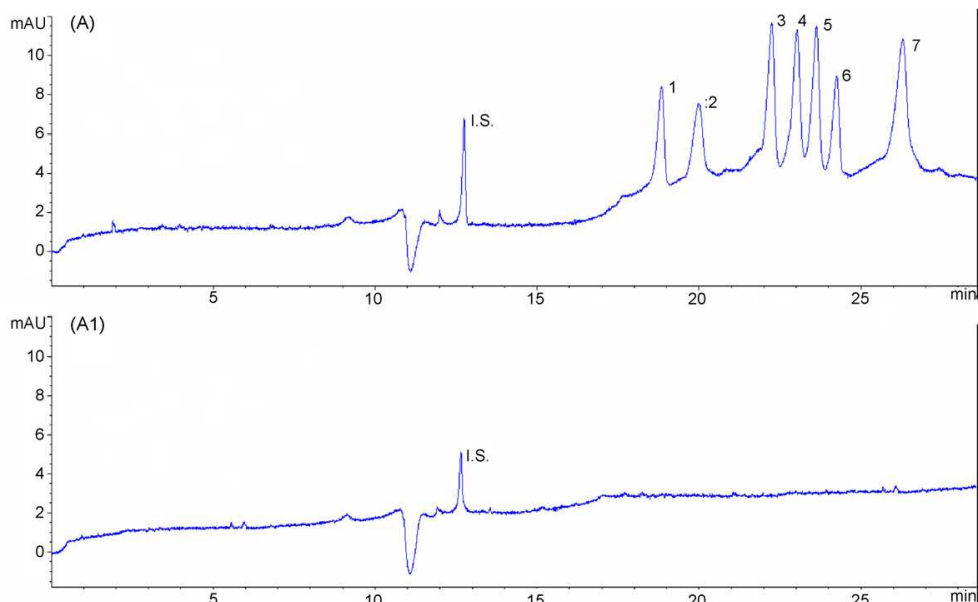


Fig. 2. Electropherograms obtained from the proposed SPE-LVSS-CE method for (A) well water sample spiked with: (1) amoxicillin, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (2) ampicillin, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (3) nafcillin, $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$; (4) dicloxacillin, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (5) cloxacillin, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (6) oxacillin, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (7) penicillin G, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$. (I.S.) methylparaben, $10 \mu\text{g L}^{-1}$. (A1) Well treated to water blank. Optimum separation conditions as indicated in the text.

amount of aqueous matrix removed, and both, the electric field and the electroosmotic flow (EOF) remain constant during the sample preparation step, regardless of the initial sample volume. On the other hand, the current increases very slowly at the beginning of the sample stacking process but the increase rate becomes

extremely high when the aqueous sample matrix is practically removed. Thus, a very long inversion time may result in a loss of part of the analytes, especially those with higher mobility. For that reason, different percentages of the initial current value were investigated. The negative voltage was studied in the inter-

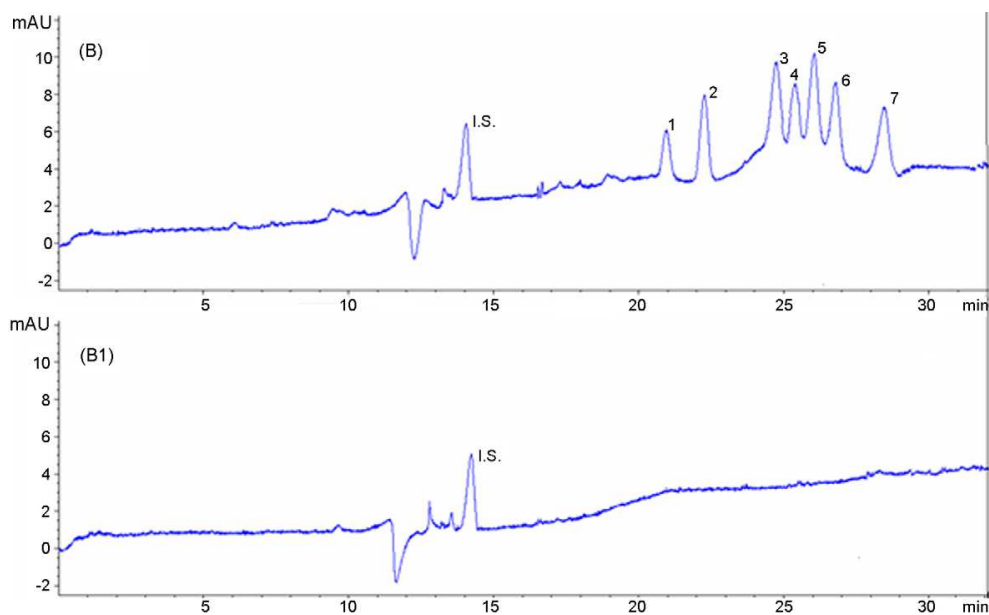


Fig. 3. Electropherograms obtained from the proposed SPE-LVSS-CE method for (B) river water sample spiked with: (1) amoxicillin, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (2) ampicillin, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (3) nafcillin, $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$; (4) dicloxacillin, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (5) cloxacillin, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (6) oxacillin, $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$; (7) penicillin G, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$. (I.S.) methylparaben, $10 \mu\text{g L}^{-1}$. (B1) Treated river water blank. Optimum separation conditions as indicated in the text.

val of -15 to -30 kV. Finally, -20 kV was selected as optimum, as this value permits a rapid filling of the capillary in a stable system. Values higher than -20 kV frequently produce the capillary rupture. Once all these optima values were selected, the whole LVSS process was completed in around 5 min, getting an improvement of the sensitivity of around 8 times in terms of S/N ratio.

3.3. Validation of the electrophoretic procedure

3.3.1. Statistical and performance characteristics

The calibration curves were established for the studied analytes in water samples, treated according to the optimized SPE procedure described above. Well water samples were selected to validate and characterize this method.

The calibration curves were established for six calibration levels corresponding to 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 20.0 and 40.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for amoxicillin, ampicillin and penicillin G; 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 15.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for dicloxacillin, cloxacillin and oxacillin; and 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5 and 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for nafcillin. In all cases, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of methylparaben was added as I.S. These matrix calibration curves were obtained using clean well water samples spiked before SPE treatment.

Each concentration level was injected by triplicate. Calibration curves were established taking into account the relative corrected peak areas (as the ratio analyte peak per migration time to I.S. peak per migration time) as a function of the analyte standard concentration. The statistic parameters calculated

by least-square regression and the performance characteristics of the SPE-LVSS-CE method for well water samples are presented in Table 1. The satisfactory determination coefficients confirm that β -lactam analytical responses were linear over the studied range. As can be seen, for all the studied compounds, the limits of detection (LODs) obtained by applying both off-line and on-line procedures are at the low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels, lower than those previously reported by LC-DAD, which are ranging from 2.2 to 25.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in wastewaters [9] or than those obtained using MEKC and LVSS [42], ranging from 5 to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. This last method was not applied to real samples. Obviously, the use of LIF detection in MEKC [38] for the detection of four β -lactams in environmental waters, including only two of the seven compounds analyzed in the present proposed method, permit the establishment of LODs lower than that obtained here, but including a previous derivatization step. Also by using electrospray-MS/MS detection coupling to SPE is possible to obtain LODs in the ng L^{-1} region [17,8] but in both cases this slight increase in sensitivity implies the use of more expensive detectors.

3.3.2. Precision study

The precision of the relative corrected areas was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was assessed on the same day by means of repetitive application of the SPE-LVSS-CE procedure to two samples (experimental replicates) at each concentration level (3.0, 2.0, and 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) and each one was injected by triplicate (instrumental repli-

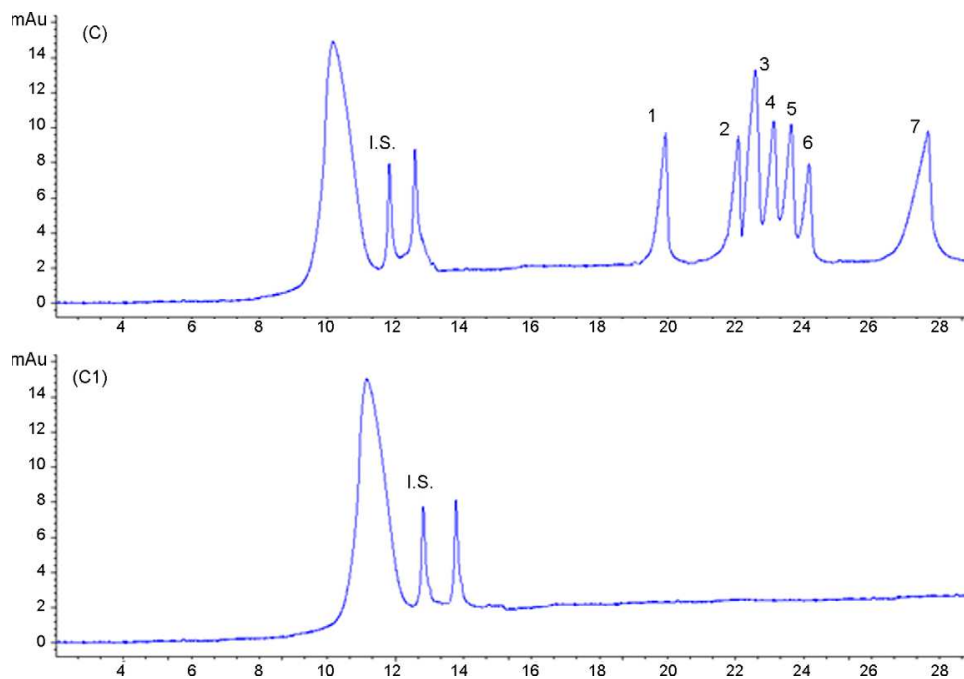


Fig. 4. Electropherograms obtained from the proposed SPE-LVSS-CE method for (C) waste water sample spiked with: (1) amoxicillin, 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$; (2) ampicillin, 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$; (3) nafcillin, 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$; (4) dicloxacillin, 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$; (5) cloxacillin, 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$; (6) oxacillin, 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$; (7) penicillin G, 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. (I.S.) methylparaben, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. (C1) Treated waste water blank. Optimum separation conditions as indicated in the text.

ates). Intermediate precision was assessed for three consecutive days with a similar procedure as for repeatability studies. The results related to concentrations and migration times, expressed as relative standard deviation (RSD) of relative peak areas and migration times, are given in Table 2.

3.3.3. Analysis of spiked waste water, river water and well water samples

In order to check the applicability of the proposed methodology for the analysis of β -lactams in different samples, recovery experiments were carried out in three different β -lactams-free kind of waters: wastewater, river water, and well water. The water samples were spiked with a mixture of the seven β -lactams studied (amoxicillin, ampicillin, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, penicillin G and nafcillin) at different levels (1.0, 2.0, and 4.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for each one). Each level was prepared by triplicate and injected three times. The identification of each β -lactam was based on both their migration times and absorption spectra. The results are shown in Table 3 and, as can be seen, the proposed method provides good results in terms of both trueness and precision. Method accuracy for the analysis of this kind of samples was demonstrated considering the satisfactory results of this study, demonstrating the applicability of the selected SPE preconcentration procedure for the studied penicillins in the different kind of water samples at the low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels. Electropherograms of different treated spiked water samples and the corresponding blanks are presented in Figs. 2–4. The method proposed here demonstrated to be useful for the quantitation of seven β -lactam antibiotics as possible residues in water systems which could be used for drinking water supply and where the presence of drug residues should be completely avoided.

4. Conclusions

We have proposed a very sensitive method based on off-line and on-line procedures in CE with DAD detection for the simultaneous detection of seven β -lactam antibiotic residues in different kind of water samples, i.e., wastewater, river and well waters. The method involves a previous preconcentration step by applying a solvent extraction/SPE procedure. In the case of wastewater, two different SPE cartridges were needed in order to cleanup and concentrate the samples (Oasis HLB and alumina N). For the other kinds of samples only Oasis HLB cartridge was necessary. The sensitivity was considerably enhanced by applying LVSS as on-line preconcentration method in CE. The simultaneous separation of the seven compounds takes place in around 30 min and satisfactory recoveries were provided, being possible the application of this methodology for the monitoring of these antibiotics in different waters at the low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels when processing 100 mL samples.

Acknowledgements

The authors thank the financial support from the Spanish Ministry of Education and Science (Project Ref. CTM2006-06363) and EU Funds.

References

- [1] M.E. Golet, A. Strehler, A.C. Alder, W. Giger, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4640.
- [2] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 213.
- [3] M.A. Soliman, J.A. Pedersen, I.H. Buffet, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 223.
- [4] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 340.
- [5] W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 53.
- [6] B. Halling-Sorensen, S.N. Nielson, P.E. Lanzky, L.F. Ingerslev, H.C. Holten Lutzhoft, S.E. Jorgensen, *Chemosphere* 36 (1998) 357.
- [7] T. Christian, R.J. Schneider, H.A. Fäber, D. Skutlarek, M.T. Meyer, H.E. Goldbach, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31 (2003) 36.
- [8] J.M. Cha, S. Yang, K.H. Carlson, *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 46.
- [9] E. Benito-Peña, A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 415.
- [10] S. Babic, D. Asperger, D. Mutavdzic, A.J.M. Horvat, M. Kastelan-Macan, *Talanta* 70 (2006) 732.
- [11] C. Hao, L. Lissemore, B. Nguyen, S. Kleywegt, P. Yang, K. Solomon, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 505.
- [12] M. Petrovic, M.D. Hernando, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [13] W.A. Moats, *J. Chromatogr.* 507 (1990) 177.
- [14] B. Wiese, K. Martin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7 (1989) 107.
- [15] S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 183.
- [16] W. Ahner, E. Scheerwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 69.
- [17] F. Sacher, F.T. Lange, H.J. Brauch, I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 199.
- [18] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 18 (1997) 2427.
- [19] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 20 (1999) 3269.
- [20] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 22 (2001) 4229.
- [21] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 24 (2003) 4116.
- [22] M. Hernández, F. Borull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416.
- [23] C. García-Ruiz, M.L. Marina, *Electrophoresis* 27 (2006) 266.
- [24] M.E.P. Hows, D. Perret, J. Kay, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 97.
- [25] Y.M. Li, A. Van Schepdael, Y. Zhu, E. Roerts, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 227.
- [26] M. Hernández, F. Borull, M. Calull, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 309.
- [27] Y. Zhu, C. Hoogmartens, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 22 (1999) 1403.
- [28] P. Emaldi, S. Fapanini, A. Baldini, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 339.
- [29] G. Pajchel, S. Tysky, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 223.
- [30] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tysky, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 265.
- [31] M. Bailón-Pérez, L. Cuadros-Rodríguez, C. Cruces-Blanco, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 746.
- [32] L. Nozal, L. Arce, A. Rios, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 21.
- [33] D. Tsikas, G. Brunner, *Chromatographia* 30 (1990) 657.
- [34] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tysky, *J. Chromatogr. B* 800 (2004) 203.
- [35] P. Kowalski, I. Oledzka, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937.
- [36] E.F. Hilder, C. Klampfl, W. Buchberger, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 23 (2002) 414.
- [37] S.M. Santos, M. Henriques, A.C. Duarte, V.I. Esteves, *Talanta* 71 (2007) 731.
- [38] J.M. Serrano, M. Silva, *Electrophoresis* 28 (2007) 3242.
- [39] P. Kowalski, I. Oledzka, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937.
- [40] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 489A.
- [41] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 23 (2002) 2880.
- [42] P. Puig, Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis* 26 (2005) 954.
- [43] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.
- [44] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 406.

M. Isabel Bailón-Pérez
Ana M. García-Campaña
Monsalud del Olmo Iruela
Carmen Cruces-Blanco
Laura Gámiz Gracia

Department of Analytical
Chemistry, Faculty of Sciences,
Granada, Spain

Received November 10, 2008
Revised January 14, 2009
Accepted February 7, 2009

Research Article

Multiresidue determination of penicillins in environmental waters and chicken muscle samples by means of capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry

A new analytical method based on CZE coupled with tandem MS detection (CE-MS/MS) has been developed for the simultaneous determination of nine penicillins of human and veterinary use (nafcillin, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, ampicillin, penicillin G, amoxicillin, penicillin V and piperacillin), whose levels are regulated by the EU Council regulation No. 2377/90 in animal edible tissues. CE separation conditions, sheath liquid composition and electrospray parameters have been carefully optimized to reach high sensitivity and precision. Separation was carried out in a 96 cm total length fused-silica capillary (50 μm id, 360 μm od) using 60 mM ammonium acetate at pH 6.0 as running buffer. Lomefloxacin was used as internal standard. MS/MS experiments were carried out using an IT as analyzer operating in multiple reaction monitoring mode to achieve the minimum number of identification points established by the 2002/657/EC European Decision. The use of an SPE procedure in two steps, combining Oasis hydrophilic-lipophilic balance and Alumina N cartridges provide a satisfactory preconcentration and clean up treatment for meat samples after extraction of the compounds with ACN. Only Oasis hydrophilic-lipophilic balance cartridges were necessary in water samples to obtain adequate recoveries. The method has been characterized for its use in meat and water samples, using matrix-matched calibrations. For chicken muscle samples, LODs between 8 and 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ have been obtained, in all cases lower than the maximum residue limits permitted. For water samples LODs from 0.18 to 0.26 $\mu\text{g}/\text{L}$ could ensure its satisfactory application in aquatic samples.

Keywords:

CE-MS/MS / Meat / Penicillins / Water

DOI 10.1002/elps.200800732

1 Introduction

In veterinary medicine, β -lactam antibiotics, which comprises two types of compounds, penicillins and cephalosporins, are widely used for disease treatment and prevention, resulting in the presence of residues in edible tissues or derived products that can lead to health problems, increasing also the incidence of microbial resistance against the compounds [1]. Maximum residue limits (MRLs) of these substances in the low $\mu\text{g}/\text{kg}$ level in different foodstuffs of animal origin, including penicillins, have been set by the European Union in the 2377/90/EEC Regulation [2] and the presence of the residues above these levels could constitute infraction.

Another important problem is due to the fact that a high percentage of antibiotics consumed by humans in hospitals or by prescription are excreted unchanged *via* urine and feces into domestic sewage and are discharged to wastewater treatment plants effluent into the aquatic environment [3]. In spite of the poor stability of the β -lactam ring that can be opened by β -lactamases or by chemical hydrolysis, it is possible to find residues of these compounds in aquifers due to the application of manure of sludge to soils or because of hospital and domestic wastewaters. Conventional sewage treatments appear to be insufficient for removing these residues [4, 5].

HPLC has been mainly used to analyze antibiotics in different matrices, usually coupled with MS, as is shown in some review articles [6–11] and books [12–14]. Several methods have been established for the analysis of β -lactams in foods of animal origin, using mainly UV detection [15, 16] or MS [15, 17–23]. These residues or a combination with other pharmaceutical compounds have also been detected in water samples by LC with UV detection [24, 25] and with MS detection in tap and surface water [26] and in surface water and urban wastewater [5]. CE is becoming a useful alternative

Correspondence: Professor Ana M. García-Campaña, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: amgarcia@ugr.es
Fax: +34-958-249510

Abbreviations: HLB, hydrophilic-lipophilic balance; IS, internal standard; MRL, maximum residue limit

technique in food quality control due to simplicity, short separation times and lower consumption of reagents and solvents. Some reviews have included the applications of CE in the analysis of antibiotics [11, 27–32]. In relation to β -lactams, MEKC has been applied to the simultaneous separation of several penicillins [33–40] in different matrixes and to the screening of penicillin compounds in farm water samples [41]. Capillary isotachopheresis has been applied for the analysis of penicillins and cephalosporins in pharmaceutical preparation [42], and CZE has been used for the analysis of penicillin G [43] and amoxicillin [44] together with other drugs [45] and for the simultaneous screening of six antibiotics, including four penicillins in milk [46]. Recently, large volume sample stacking has been applied for the simultaneous determination of seven penicillins in milk, and natural and wastewaters [47, 48]. The combination of off-line and online preconcentration procedures allowed the establishment of very low detection limits, being possible the monitoring of these residues by CZE with UV detection in these types of samples. The coupling of CE with MS detection for monitoring of residues in foods is an attractive alternative to LC-MS, which combines the advantages of both techniques [49] but this strategy has been scarcely used in the determination of antibiotics [50–52]. Concerning β -lactams, electrospray-MS detection has been applied for the detection of penicillin V and related substances by CE in a real fermentation broth [53]. Using a sheathless interface for coupling CE to MS, a mixture of nine-peptide standard solution containing bacampicillin and ampicillin was resolved, studying the parameters that influence the separation and the stability of the spray [54]. To our knowledge, the only paper using CE-MS for the quantitative analysis of this kind of compounds consists of a multiresidue determination of four classes of antibiotics in fish and livestock [52], including four penicillins (amoxicillin, ampicillin, penicillin V and oxacillin). Taking into account the European Decision concerning the minimum number of identification points required for confirmatory analysis of residues on foods [55], in this paper we have developed a CE method using tandem MS detection for the simultaneous identification and determination of nine penicillins of human and veterinary use, legislated by the 2377/90/EEC Regulation, showing the potential of the proposed technique for the analysis of a complex matrix, such as chicken muscle and the possibilities in the detection of these residues at very low $\mu\text{g/L}$ levels in different water samples.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade. ACN, methanol, ammonium hydroxide, and sodium hydroxide were supplied by Panreac (Madrid, Spain). 2-Propanol, formic acid, and ammonium acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The penicillins nafcillin, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, ampicillin, penicillin G,

amoxicillin, penicillin V, piperacillin and a quinolone, lomefloxacin, used as internal standard (IS), were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) was obtained by using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Stock standard solutions of 1000 mg/L of each penicillin and of lomefloxacin (IS) were prepared by dissolving 10 mg of the product in 10 mL of water, stored at 4°C in the dark, and then diluted to the desired concentration prior to use. Under such conditions, they were stable for at least 2 months.

Extraction cartridges containing an Oasis hydrophilic-lipophilic balance (HLB; 60 mg, 3 mL; Waters, Milford, MA, USA) and Alumina N (500 mg, 3 mL; E. Merck, prepared in laboratory) cartridges were used.

2.2 CE conditions

CE experiments were carried out with an HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with a UV-visible detector working at 220 nm with a bandwidth of 16 nm. UV-Vis electropherograms were acquired using the software provided by the HP ChemStation version A.09.01. Separation was carried out in a bare fused-silica capillary (96 cm total length \times 50 μm id, 360 μm od) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Injections were made at the anodic end using a pressure of 50 mbar for 80 s (ca. 3.4% of the total capillary volume = 64 nL). The electrophoretic separation was achieved with a voltage of 30 kV (normal mode) with an initial ramp of 0.3 min. The running buffer was an aqueous solution of 60 mM ammonium acetate adjusted to pH 6.0 with acetic acid 1 M. The temperature of the capillary was kept constant at 30°C. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with 1 M NaOH for 10 min at 60°C, then with water for 5 min, and finally with the BGE, an aqueous solution 60 mM ammonium acetate adjusted to pH 6.0 with acetic acid 1 M, for 20 min. A pressure of 1 bar was applied. At the beginning of each day, the capillary was prewashed with a N_2 pressure of 7 bar for 3 min with water and also for 3 min with 0.1 M NaOH, again 3 min with water, and finally 5 min with running buffer. After each run, the capillary was prewashed at 7 bar for 1 min with the running buffer in order to obtain a satisfactory repeatability of run-to-run injections.

2.3 ESI interface

The Agilent coaxial sheath-liquid sprayer was used for CZE-MS coupling (Agilent Technologies). The fused-silica capillary was mounted in a way that the tip just protruded from the surrounding steel needle $\sim 1/2$ of the capillary od. The sheath liquid consisted of 2-propanol/water/formic acid (50:47:3 v/v/v) and was delivered at a flow rate of 3.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ by a PU-2085 Jasco high-pressure pump (Jasco Analytica, Madrid, Spain), equipped with a splitter 1:100. The ESI voltage was set to -4200 V . Other electrospray parameters at

optimum conditions were: nebulizer pressure, 8 psi; dry gas flow rate, 6 L/min; and dry gas temperature, 250°C. To avoid the entrance of air bubbles during the injection step due to the Venturi effect caused by nebulizer gas, it was necessary to carry out the preconditioning and the sample injection with the nebulizer pressure and the ESI voltage set at zero, and a delay of 2 min was introduced after the sample injection before setting the optimum spray gas and ESI voltage.

2.4 MS and MS/MS conditions

MS was performed using an Agilent 1100 Series LC/MSD SL mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an IT analyzer. MS spectrometer was controlled by a PC running the Esquire software 4.1 from Bruker Daltonics (Bremen, Germany).

The mass spectrometer was operated in the positive ion mode and scanned at 120–550 m/z (target mass 382 m/z , compound stability 100%) at 13 000 $m/z/s$. In the MS experiments, the trap parameters were selected in ion charge control mode using a target of 50 000, maximum accumulation time of 300 ms, and five averages *per* experiment. In MS/MS experiments, the maximum accumulation time was set at 50 ms with two averages *per* experiment and used a target of 50 000. Fragmentation was carried out by means of collision-induced dissociation with the helium present in the trap for 40 ms in multiple reaction monitoring mode. MS/MS parameters are summarized in Table 1 and MS/MS spectra and their corresponding structures are shown in Fig. 1.

2.5 Meat sample preparation

Chicken muscle samples were purchased from a local market. A sample treatment for extraction, preconcentration and cleanup has been applied based on that previously

reported for milk analysis [47, 56]. It consists of the use of ACN for sample extraction and SPE cartridges for sample cleanup. A sample portion of 5 g of meat was spiked with different concentration levels of penicillins. After spiking and homogenizing, the meat sample was put in the dark and then 5 mL of ACN was added and the sample was vortexed for 3 min. Additional ACN (10 mL) was added, followed by mixing for 3 min. The sample was centrifuged at 1800 rpm for 5 min, and the clear extract was transferred to a glass tube. The extract was evaporated to approximately 0.5 mL using a stream of N_2 at 60°C, using this soft condition to minimize losses of analyte, then 3 mL of phosphate buffer pH 8.5 was added, and the sample was mixed by vortex mixer for 1 min. Therefore, two different SPE cartridges were selected in order to clean up and concentrate the samples. The first one was an Oasis HLB cartridge in which the analytes were retained. It was previously washed sequentially with 5 mL of methanol, 5 mL of ACN, 5 mL of deionized water and 3 mL of phosphate buffer, pH 8.5. Without using vacuum, the sample extract was passed through the column. The antibiotics were eluted with 6 mL of ACN at 1–2 mL/min, using a vacuum manifold. The eluate was passed through the second cartridge, an Alumina N, which is a polar sorbent SPE cartridge that allows a sample cleanup, at a flow rate of approximately 1 mL/min. The β -lactams antibiotics were eluted with 3 mL of deionized water. This final solution was evaporated to dryness under a gentle N_2 current at 60°C and then reconstituted with 0.5 mL of deionized water containing 300 $\mu\text{g/L}$ of lomefloxacin as IS. This compound is a quinolone antibacterial only applied for human use, which has been selected as IS because it presents a similar behavior in CE-MS in relation of the studied analytes, satisfactory stability and purity and its use is forbidden in veterinary medicine. The application of the IS can improve significantly the quantitative performance of the method in terms of precision, linearity and recovery data. With this procedure, the highest recoveries (ranging 86–96%) were obtained in the simultaneous extraction of the studied compounds.

Table 1. Main parameters of the MS/MS method and identification points

Analyte	Amoxi	Ampi	Pipera	Peni G	Peni V	Cloxa	Oxa	Dicloxa	Nafci	Lome (IS)
Precursor ion	366.4	350.4	518.5	335.4	351.2	436.88	402.4	470.2	415.2	352.3
Amplitude (V)	0.85	0.65	1.00	0.70	0.65	0.55	0.85	0.45	0.50	0.85
Width (m/z)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cut-off (m/z)	100	96	143	91	96	120	110	130	114	100
Fragment ions	136.9	106.1	464.6	141.0	114.1	163.9	126.1	160.1	115.1	225.2
	185.0	160.1	350.1	173.1	160.0	277.2	160.0	311.1	181.1	265.2
	203.2	174.0	243.1	195.1	192.2	333.3	175.2		199.1	288.3
	258.2	191.0		215.2	235.2	356.4	219.1		256.2	308.3
	320.6	215.1		249.1	281.0	390.2	243.1			334.2
	349.1	305.1		263.9	333.4		283.3			
		333.1		307.2						
				317.4						
Identification points	10	11.5	5.5	13	10	8.5	10	4	7	8.5
Segments (min)	7–19	7–19	19–25	19–25	19–25	7–19	7–19	7–19	7–19	4–7

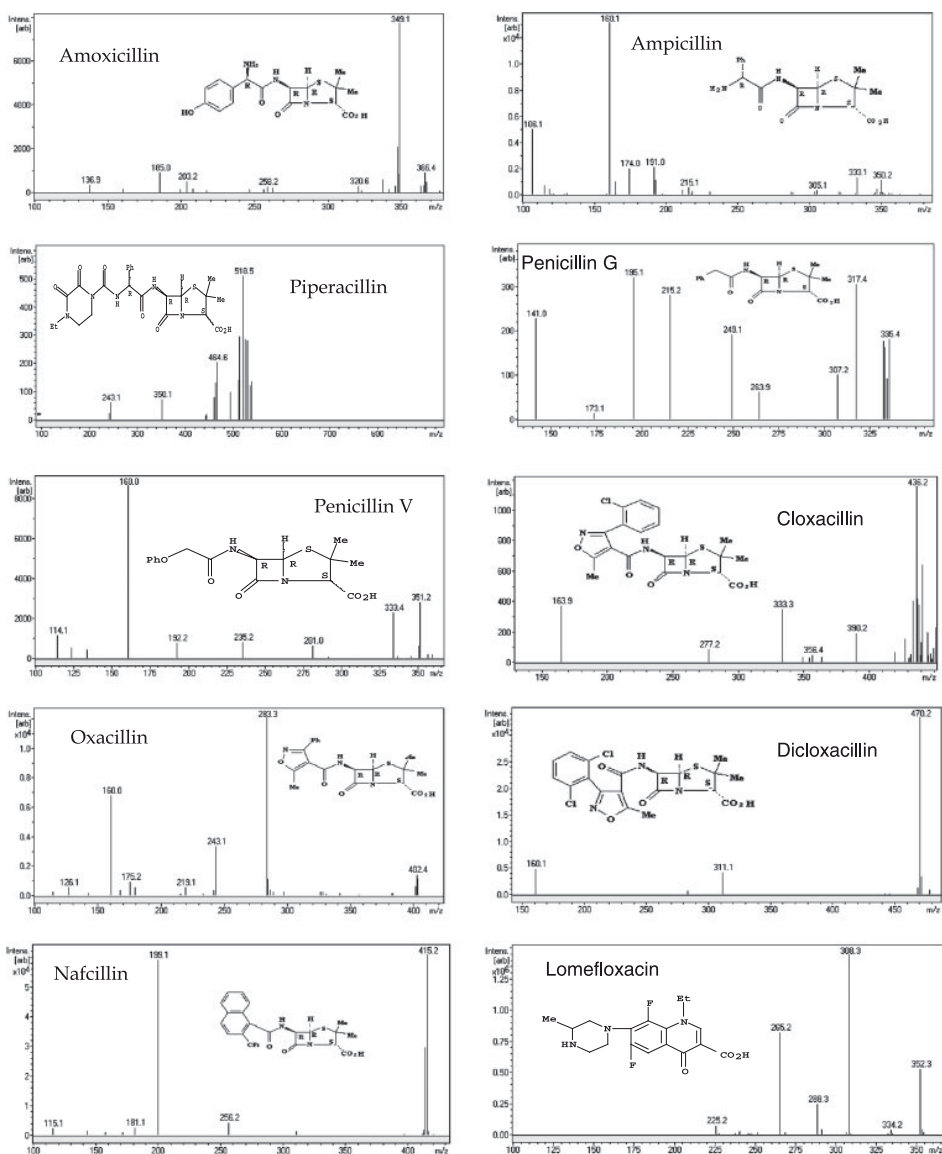


Figure 1. MS/MS spectra of the studied β -lactams and their corresponding structures.

2.6 Water sample treatment

Different types of water were analyzed. River water was collected from a local river (Fardes, Granada, Spain), as the

well water from a local well (Guadix, Granada, Spain). Different aliquots of 250 mL of filtered water samples were spiked with different concentrations of penicillins, following a treatment previously reported [48]. It consists of the use of

SPE cartridges for sample preconcentration and cleanup. An Oasis HLB cartridge was selected in which the analytes were retained. It was previously washed sequentially with 5 mL of methanol, 5 mL of ACN, 5 mL of deionized water and 3 mL of phosphate buffer, pH 8.5. Without using vacuum, the sample extract was passed through the column. The antibiotics were eluted with 6 mL of ACN; this final solution was evaporated to dryness under a gentle N₂ current at 60°C. The final residue was reconstituted in 500 µL of water containing 300 µg/L of lomefloxacin as IS.

3 Results and discussion

3.1 Electrophoretic separation

Before the application of the MS detection previous studies were carried out in order to optimize the electrophoretic separation of the selected compounds using a UV-Vis detector. In this sense, the pH and the ionic strength of the BGE, the separation voltage and the temperature were evaluated. In addition, in order to consider the compatibility of a CE method with MS, a volatile buffer of low conductivity (*i.e.* electric current below 50 µA) must be used to avoid plugging of the dielectric capillary between the spray chamber and the mass spectrometer, as well as to obtain a stable electrospray [57, 58]. Neutrals or basic buffers were the most satisfactory to obtain efficient separations for β-lactam antibiotics, because with acid buffers no satisfactory resolution was obtained. Ammonium acetate and ammonium hydrogen carbonate were tested; the best results were obtained with the ammonium acetate buffer. The optimized buffer concentration was 60 mM as it was found to provide a good compromise among peak shape, electrical current intensity and analysis time. The separation voltage was also optimized, and a value of 30 kV was selected. Finally, the temperature of the capillary was set to 30°C. The studied ranges and selected values of all the parameters concerning the electrophoretic separation are summarized in Table 2.

3.2 CE-ESI-MS/MS optimization

Starting from the optimum values for separation, the optimization of the parameters affecting the CE-MS/MS method was carried out. With the aim of choosing the adequate operation

Table 2. Optimization of the electrophoretic separation using UV/Vis detection

Parameter	Studied range	Optimum
pH	5–10	6.0
BGE concentration (mM)	40–90	60
Separation voltage (kV)	20–30	30
Capillary temperature (°C)	15–35	30

mode for the mass spectrometer, different sheath liquids were tested containing 1% formic acid (for positive mode) or 0.5% of ammonium hydroxide (for negative mode). In addition, it was necessary to select the organic solvent present in the sheath liquid. Mixtures of ACN, methanol, ethanol and 2-propanol with water were tested, all at a ratio of 1:1. As shown in Fig. 2, the best results in terms of intensity of MS signal for the studied β-lactams were obtained using the mixture 2-propanol/water in the presence of formic acid, operating in positive mode. Using these conditions, we studied all the parameters related with the electrospray formation in order to obtain the best *S/N* for all the analytes. The factors studied and their corresponding ranges were: nebulizer pressure, 2–20 psi; dry gas temperature, 150–300°C; dry gas flow rate, 2–10 L/min; sheath liquid flow rate, 2–10 µL/min; percentage of 2-propanol in the sheath liquid, 10–70%; and percentage of formic acid in the sheath liquid, 0.5–5%. The optimum values obtained, as a compromise to achieve the highest *S/N* for all the studied compounds, were: nebulizer pressure, 8 psi; percentage of formic acid 3%; percentage of 2-propanol, 40%; dry gas flow rate, 6 L/min; dry gas temperature, 250°C; and sheath liquid flow rate, 4 µL/min. The results of this optimization study for all the selected penicillins are shown in Fig. 3.

Using the above-established spray conditions with MS mode, an optimization of the MS/MS mode was considered. We selected the MRM mode because of some peaks could not be well resolved. For fragmentation experiments, a cut-off of 27% of the precursor mass was set (*i.e.* the minimum *m/z* of the fragment ion able to be trapped by the analyzer). The compounds were fragmented using the SmartFrag option that automatically ramps the fragmentation energy from 30 to 200% of the excitation amplitude. The fragmentation amplitude was manually varied and optimized by monitoring the intensities of the fragment ion in order to reach a maximum and also allowing us to see the precursor ion into the trap. To improve sensitivity, the injection time was optimized in the range from 10 to 100 s, by applying a pressure of 50 mbar. From this study, we selected an optimum value of 90 s, avoiding band broadening and achieving satisfactory *S/N*. Lomefloxacin was selected as IS because it is a synthetic antibiotic belonging to quinolones of human use, not expected to be present in animal foodstuffs, with an adequate migration time and which does not interfere with β-lactams or matrix peaks.

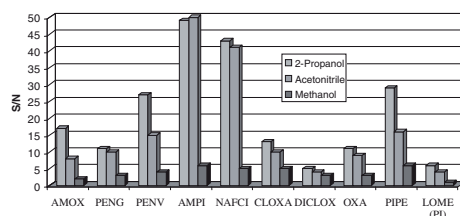


Figure 2. Influence of the type of organic solvent used in the sheath liquid.

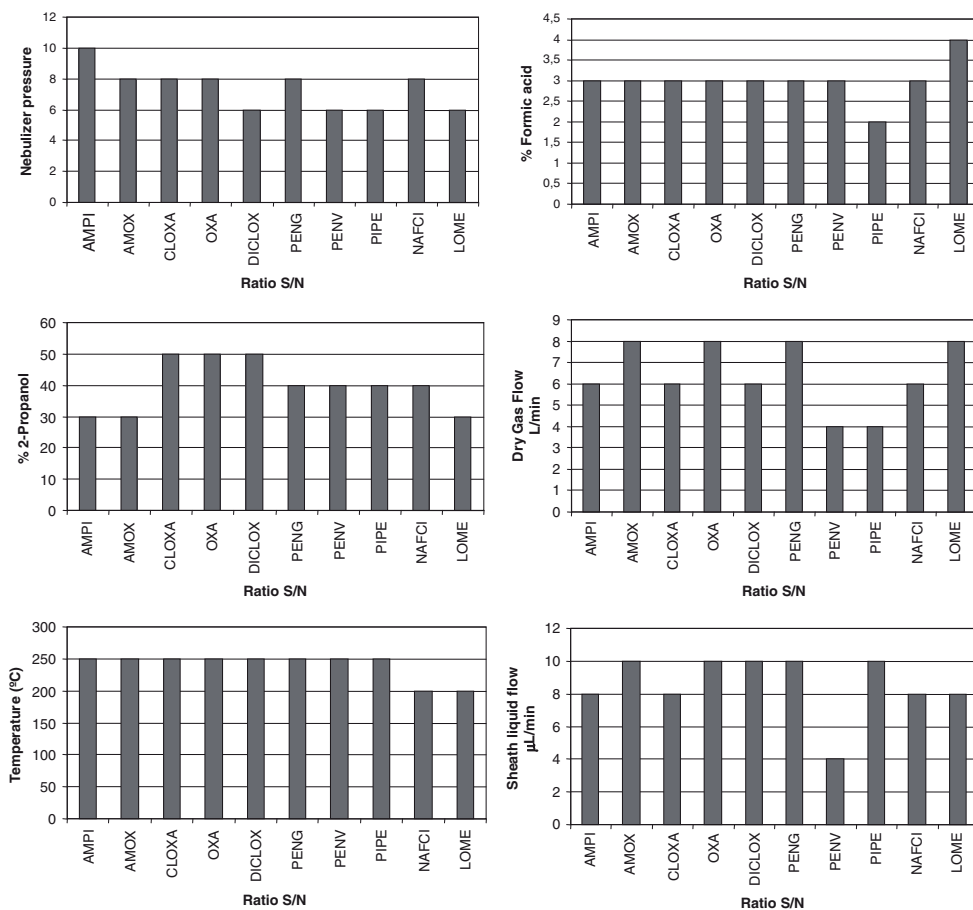


Figure 3. Optimization of the significant variables related with the electro-spray. The values represented correspond to the maximum S/N for each studied compound.

3.3 Performance characteristics of the method

The whole optimized CE-MS/MS method was characterized for both types of matrixes. For this purpose, calibration curves for the studied penicillins were established in the presence of the corresponding clean matrix (chicken muscle or well and river water samples), by spiking samples with the subsequent calibration levels before SPE treatment. For the case of chicken muscle samples, the linearity of the response was established from six calibration levels corresponding to 30, 60, 100, 150, 300 and 500 µg/kg for ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, penicillin G, penicillin V, piperacillin, and 20, 60, 100, 150, 300 and 500 µg/kg for nafcillin. In all cases, 500 µg/kg of lomefloxacin was added as IS. Each one was injected in

triplicate. Calibration curves were obtained by using the relative corrected peak areas (as the ratio analyte peak *per* migration time to IS peak *per* migration time) as a function of the analyte concentration. The satisfactory determination coefficients ($R^2 > 99\%$) confirm that penicillins' responses were linear over the studied range for chicken meat samples. All the statistical parameters calculated by least-square regression and the performance characteristics are shown in Table 3. LODs and LOQs have been calculated using S/N of 3 and 10, respectively. In all cases, the obtained LODs were below the legislated MRLs for chicken muscle.

For the characterization of the method in water samples, clean well water sample was used for the establishment of matrix calibration curves by spiking with different concentration

levels before SPE treatment. The calibration levels were 0.7, 1.5, 5.0, 10.0, 15.0 and 20.0 µg/L for amoxicillin, ampicillin, penicillin G, penicillin V, piperacillin, oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin, and 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 and 15.0 µg/L for nafcillin. In all cases, 500 µg/L of lomefloxacin was added as IS. Each concentration level was injected by triplicate. Calibration curves were established by considering the relative corrected peak areas as a function of the analyte standard concentration. The statistic parameters calculated by least-square regression and the performance characteristics of the CE-MS/MS method for water samples are presented in Table 3. The satisfactory determination coefficients confirm that responses were linear over the studied range. As it can be seen, for all the studied compounds, very low LODs have been obtained for this matrix.

3.4 Precision study

The precision of the method for chicken muscle samples and water samples was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. The results expressed as RSD of the relative corrected peak areas and migration times are summarized in Table 4. Repeatability was assessed on the same day by means of five injections of three samples with a concentration of 30, 100 and 200 µg/kg or 0.7, 10 and 20 µg/L of each penicillin, for chicken muscle and water samples, respectively. Intermediate precision was assessed in five consecutive days (three injections) with a procedure similar to repeatability studies. Acceptable precision was obtained in all cases. We consider that the proposed method CE-MS/MS offers simultaneously the separation, quantification and unambiguous confirmation of the studied analytes based on the identification points required by the EU Decision for chicken meat samples and permits the monitoring of very low levels of these residues in waters.

3.5 Checking the trueness by means of recovery studies

In order to check the applicability of the proposed methodology, trueness was assessed by means of recovery assays by adding the antibiotics in analyte-free chicken meat and water samples, following the above-mentioned sample treatments. Chicken meat samples were spiked with a mixture of the nine β-lactams (amoxicillin, ampicillin, dicloxacillin, cloxacillin, oxacillin, penicillin G, penicillin V, piperacillin and nafcillin) at different levels (30, 200 and 500 µg/kg for each one), selected according to the recommendations of the European Commission in relation to the monitoring of drugs [55]. Each level was prepared in triplicate and injected three times. In order to ensure the absence of the studied compounds in this matrix and to evaluate the noise, a blank sample was submitted to the proposed sample treatment, and neither peaks corresponding to the analytes nor matrix peaks, were found comigrating with the analytes. Figure 4A shows the electropherogram at optimum conditions of a free-penicillin chicken meat sample spiked at different analyte concentrations using the proposed CE-MS/MS method. The calculated recoveries are shown in Table 5. As it can be seen the method provides good results in terms of both recovery and precision when meat samples are analyzed.

Free-penicillin well water and river water samples were spiked with a mixture of the nine studied compounds at different levels (0.7, 10 and 20 µg/L of each one), selected in relation to the low concentrations expected to be found in this kind of samples. Each level was prepared by triplicate and injected three times. The results are summarized in Table 5, demonstrating also the satisfactory values for both samples. Figures 4B and C show the total ion electropherograms at optimum conditions of free-penicillins well

Table 3. Statistic and performance characteristics of the proposed CE-MS/MS method for the analysis of β-lactams in chicken muscle (A) and in water samples (B)^{a)}

	Amoxi	Ampi	Cloxa	Dicloxa	Oxa	Nafci	Peni G	Peni V	Pipera
(A) Chicken meat samples									
Intercept	0.433	0.218	0.061	0.136	0.064	0.369	0.026	-0.008	-0.066
Slope	0.005	0.013	0.004	0.003	0.005	0.006	0.003	0.004	0.005
R ²	0.995	0.992	0.994	0.994	0.994	0.992	0.993	0.996	0.993
MRLs (µg/kg)	50	50	300	300	300	-	50	-	-
LOD (µg/kg)	11	10	11	10	12	8	10	10	11
LOQ (µg/kg)	28	27	29	28	30	23	29	28	30
Linear range (µg/kg)	11–500	10–500	11–500	10–500	12–500	8–500	10–500	10–500	10–500
(B) Water samples									
Intercept	0.435	0.251	0.154	0.230	-0.003	0.175	0.362	0.163	0.216
Slope	0.111	0.217	0.089	0.075	0.153	0.378	0.151	0.181	0.367
R ²	0.992	0.992	0.992	0.994	0.993	0.995	0.993	0.993	0.995
LOD (µg/L)	0.25	0.24	0.26	0.25	0.26	0.18	0.25	0.23	0.25
LOQ (µg/L)	0.68	0.69	0.70	0.70	0.70	0.60	0.68	0.67	0.69
Linear range (µg/L)	0.25–20	0.24–20	0.26–20	0.25–20	0.26–20	0.18–15	0.25–20	0.23–20	0.25–20

a) The MRLs are indicated for each compound in chicken muscle; well water was selected as representative matrix.

Table 4. Procedure precision study: (A) chicken muscle samples; (B) well water samples

	Nafci	Amoxi	Peni G	Ampi	Oxaci	Cloxa	Dicloxa	Peni V	Pipera
(A)									
<i>Intraday RSD (%) (n = 5)</i>									
30 µg/L	3.2	4.0	4.4	5.5	5.8	4.7	4.7	3.6	4.9
100 µg/L	4.3	4.6	4.2	3.6	4.8	5.1	5.9	2.9	4.2
200 µg/L	4.8	3.9	3.3	4.3	5.6	3.9	4.5	3.1	3.0
Migration time	0.6	0.8	0.7	0.6	0.8	0.7	0.9	0.7	0.4
<i>Interday RSD (%) (n = 15)</i>									
30 µg/L	4.3	5.2	4.9	4.3	4.8	5.3	5.1	4.7	4.4
100 µg/L	3.1	4.7	4.0	3.7	5.9	6.4	7.1	5.9	6.1
200 µg/L	6.3	7.1	6.6	7.3	7.9	8.3	7.9	6.8	7.2
Migration time	2.3	3.1	4.7	3.9	5.3	5.9	6.6	4.8	4.4
(B)									
<i>Intraday RSD (%) (n = 5)</i>									
0.7 µg/L	4.2	4.4	3.4	3.5	4.9	5.1	4.3	4.4	4.7
10 µg/L	3.6	4.8	4.5	3.9	4.7	4.8	4.7	3.9	4.8
20 µg/L	4.8	4.3	4.4	3.3	4.9	4.7	4.9	4.5	4.3
Migration time	0.6	0.5	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	0.7	0.6
<i>Interday RSD (%) (n = 15)</i>									
0.7 µg/L	4.7	4.9	4.4	4.8	3.8	5.7	5.3	4.9	4.8
10 µg/L	4.2	4.7	4.8	4.6	4.1	4.9	5.1	4.3	4.9
20 µg/L	4.9	5.1	5.1	4.9	4.9	6.1	4.9	3.8	5.3
Migration time	1.9	2.7	4.6	3.0	4.0	3.9	4.7	3.7	4.7

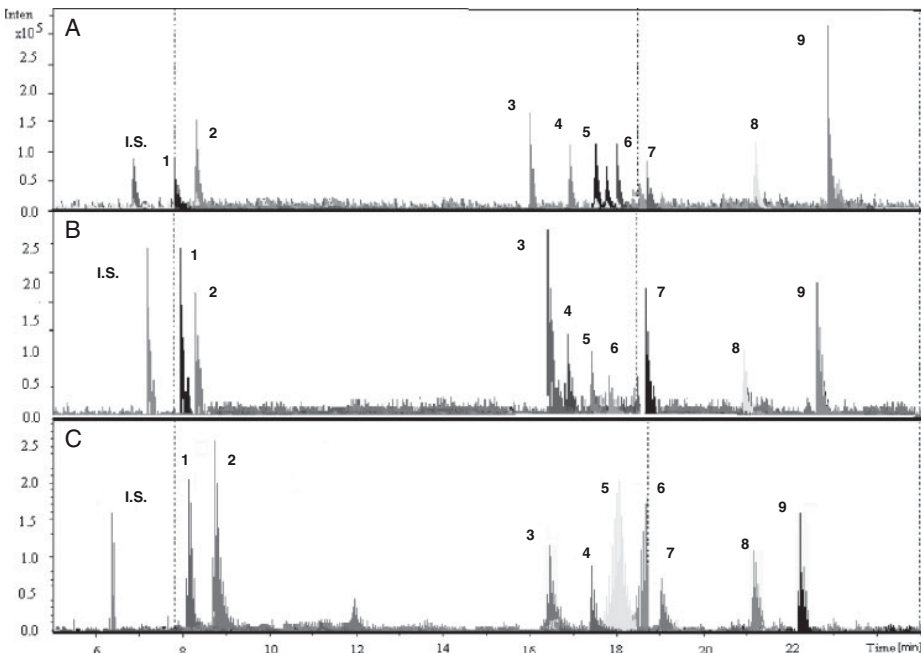


Figure 4. CE-MS/MS electroferograms at optimum conditions: (A) a chicken meat sample spiked with 60 µg/kg of amoxicillin (1), ampicillin (2), nafcillin (3), dicloxacillin (4), cloxacillin (5), oxacillin (6), penicillin G (7), penicillin V (8), piperacillin (9) and 500 µg/kg of lomefloxacin (IS). (B) Well water sample and (C) river water sample, both spiked with 5 µg/L of amoxicillin (1), ampicillin (2), dicloxacillin (4), cloxacillin (5), oxacillin (6), penicillin G (7), penicillin V (8), piperacillin (9), 3 µg/L of nafcillin (3), and 500 µg/L of lomefloxacin (IS).

Table 5. Recoveries obtained by the proposed CE-MS/MS for each β -lactam at different spiked levels: (A) chicken meat samples; (B) well and river water samples

		Amoxi	Ampi	Cloxa	Dicloxa	Oxac	Nafci	Peni G	Peni V	Pipera	
(A)											
30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	<i>R</i> (%)	90	88	86	87	84	96	90	92	93	
	RSD	2.8	3.7	3.9	4.2	5.8	3.1	4.8	4.2	3.9	
200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	<i>R</i> (%)	89	96	91	89	87	97	93	94	95	
	RSD	4.7	3.9	4.9	3.7	5.3	2.6	3.8	3.9	4.2	
500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	<i>R</i> (%)	89	97	93	90	89	97	94	96	96	
	RSD	3.1	3.4	3.5	4.1	4.1	2.9	3.2	3.9	3.8	
(n = 9)											
(B)											
Well water	0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$	<i>R</i> (%)	94	92	94	92	89	98	95	95	97
		RSD	1.9	3.5	2.7	3.4	4.0	2.8	3.9	3.5	2.3
10 $\mu\text{g}/\text{L}$	<i>R</i> (%)	96	96	93	95	96	99	96	96	96	
	RSD	2.4	3.0	3.5	2.8	4.1	2.1	3.0	3.6	3.1	
20 $\mu\text{g}/\text{L}$	<i>R</i> (%)	97	98	95	96	96	98	96	96	97	
	RSD	2.9	2.7	3.0	3.2	3.9	3.3	3.5	3.9	3.8	
River water	0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$	<i>R</i> (%)	93	94	95	92	93	95	94	94	96
		RSD	3.4	3.8	2.4	4.6	3.9	3.7	3.1	3.8	2.7
10 $\mu\text{g}/\text{L}$	<i>R</i> (%)	96	96	96	92	95	97	94	94	97	
	RSD	3.2	4.0	4.2	4.0	4.6	3.5	3.4	3.8	3.7	
20 $\mu\text{g}/\text{L}$	<i>R</i> (%)	96	96	96	93	96	97	96	96	96	
	RSD	2.9	3.1	3.9	4.5	3.7	2.2	4.2	4.1	4.1	
(n = 9)											

water and river water samples, respectively, spiked at different analyte concentrations using the proposed CE-MS/MS method.

4 Concluding remarks

A sensitive and specific CE-MS/MS method is described for the determination of nine penicillins for veterinary use in chicken meat samples, being possible its determination and identification below the MRLs and fulfilling with the number of identification points legislated by the EU. The proposed method eliminates the need to separate quantification and confirmation procedures as required by most published methods for β -lactams; moreover, it presents the advantages of the application of CE as a separation technique such as simplicity, low cost and analysis time combined with the characteristics inherent to MS detection. The method has also been characterized for its use on environmental water samples, showing very low detection limits. The applied SPE procedure for sample preparation is very adequate for such a complex matrix such as meat and, in the case of the analysis of natural waters, also allows a preconcentration step, which can enhance the sensitivity due to the low level of residues expected in these samples. According to the results obtained in the precision and recovery study, the proposed CE-MS/MS method is accurate for the analysis of both kinds of samples. The developed method could be satisfactorily applied as a routine procedure to identify and quantify penicillins for veterinary use in laboratories of food quality and safety control and also for the monitoring of these residues in environmental waters, due to its robustness and

feasibility, demonstrating the possibilities of CE-MS/MS coupling in this field.

The Spanish Ministry of Science and Innovation (Projects Ref. AGL2007-64313/ALI and CTM2006-06363-TECNO) and EU funds (FEDER) supported this work. This paper is dedicated to Dr. Manuel Román Ceba.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Piddock, L. J. V., *J. Antimicrob. Chemother.* 1996, 38, 1–3.
- [2] Council regulation (ECC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residues levels of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Communities* 1990, L224, 1–20.
- [3] Halling-Sorensen, B., Nielson, S. N., Lanzky, P. E., Ingerslev, L. F., Holten Lutzhoft, H. C., Jorgensen, S. E., *Chemosphere*, 1998, 36, 357–393.
- [4] Ellis, J. B., *Environ. Pollut.* 2006, 144, 184–189.
- [5] Cha, J. M., Yang, S., Carlson, K. H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1115, 46–57.
- [6] Niessen, W. M. A., *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 53–75.
- [7] Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Cannavan, A., Hewitt, S. A., *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 77–98.
- [8] Di Corcia, A., Nazzari, M., *J. Chromatogr. A* 2002, 974, 53–89.

- [9] Petrović, M., Hernando, M. D., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2005, 1067, 1–14.
- [10] Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 973–985.
- [11] Blasco, C., Torres, C. M., Picó, Y., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 895–913.
- [12] Picó, Y. (Ed.), *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments*, Elsevier, Amsterdam 2007.
- [13] Agarwal, V. (Ed.), *Analysis of Antibiotic/Drug Residues in Food Products of Animal Origin*, Plenum Press, New York 1992.
- [14] Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J. (Eds.), *Drug Residues in Foods: Pharmacology, Food Safety, and Analysis*, Culinary and Hospitality Industry Publications Services, TX 2007.
- [15] Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Straub, R. F., Aronson, A. L., *J. AOAC Int.* 1994, 77, 1122–1131.
- [16] Moats, W. A., Romanowski, R. D., *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 237–247.
- [17] Straub, R. F., Linder, M., Voyksner, R. D., *Anal. Chem.* 1994, 66, 3651–3658.
- [18] Holstege, D. M., Puschner, B., Whitehead, G., Galey, F. D., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 406–411.
- [19] Ghidini, S., Zanradi, E., Varisco, G., Chizzolini, R., *Food Addit. Contam.* 2003, 20, 528–534.
- [20] Sonja, R., Diserens, J. M., Standler, R. H., *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4171–4176.
- [21] Bruno, F., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Samperi, R., *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3463–3470.
- [22] Sonja, R., Standler, R. H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1054, 359–363.
- [23] Sonja, R., Rytz, A., Standler, R. H., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1614–1621.
- [24] Benito-Peña, E., Partal-Rodera, A. I., León-González, M. E., Moreno-Bondi, M. C., *Anal. Chim. Acta* 2006, 556, 415–422.
- [25] Ahrer, W., Scheerwenk, E., Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* 2001, 910, 69–78.
- [26] Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H. J., Blankenhorn, I., *J. Chromatogr. A* 2001, 938, 199–210.
- [27] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 1997, 18, 2427–2437.
- [28] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 1999, 20, 3269–3279.
- [29] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 4229–4261.
- [30] Flurer, C. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 4116–4127.
- [31] Hernández, M., Borull, F., Calull, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 416–427.
- [32] García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2006, 27, 266–282.
- [33] Hows, M. E. P., Perret, D., Kay, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 97–104.
- [34] Li, Y. M., Van Schepdael, A., Zhu, Y., Roets, E., Hoogmartens, J., *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 227–236.
- [35] Hernández, M., Borull, F., Calull, M., *J. Chromatogr. B* 1999, 731, 309–315.
- [36] Zhu, Y., Hoogmartens, C., Van Schepdael, A., Roets, E., Hoogmartens, J., *J. Liq. Chromatogr. Ref. Technol.* 1999, 22, 1403–1415.
- [37] Emaldi, P., Fapanini, S., Baldini, A., *J. Chromatogr. A* 1995, 711, 339–346.
- [38] Pajchel, G., Tysky, S., *J. Chromatogr. A* 1999, 846, 223–226.
- [39] Pajchel, G., Michalska, K., Tysky, S., *J. Chromatogr. A* 2004, 1032, 265–272.
- [40] Bailón-Pérez, M. I., Cuadros-Rodríguez, L., Cruces-Blanco, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 746–752.
- [41] Nozal, L., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta* 2004, 523, 21–28.
- [42] Tsikas, D., Brunner, G., *Chromatographia* 1990, 30, 657–662.
- [43] Michalska, K., Pajchel, G., Tysky, S., *J. Chromatogr. B* 2004, 800, 203–209.
- [44] Kowalski, P., Oledzka, I., Lamparczyk, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 937–947.
- [45] Hilder, E. F., Klampfl, C., Buchberger, W., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2002, 23, 414–420.
- [46] Santos, S. M., Henriques, M., Duarte, A. C., Esteves, V. I., *Talanta* 2007, 71, 731–737.
- [47] Bailón-Pérez, M. I., García-Campaña, A. M., Cruces-Blanco, C., del Olmo Iruela, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 4082–4090.
- [48] Bailón-Pérez, M. I., García-Campaña, A. M., Cruces-Blanco, C., del Olmo Iruela, M., *J. Chromatogr. A* 2008, 1185, 273–280.
- [49] Simo, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 1306–1318.
- [50] Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J. M., García-Ayuso, L. E., *Anal. Chem.* 2006, 78, 7665–7673.
- [51] Soto-Chinchilla, J. J., García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., *Electrophoresis* 2007, 28, 4164–4172.
- [52] Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 4180–4191.
- [53] Hilder, E. F., Klampfl, C., Buchberger, W., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2002, 23, 414–420.
- [54] Samskog, J., Wetterhall, M., Jacobsson, S., Markides, K., *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 919–924.
- [55] European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* 2002, L221.
- [56] Straub, R. F., Linder, M., Voyksner, R. D., *Anal. Chem.* 1994, 66, 3651–3658.
- [57] Simó, C., Cifuentes, A., in: Ríos, A., Valcárcel, M., Marina, M. L. (Eds.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam 2005.
- [58] Klampfl, C. W., *Electrophoresis* 2006, 27, 3–34.