



## **INFORME TÉCNICO DE AVANCE N°6**

**DESARROLLO, VALIDACION Y TRANSFERENCIA DE MÉTODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS QUIMICOS EN CARNES Y LECHE.**

**Proyecto SAG: C3-66-14-64**

**Director del Proyecto: Gabriela Massiff de la F.**

**Noviembre 2006**

## INDICE

1.	INTRODUCCION.....	3
2.	AVANCE DE RESULTADOS SEGÚN CARTA GANTT.....	3
2.1	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	3
2.1.1	Desarrollo y Validación del método de análisis para Quinolonas en carnes .....	3
2.1.2	Desarrollo y Validación del método de análisis para Mercurio en carnes .....	3
2.1.3	Validación del método de análisis para Tetraciclinas en carnes. Procedimiento II	4
2.1.4	Desarrollo del método para la determinación de Sulfas en carnes.....	4
2.1.5	Desarrollo del método para la determinación de Sulfas en carnes.....	4
2.2	ACTIVIDADES DE TRANSFERENCIA: SEMINARIOS Y PASANTÍAS.....	4
2.3	REUNIONES DE COORDINACIÓN DE TRABAJO CON EL SAG.....	5
2.4	ENSAYOS DE INTERCOMPARACIÓN.....	5
2.5	REUNIONES INTERNAS DE TRABAJO.....	5
3.	COMENTARIOS.....	5
4.	<b>ANEXOS</b>	
4.1	ANEXO 1. Carta Gantt	
4.2	ANEXO 2. Acta de Reunión del 16 de Mayo de 2006	
4.3	ANEXO 3. Informes Técnicos:	
	ANEXO 3.1 Validación de un método de cuantificación de Quinolonas en carne de cerdo por HPLC con Detector de Arreglo de Diodos	
	ANEXO 3.2 Desarrollo y Validación del método para la determinación de Mercurio en carne de cerdo por Espectroscopia de Absorción Atómica y Vapor Frío	
	ANEXO 3.3 Validación del Método de análisis de Tetraciclinas en cerdo por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	
	ANEXO 3.4 Desarrollo de un método de cuantificación de Sulfonamidas en carne de cerdo por HPLC con Detector de Arreglo de Diodos.	
4.4	ANEXO 4. Transferencias: - Certificados, Lista de Participantes - Presentaciones (Material de Apoyo)	
4.5	ANEXO 5. Informe de Resultados del Ensayo de Intercomparación de Cloranfenicol-002-2005	

## INFORME TÉCNICO DE AVANCE N°6

<b>Nombre del Proyecto:</b>	<b>DESARROLLO, VALIDACION Y TRANSFERENCIA DE MÉTODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS QUIMICOS EN CARNES Y LECHE.</b>
<b>Adjudicado:</b>	Fundación Chile (Ex Intec)
<b>Director del Proyecto:</b>	Gabriela Massiff de la Fuente
<b>Código:</b>	C3-66-14-64
<b>Periodo:</b>	1 Mayo al 30 de Octubre de 2006

### 1. INTRODUCCIÓN

Este Informe contiene el desarrollo de las actividades realizadas durante el periodo que comprende desde el 1° de Mayo y el 30 de Octubre de 2006.

- Este periodo comprende la 3ª y última etapa del Proyecto. Las actividades que se desarrollaron en este periodo fueron definidas en reunión sostenida con la Contraparte Técnica del SAG con fecha 16 de Mayo de 2006 en Lo Aguirre. En el Anexo N°1 se adjunta la carta Gantt de las actividades y el Anexo N°2 contiene los acuerdos tomados en dicha reunión.

### 2. AVANCE DE RESULTADOS SEGÚN CARTA GANTT

Descripción de los resultados obtenidos hasta el 30 de Octubre en las diferentes actividades comprometidas.

#### 2.1 Desarrollo y validación de los métodos de análisis contemplados en esta etapa.

Se desarrollaron y validaron en el CMQ los siguientes métodos de acuerdo a la programación del Proyecto y según los requerimientos establecido en el Programa de Residuos del SAG del año 2006

##### 2.1.1 Desarrollo y validación del método de análisis para Enrofloxacino, Ciprofloxacino y Acido Oxolínico en carne

Se implementó y validó el método para la determinación de estas tres quinolonas en carnes de cerdo y pollo por HPLC con detector DAD. Se optimizaron las condiciones de extracción, realizando algunas modificaciones a los procesos de extracción reportados en la literatura internacional. Con estas modificaciones se logró mejorar significativamente los resultados para este método. Los resultados obtenidos se ajustan a los requerimientos de desempeño del método, según requerimientos nacional e internacional. Los resultados en detalle se presentan en el informe técnico correspondiente que se adjunta en el Anexo 3.1

##### 2.1.2 Desarrollo y Validación dl método de análisis para Mercurio en carne

Se desarrolló y validó el método para la determinación de Mercurio en carne. El método considera una primera etapa correspondiente a la digestión de la muestra, en medio ácido y utilizando un sistema de digestión en vaso cerrado y a Presión (Horno de Microondas, MO). Una vez

mineralizada la muestra, la cuantificación del Mercurio se realiza por Espectroscopia de Absorción Atómica con Vapor Frío. Para la validación del método se utilizó un Material de Referencia Certificado de tejido animal liofilizado que contiene el elemento en estudio. Con este material se evaluó la calidad de los resultados obtenidos, los cuales resultaron ser satisfactorios de acuerdo a los requerimiento tanto de desempeño analítico del método establecido en el Programa Nacional de Residuos del SAG, como de requerimientos internacionales. El Informe técnico que contiene los aspectos y resultados de esta validación de adjunta en Anexo 3.2

#### 2.1.3 Validación del método de determinación de Tetraciclinas en carnes de cerdo y pollo. Procedimiento II.

En la primera etapa del desarrollo del proyecto, fue validado el método para la determinación de Tetraciclina, Oxitetraciclina y Clortetraciclina mediante extracción en fase sólida y luego cuantificación mediante HPLC con detección DAD, obteniéndose resultados satisfactorios. En una segunda etapa se optimizaron algunas de las condiciones del proceso previamente estudiado, obteniéndose un método rápido y eficiente. La evaluación de los resultados obtenidos, luego de las modificaciones estudiadas, son totalmente satisfactorios en términos de sesgo, precisión, recuperación e incertidumbre, cumpliendo a cabalidad con los requerimientos establecidos. Los detalles de este trabajo son descritos en el Informe Técnico presentado en el Anexo 3.3

#### 2.1.4 Desarrollo del método para la determinación de Sulfas en carnes.

Se desarrollo el método para la determinación de las 6 sulfas en carnes: Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfaquinoxalina y Sulfadimetoxina. El método incluye una primera fase mediante la cual se extraen, desde la matriz, la sulfas de interés. Luego el extracto es sometido a un procedimiento de purificación mediante columnas de extracción en fase sólida para eliminación de interferentes. Finalmente se cuantifican las sulfas presentes en el extracto final por HPLC con Detección de Arreglo de Diodos

La cuantificación se realiza mediante Curva de Calibración la cual ha sido preparada sobre la matriz carne y usando un Estándar Interno en muestras y estándares durante la cuantificación. Se entrega el Informe Técnico respectivo en el Anexo 3.4

Los aspectos de calidad de resultados del método validado serán entregados en la transferencia del método a profesionales del SAG.

### 2.2 Actividades de Transferencia al SAG mediante seminarios y Pasantías en el CMQ.

2.2.1 Los días 4 y 5 de Mayo de 2006, el CMQ realizó el Seminario "EVALUACION Y DETERMINACION DE INCERTIDUMBRE EN METODOS DE ANALISIS QUÍMICOS. A este seminario asistió un profesional del SAG de lo Aguirre. En Anexo 4.1 se adjunta certificado de participación

De esta forma y mediante las actividades de capacitación realizadas, todos los profesionales del SAG participantes del Proyecto han recibido la capacitación en temas de validación de métodos y conceptos metrológicos.

2.2.2 Durante el período Agosto - Septiembre se realizaron las siguientes transferencias de métodos a los profesionales de SAG. Esta actividad se realizó en los laboratorios del CMQ

- Transferencia del método de determinación de Mercurio en leche: los días 29 y 30 de Agosto, participaron dos profesionales del SAG
- Transferencia del método de determinación de Plomo en leche: 30 de Agosto, participaron dos profesionales del SAG

- Transferencia del método de determinación de Cadmio en leche: 30 de Agosto, participaron dos profesionales del SAG
- Transferencia del método de determinación de Quinolonas: Enrofloxacin, Ciprofloxacina y Ácido Oxolínico en carnes: transferencia realizada el 27 de Septiembre con la participación de cuatro profesionales del SAG, tres de Lo Aguirre y uno de Punta Arenas
- Se realizó una presentación teórica del desarrollo de los métodos para la determinación de Pesticidas Organoclorados en carnes y leches.

En anexo 4.1 se adjuntan certificados de participación y en Anexo 4.2 contiene las presentaciones de dichas actividades

### 2.3 Reuniones de coordinación de trabajo con el SAG.

Durante este período se realizaron dos reuniones de coordinación entre con la contraparte técnica del SAG, Sr. Pedro Enríquez, la directora del CMQ y el coordinador del Proyecto por parte del CMQ. La primera de ellas fue realizada el 16 de Mayo en las dependencias del SAG en donde se revisó el avance del proyecto y se acordaron las actividades a desarrollar en función de los últimos requerimientos. Una segunda reunión fue realizada con fecha 02 de Noviembre de 2006, donde se reportaron las actividades desarrolladas, se definieron las directrices para el Informe Técnico de Avance N° 6. También se analizó la situación de algunas actividades que no serán posibles de realizar antes de Noviembre, las que quedarán pendientes y que se realizarán antes del 30 de Marzo de 2007. Estas actividades a solicitud del Jefe de Laboratorios de Química Ambiental y Alimentaria del SAG, se postergan para su transferencia en la fecha señalada, ya que los equipos requeridos fueron recientemente adquiridos por el laboratorio de QAA y están en proceso de instalación y puesta en marcha, correspondiendo a un cromatógrafo líquido y un cromatógrafo de gases. Adicionalmente existe el antecedente de un acuerdo previo entre las partes (año 2003) que la parte técnica del Proyecto terminaría en Marzo del 2007 debido al atraso del SAG en entregar los fondos después de firmado el Contrato en Noviembre del 2003. Un acta con los acuerdos sostenidos en la reunión de coordinación del 02 de Noviembre se adjunta en el Anexo 5

### 2.4 Ensayos de Intercomparación.

Una de las actividades que serán desarrolladas durante el período Diciembre 2006-Marzo 2007 son los Ensayos de Intercomparación que se realizarán para la determinación de clortetraciclina en solvente orgánico (con lo que se evaluarán las capacidades de cuantificación de los laboratorios) y de clortetraciclina en matriz de tejido animal con lo que se evaluará el desempeño global de todo el método analítico empleado para esta determinación. En esta actividad participarán tanto laboratorios habilitados por el SAG, como también los propios laboratorios del SAG

### 2.5 Reuniones internas de trabajo.

Durante este período se realizaron reuniones -en forma periódica- del grupo de trabajo del CMQ en donde se presentaron los avances del trabajo desarrollado, se discutieron los resultados obtenidos y se analizó el estado del arte en materia de métodos y regulaciones que estuviesen relacionados con los alcances del Proyecto.

## 3. COMENTARIOS

- 3.1 El CMQ participa, a nivel internacional, en diversas actividades en el ámbito de la metrología química y dentro de este ámbito en los grupos de trabajos relacionados con el tema alimentario. Así la Directora del CMQ Sra. Gabriela Massiff participó en el período Mayo-Octubre en dos actividades:



- 1) International Workshop on Chemical Metrology, realizado en Uruguay entre el 23 y el 26 de Mayo de 2006. Durante este Workshop se realizó en forma especial el seminario: "Impacto de la Metrología Química en la salud, nutrición y seguridad alimentaria" donde se abordaron temas tales como:
  - Reglamentos, metrología y evaluación de la conformidad en el área alimentaria
  - La metrología química como soporte de reglamentaciones nacionales / regionales
  - Infraestructura global para establecer la trazabilidad y comparabilidad de acuerdo con medidas SPS y otras reglamentaciones, para eliminar las barreras técnicas al Comercio, con enfoque en seguridad alimentaria y temas relacionados con la salud, entre otros.
- 2) En las reuniones de trabajo del grupo de Química Orgánica (Organic Working Group) del CCQM realizadas en Korea, entre el 27 y 4 de Noviembre de 2006. En esta reuniones se delinearon las actividades a desarrollar en el corto y largo plazo y se definieron las prioridades para el desarrollo de MR y de Ensayos de Intercomparación entre los cuales se encuentran los del área de alimentos

3.2 El CMQ como parte de sus actividades participa en Ensayos que se realizan a nivel internacional, con el objetivo de demostrar sus capacidades de medición. En este contexto el CMQ esta participando en los siguientes Ensayos:

- 1) El primero organizado por el CCQM "Key Comparison and Pilot Study CCQM K49/P85, Essential and Toxic Element in Bovine Liver" que considera los siguientes analitos Fe, Zn, Cd, Pb y As. Las muestras han sido recibidas en el CMQ y los resultados deben ser enviados por el CMQ a fines de Diciembre
- 2) Ensayo CCQM que está siendo coordinado por el BAM (Centro Metrológico de Alemania) que corresponde a Cloranfenicol en leche

El CMQ participará en estos dos Ensayos utilizando los métodos validados en el Centro y que son los que han sido transferidos durante el desarrollo del Proyecto.

3.3 Adicionalmente, durante los días 4 y 5 de Diciembre el CMQ tendrá una Revisión de Pares (Peer Review), Una comisión compuesta de 7 expertos internacionales de los Centros y organismos Metrológicos más importantes del Mundo (CCQM, NIST-EEUU, LGC-Inglaterra, NRC-Canadá y PTB-Alemania) evaluarán las capacidades y competencias desarrolladas por nuestro Centro para el establecimiento de la trazabilidad en mediciones químicas y la diseminación de esta, en el área de alimentos y aguas y RILES de acuerdo a los requerimientos establecidos por las Guías 17025 y Guía ISO 34 (Requerimientos generales para Productores de Materiales de Referencia). Esta actividad es la antesala para obtener el reconocimiento nacional de Centro de Referencia en el área alimentos

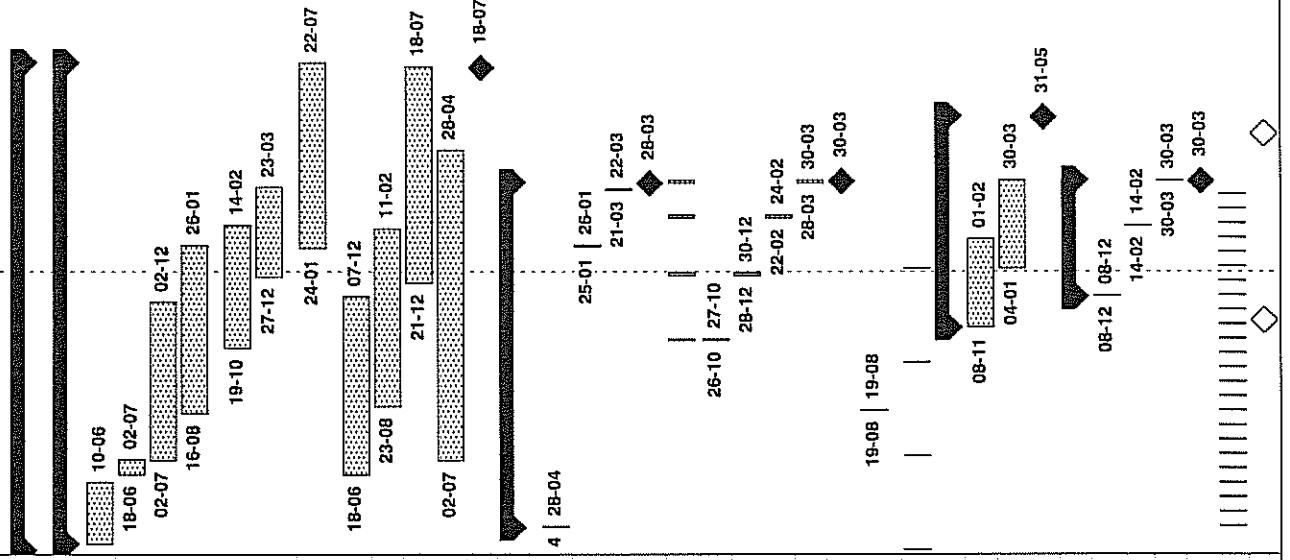
3.4 Finalmente, considerando por una parte el inicio desfasado de la parte técnica del proyecto y que las capacidades instrumentales del SAG están siendo implementadas, de definió en común acuerdo con la contraparte técnica del Proyecto, Sr. Pedro Enríquez, las actividades que se desarrollarán durante el periodo Diciembre de 2006 y Marzo de 2007, las que aparecen descritas en el acta de Reunión del 02 de Noviembre de 2006, adjunto en el Anexo 5

---

**ANEXO 1**

2004												2005												2006												
A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A

Id	Nombre de tarea
1	ETAPA 1:
2	ACTIVIDADES REALIZADAS POR CMQ
3	Actividad 1. Desarrollo y Validación de métodos
4	1.1) Recopilación de la Información
5	1.2) Evaluación y selección de los métodos a implementar
6	1.3) Desarrollo y validación de Clorfenicol en carne
7	1.4) Desarrollo y validación de Tetraciclina, Clortetraciclina y Oxitetraciclina en carnes
8	1.5) Desarrollo y validación de Clorfenicol en leche
9	1.6) Desarrollo y validación de Tetraciclina, Clortetraciclina y Oxitetraciclina en leche
10	1.7) Desarrollo y validación de Ampicilina, Benzilpenicilina, Ampicilina y Cloxacilina en carnes => A DESARROLLAR EN ETAPA 2
11	1.8) Desarrollo y validación de Cadmio en carnes
12	1.9) Desarrollo y validación de Plomo en carnes
13	1.10) Desarrollo y Validación de Arsénico en carnes
14	1.11) Desarrollo y Validación de los plomo y 8 Pesticidas Organoclorados en carnes
15	23 Métodos validados
16	Actividad N° 2. Transferencia al SAG a través de talleres teórico-prácticos
17	2.1) Taller teórico-práctico N°1
18	2.2) Taller teórico-práctico N°2
19	2.3) Taller teórico-práctico N°3
20	3 Talleres realizados
21	Actividad N°3. Presentes de los profesionales del SAG en CMQ
22	Actividad N°3. Pasantías del SAG en Intec 1
23	Actividad N°3. Pasantías del SAG en Intec 2
24	Actividad N°3. Pasantías del SAG en Intec 3
25	Actividad N°3. Pasantías del SAG en Intec 4
26	4 Pasantías realizadas
27	Actividad N°4. Definición en conjunto con el SAG, de los laboratorios participantes de la Red
28	Actividad N° 5. Reuniones de Coordinación de trabajo con el SAG
33	Actividad N°6. Organización de Ensayos de Intercomparación por CMQ
34	6.1) Ensayos de Intercomparación N°1
35	6.2) Ensayos de Intercomparación N°2
36	2 Ensayos de Intercomparación realizados
37	Actividad N°7. Capacitación a los Laboratorios de la Red
38	7.1) Seminario de capacitación N°1
39	7.2) Seminario de capacitación N°2
40	7.3) Seminario de capacitación N°3
41	3 Seminarios de capacitación realizados
42	Actividad N° 8. Reuniones internas de trabajo
67	Actividad N° 9. Informe de Avance Anual del Proyecto





2004												2005												2006												
A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A

id	Nombre de tarea	Actividades Realizadas
70		
71	ETAPA 2:	
72	ACTIVIDADES REALIZADAS POR INTEC	
73	Actividad 1. Desarrollo y validación de métodos	
74	1.1) Desarrollo y validación de Plano en leche	09-03   31-05
75	1.2) Desarrollo y validación de Cadmio en leche	07-03   31-05
76	1.3) Desarrollo y validación de Arsénico en leche	07-03   31-05
77	1.4) Desarrollo y validación de Mercurio en leche	11-04   01-07
78	1.5) Desarrollo y validación de Etilrombina y Tilosina en carne	15-09   16-12
79	1.6) Desarrollo y validación de Tetraciclina, Clotetraciclina y Oxitetraciclina en leche	15-08   12-01
80	1.7) Desarrollo y validación de Neomicina, Gentamicina, Estreptomicina y Lincomicina en carnes	15-11   24-03
81	1.8) Desarrollo y validación de Eritrolovacino y Cliprolovacino en carnes	18-04   19-08
82	1.9) Desarrollo y validación de Mercuro en carnes	15-04   26-08
83	1.10) Desarrollo y Validación de las siguientes 6 peselidas organoclorados en carnes	16-05   29-09
84	1.11) Desarrollo y Validación de 12 peselidas organoclorados en leche	
85	35 Métodos validados	
86	Actividad N° 2. Transferencia al SAG a través de talleres teórico-prácticos	
87	2.1) Taller teórico-práctico N°1	28-09   29-09
88	2.2) Taller teórico-práctico N°2	12-12   13-12
89	2.3) Taller teórico-práctico N°3	16-03   17-03
90	3 Talleres realizados	24-03
91	Actividad N°3. Presentación de los profesionales del SAG en Intec	
92	Actividad N°3. Presentación del SAG en Intec 1	27-07   29-07
93	Actividad N°3. Presentación del SAG en Intec 2	10-10   12-10
94	Actividad N°3. Presentación del SAG en Intec 3	21-11   23-11
95	Actividad N°3. Presentación del SAG en Intec 4	27-03   29-03
96	4 Presentación realizadas	30-03
97	Actividad N° 4. Reuniones de Coordinación de trabajo con el SAG	
102	Actividad N°5. Organización de Ensayos de Intercomparación	
103	5.1) Ensayo de Intercomparación N°1	18-07   17-10
104	5.2) Ensayo de Intercomparación N°2	24-10   27-01
105	5.3) Ensayo de Intercomparación N°3	09-01   24-03
106	3 Ensayos de Intercomparación realizados	31-03
107	Actividad N°6. Capacitación a los Laboratorios de la Red	
108	6.1) Seminario de capacitación N°1	30-09   30-09
109	6.2) Seminario de capacitación N°2	30-11   30-11
110	6.3) Seminario de capacitación N°3	22-03   22-03
111	3 Seminarios realizados	24-03
112	Actividad N° 7. Inicio Manual de Métodos Analíticos para análisis de residuos	24-10   31-03





---

**ANEXO 2**



## INFORME REUNIÓN DE COORDINACION

Proyecto fondo SAG "Desarrollo, validación y transferencia de métodos analíticos para la determinación de residuos químicos en carnes y leches" SAG C3-66-14-64.

Fecha Reunión: 16 de Mayo de 2006

Participantes: Pedro Enríquez, Cecilia Silva y Gabriela Massiff

En función de las actividades y requerimientos establecidos en el Programa de Residuos del año 2006 se establecieron las actividades a desarrollar en el periodo Mayo-y término del proyecto. La fecha de término de proyecto en su parte técnica tiene un desfase con la fecha de término establecida en el contrato debido al atraso del SAG en entregar los fondos después de firmado el Contrato en Noviembre del 2003, lo que generó un atraso a su vez en el inicio de las actividades experimentales por parte del CMQ por no contar con los recursos. Por lo tanto, serán desarrolladas las actividades del proyecto según prioridades definidas por la contraparte técnica del SAG, considerando que el plazo para el término de la parte técnica del Proyecto es Marzo del 2007. Las actividades que se consideran en la última fase del proyecto son:

### VALIDACIÓN DE METODOS

El CMQ validará en sus laboratorios los siguientes método de análisis:

- Determinación de Quinolonas en carnes
- Determinación de Mercurio en carne
- Determinación de Sulfas en carnes y leches
- Determinación de Amoxicilina, Bencilpenicilina, Ampicilina y Cloxacilina en carnes
- Determinación de Quinolonas en leche
- Determinación de Eritromicina y Tilosina en carnes
- Determinación de Neomicina, Gentamicina, Estreptomicina en carnes y leche
  
- Actualmente se está trabajando en la optimización del método de Determinación de Tetraciclinas en carnes, que fue previamente desarrollado, pero que de acuerdo al estado del arte de esta medición, se han encontrado antecedentes nuevo que permitirán mejorar este proceso.

### TRANSFERENCIAS DE MÉTODO ANALÍTICOS

Se realizarán, en la medida que se validen los método en el CMQ, las siguientes transferencias de los método a los profesionales del SAG:

- Método para la determinación de Pb en leche por ETAAS
- Método para la determinación de Cd en leche por ETAAS
- Método para la determinación de Hg en leche por AAS y vapor frío
- Método para la determinación de Quinolonas en carnes



- Método para la determinación de POC en carnes y leches
- Método para la determinación de Sulfas en carnes y leches
- Método para la determinación de Amoxicilina, Bencilpenicilina, Ampicilina y Cloxacilina en carnes
- Método para la determinación de Quinolonas en leche
- Método para la determinación de Eritromicina y Tilosina en carnes
- Método para la determinación de Neomicina, Gentamicina, Estreptomina en carnes y leches

### **SEMINARIOS-TALLER**

Está pendiente la realización de dos seminarios-taller para los profesionales del SAG, que serán entregados por los profesionales del CMQ. Los talleres que se proponen realizar son los siguientes

- Taller 1: Taller de discusión de resultados de los Ensayos de Intercomparación realizados, con la participación de los laboratorios involucrados,
- Cálculo de U aplicado a métodos y resultados obtenidos por el SAG en sus laboratorios

### **3. ENSAYOS DE INTERCOMPARACION**

Se debe desarrollar en este periodo un Ensayo de Intercomparación. En esta actividad participan tanto laboratorios del SAG como laboratorios que participan del Programa de Residuos. El CMQ propone, en función de la disponibilidad de Materiales de Referencia para la ejecución de esta actividad, tres posibilidades entre las cuales la contraparte técnica del SAG debe decidir por una.

- a) Pesticidas Organoclorados en Matriz Orgánica (hexano)
- b) Pb, Cd, Hg en leche
- c) Clortetraciclina en tejido de cerdo y Clortetraciclina en solución orgánica

**NOTA:** El SAG debe definir los participantes de este Ensayo. 5 laboratorios como máximo

Las fechas de todas las actividades se definirán entre las contrapartes a medida que las actividades se vayan a desarrollar

---

**ANEXO 3**

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE QUINOLONAS EN CARNE DE CERDO POR HPLC CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS.**



# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## INDICE

1.	Objetivos .....	3
2.	Alcance .....	3
3.	Referencias .....	3
4.	Descripción del Método Estudiado.....	4
4.1	Antecedentes .....	4
4.2	Principio.....	6
5.	Equipamiento .....	6
6.	Reactivos.....	7
7.	Procedimiento .....	7
7.1	Buffer fosfato 0,05M pH 7,4 .....	7
7.2	Buffer fosfato 0,05M pH 3,0 .....	7
7.3	Solución de Metanol-hidróxido de sodio .....	7
7.4	Preparación de soluciones stock .....	7
7.5	Preparación de Solución Multiestándar intermedia.....	8
7.6	Preparación de la Solución Intermedia del Estándar Interno.....	9
7.7	Preparación Estándares para la curva de Calibración en Matriz .....	9
7.8	Preparación de Estándares y Muestras Control para la Cuantificación Mediante Bracketing en Matriz.....	9
7.9	Procedimiento de Extracción.....	10
8.	Optimización de las Condiciones Cromatográficas.....	12
9.	Resultados .....	16
9.1	Curva de Calibración. Rango Lineal.....	16
9.2	Cuantificación de las Quinolonas en Muestras Control mediante Bracketing.....	19
9.2.1	Recuperación .....	19
9.2.2	Precisión Bajo Condiciones de Repetibilidad .....	20
9.2.3	Incertidumbre .....	21
9.2.4	Sesgo .....	22
10	Conclusiones.....	23

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 1. OBJETIVO

Validar un método analítico para la determinación de Quinolonas en carne de cerdo a través de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con Detector con Arreglo de Diodos.

### 2. ALCANCE

Este trabajo permitirá establecer las condiciones experimentales óptimas y la validación de los resultados obtenidos en la determinación de Ciprofloxacina, Enrofloxacin y Ácido oxolínico en carne de cerdo en un rango de concentración de hasta 200ng/g utilizando HPLC con detector de arreglo de diodos.

### 3. REFERENCIAS

- 3.1 Council Regulation n° 2377/90. Updated up to 12.10.2005.
- 3.2 Commission Decision del 14 de Agosto del 2002. (2002/657/EC)
- 3.3 Verdon E., Couedor P., Roudaut B., Sanders P., (2005) "Multiresidue Method for Simultaneous Determination of 10 Quinolone Antibacterial Residues in Multimatrix/Multispecies Animal Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Single Laboratory Validation Study. *JAOAC Int.*, **88**, 1179-1192.
- 3.4 Yorke J., Froc P., (2000) "Quantitation of Nine Quinolones in Chicken Tissue by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence detection" *J. of Chromatography A*, **882**, 63-77.
- 3.5 Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H., (2003) "Simple and Sensitive Determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection". *J. of Chromatography B*, **789**, 373-381.
- 3.6 Gigosos P., Revesado P., Cadahía O., Fente O., Vazquez B., Franco A., Cepeda A., (2000) "Determination of Quinolones in Animal Tissues and Eggs by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode-Array Detection". *J. of Chromatography A*, **871**, 31-36.
- 3.7 Drakopoulos A., Ioannou P., (1997) "Spectrofluorimetric Study of the Acid-Base Equilibria and Complexation Behavior of the Fluoroquinolone Antibiotics Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacina and Pefloxacin in Aqueous Solution" *Analytica Chimica Acta*, **354**, 197-204.

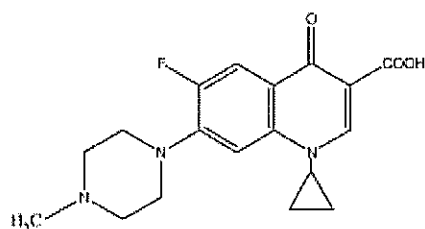
# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## 4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ESTUDIADO

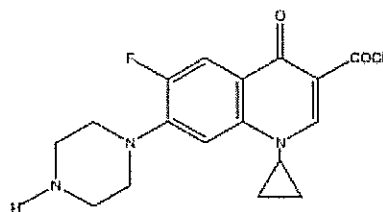
### 4.1 Antecedentes

Las quinolonas son agentes quimioterapéuticos altamente activos contra un amplio rango de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, incluyendo aquellas resistentes a los antibióticos pertenecientes al grupo de las beta-lactamas y sulfonamidas. Además, las quinolonas han mostrado buena absorción oral y penetración en tejidos con una farmacocinética favorable en humanos. Estas características han hecho de estas drogas adecuadas para el tratamiento de un gran número de infecciones en animales. Entre las quinolonas más utilizadas podemos encontrar al ácido oxolínico, enrofloxacin, ciprofloxacina y flumequina (Fig. 1).

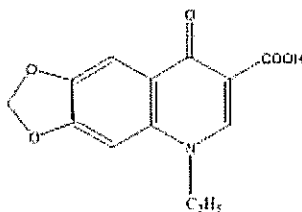
**Figura 1.** Estructuras del Ácido Oxolínico, Enrofloxacin, Ciprofloxacina y Flumequina.



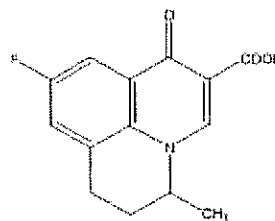
**Enrofloxacin**



**Ciprofloxacin**



**Ácido Oxolínico**



**Flumequina**

Los residuos de quinolonas en animales son un tema de preocupación debido a que se ha observado el desarrollo de resistencia antibacteriana a estas drogas en humanos. Por ejemplo, existen reportes que muestran una fuerte relación entre el uso de quinolonas en pollo y un incremento en la resistencia a la infección producida por *Campylobacter* en humanos. Debido a esto, es que organismos como el FDA y la Unión Europea, a través de la Normativa Europea 2377/90 han establecidos límites máximos permitidos para estas sustancias presentes en alimentos de origen animal. (Tabla 1)

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

**Tabla 1.** Niveles de residuos máximos permitidos (MRL) para Ácido Oxolínico, Enrofloxacina, Ciprofloxacina y Flumequina.

Residuo	Carne de cerdo Tejido	UE MRL ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b>Ácido Oxolínico</b>	Músculo	100
	Hígado	150
	Riñón	150
<b>Enrofloxacina</b> (suma de enrofloxacina y ciprofloxacina)	Músculo	100
	Hígado	200
	Riñón	300
<b>Flumequina</b>	Músculo	200
	Hígado	500
	Riñón	1000

Para la determinación de quinolonas han sido desarrollados diversos métodos basados en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) tanto con detección de fluorescencia como con detección UV. Diferentes condiciones cromatográficas son descritas en la literatura, especialmente en la composición de la fase móvil, variando tanto la fuerza iónica o acidez, como la presencia de modificadores como ácido cítrico, ácido perclórico o sales de aminas terciarias.

Para la extracción de estos analitos desde la matriz se han reportado diferentes procedimientos dependiendo de la clase de quinolona y del tipo de matriz. El tratamiento de la muestra incluye generalmente pasos de extracción con solventes orgánicos de polaridad alta a mediana, ó mezclas orgánicas-acuosas ácidas o básicas seguidas por varias extracciones líquido-líquido o líquido-sólido.

En este informe se presenta la puesta a punto de un adecuado método cromatográfico de cuantificación de quinolonas en matriz músculo de cerdo, optimizando tanto las condiciones cromatográficas como la extracción de la matriz para su detección dentro de los rangos de concentraciones máximas permitidas, utilizando como estándar interno flumequina. Este método fue validado basándose en los requerimientos de la norma EC657 de la Unión Europea.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 4.2. Principio

El método de cuantificación para la determinación de enrofloxacin, ciprofloxacina y ácido oxolínico en músculo de cerdo presentado fue realizado utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplado a un detector de arreglo de diodos. Como toda técnica cromatográfica, la separación de los analitos se basa en el reparto de cada analito en la fase estacionaria (sólido químicamente activo) y la competencia por un mismo sitio con la fase móvil (solvente con gran afinidad a la fase estacionaria). La afinidad de cada analito con la fase estacionaria, dada por su constante de reparto, permite la separación de los componentes de una muestra los cuales son posteriormente detectados y cuantificados. La tecnología del detector de arreglo de diodos permite el monitoreo continuo del espectro de absorción del eluato proveniente de la columna. De esta manera se obtiene el espectro completo de la elución de un peak, lo que ayuda a la identificación y cuantificación de un determinado componente.

El procedimiento involucrado en la extracción de las quinolonas desde carne de cerdo utiliza una solución acuosa de ácido tricloroacético al 5% como extractante. La purificación es realizada mediante extracción líquido-sólido utilizando columnas de fase reversa (C-18) eluyendo a los analitos con mezcla metanol/amoniaco para posteriormente de una evaporación y dilución en buffer, realizando los análisis en cromatografía líquida con fase móvil en gradiente y registrando las señales entre los 200nm y 400nm.

La cuantificación se realizó mediante bracketing previo establecimiento del rango lineal.

### 5. EQUIPAMIENTO

- 5.1 Equipo de HPLC compuesto por: Bomba cuaternaria Waters 6010 E, calefactor de columna, sistema de adquisición de datos "Empower software" y un detector de arreglo de diodos. El estudio se realizó con una columna Waters X-Terra RP-18 de tamaño de partículas de 3,5µm y dimensiones 250 x 4,6 mm y una precolumna de la misma marca. Se inyectaron las muestras manualmente en un loop de 200 µL.
- 5.2 Viales ambar de 4 mL Restek con tapa rosca de ptf/silicona, marca Restek.
- 5.3 Vortex
- 5.4 Turbovap
- 5.5 Balanza Sartorius MC 210P.
- 5.6 Sistema de vacío multicolumna "Manifold".
- 5.7 Columnas SPE C-18 Waters Oasis HLB 6cc (0,2g) Extraction Cartridges.
- 5.8 Jeringa Hamilton de 500 µL.
- 5.9 Gas Helio.
- 5.10 Material de vidrio clase A
- 5.11 Micropipetas electrónica de 50-1000
- 5.12 Micropipeta electrónica de 20-300 µL.
- 5.13 Centrifuga HERMLE Z300K.
- 5.14 Filtros Millipore 13 mm de diámetro, desechables.
- 5.15 Procesador de alimentos Braun Multiquick.
- 5.16 Baño Termorregulado con agitación GFL1092.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 6. REACTIVOS

- 6.1 Acetonitrilo, Lichrosolv, uso HPLC, Merck.
- 6.2 Metanol, Lichrosolv, uso HPLC, Merck
- 6.3 Fosfato de sodio dibásico, p.a Merck.
- 6.4 Fosfato de sodio monobásico, p.a, Merck.
- 6.5 Hidróxido de sodio, p.a., Merck.
- 6.6 Amoníaco al 25%, Merck
- 6.7 Acido Clorhídrico p.a Merck
- 6.8 Acido Fosfórico, Merck.
- 6.9 Hidróxido de sodio, p.a, Merck
- 6.10 Acido Tricloroacético, p.a, Merck
- 6.11 Enrofloxacina, Fluka, Pureza 99.4%.
- 6.12 Ciprofloxacina Fluka, Pureza 98%
- 6.13 Acido oxolínico VetranaI Riedel de Haën
- 6.14 Flumequina Sigma, Pureza 98%
- 6.15 Ácido Oxolínico Fluka, Pureza 97%
- 6.16 Ciprofloxacina Applichem, Pureza 98%.

### 7. PROCEDIMIENTO

#### 7.1 Buffer Fosfato 0,05M pH 7,4

Disolver en agua 2,77 g de fosfato de sodio dibásico y 2,08g de fosfato de sodio monobásico. Diluir hasta 1000 mL.

#### 7.2 Buffer Fosfato 0,05M pH 3,0

Disolver en agua 2,77 g de fosfato de sodio dibásico y 2,08g de fosfato de sodio monobásico. Ajustar a pH 3,0 con ácido fosfórico. Diluir hasta 1000 mL.

#### 7.3 Solución de Soluciones Metanol-Hidróxido de sodio.

Agregar a 100 mL de metanol, 100 $\mu$ L de una solución acuosa de hidróxido de sodio 1N.

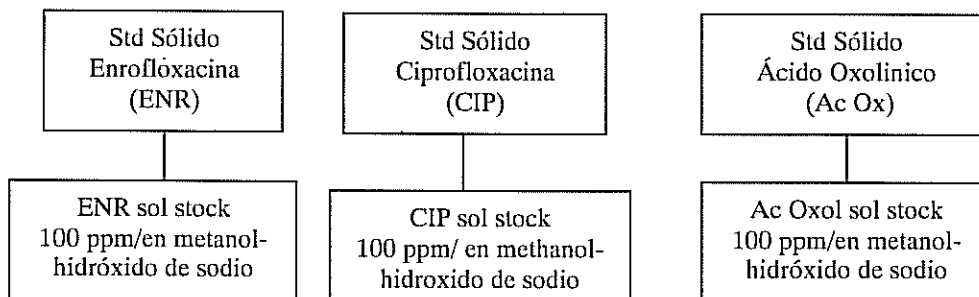
#### 7.4 Preparación de Soluciones de Stock de Calibración y Control

La preparación de estándares de calibración, estándar interno, controles se llevó a cabo mediante técnica gravimétrica. Todas las soluciones preparadas fueron mantenidas en viales ámbar a temperaturas de aproximadamente 4 °C.

Todos los reactivos de calibración fueron preparados a partir de la sal de alta pureza correspondiente (Fluka). Los controles fueron preparados a partir de los compuestos sólidos de menor pureza (AppliChem y Sigma). Se pesó 10 mg de la quinolona correspondiente y se disolvió en 100 mL de la solución de disolución (7.3). En el esquema 7.4.1 se muestra el diagrama de preparación de las soluciones concentradas.

# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

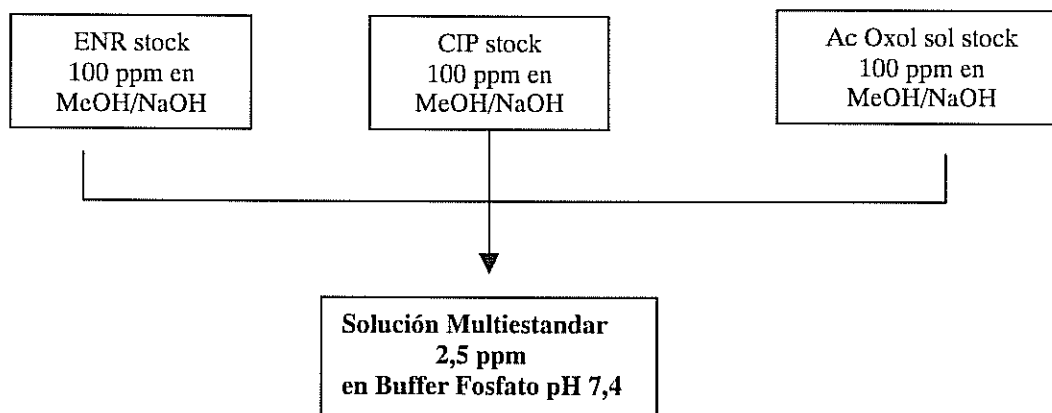
## 7.4.1 Esquema de Preparación Soluciones Stock de Calibración y de Control.



## 7.5 Preparación de Soluciones Intermedias Multiestándar

Se peso una alícuota de 2,5mL de cada una de las quinolonas stock en un matraz de 100mL. Luego se aforó la solución con buffer fosfato pH 7,4 ( 7.1), para obtener una solución multiestándar de 2,5ppm. Tanto para la solución multicomponente de calibración como control, el procedimiento seguido es el que se muestra en el esquema 7.5.1.

### 7.5.1 Esquema de preparación de una solución multiestándar de quinolonas a 2,5 ppm.



## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 7.6 Preparación de Solución Intermedia de Estándar Interno.

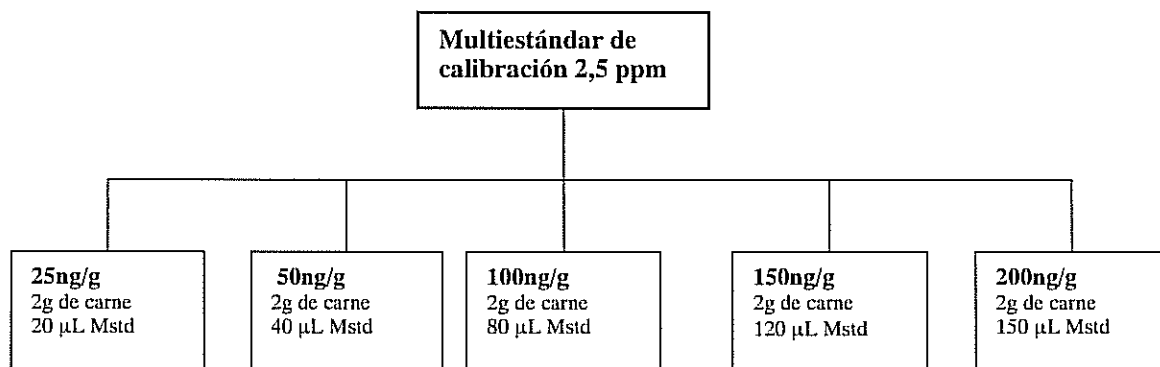
La preparación de la solución intermedia del estándar interno Flumequina se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en el punto anterior.

En un matraz aforado de masa conocida se adiciona una alícuota de la solución stock. Se registra su masa y luego se afora con la solución buffer fosfato pH 7,4 (7.1) registrándose la masa final. La concentración de esta solución es de aproximadamente 1ppm.

### 7.7 Preparación de Estándares para la Curva de Calibración en Matriz.

A la carne adquirida comercialmente se le quito la grasa y el tejido conectivo para ser luego picada en cubos y molida utilizando un procesador de alimentos hasta obtener una pasta homogénea. Se pesaron  $2 \pm 0,01g$  y se fortificó el homogenizado de carne en 5 niveles de concentración, 25ng/g, 50ng/g, 100ng/g, 150ng/g y 200 ng/g adicionando distintas alícuotas de la solución multiestandar de calibración. El procedimiento seguido fue registrar el peso de una cantidad aproximada de 2g de carne homogenizada, en un tubo de masa conocida. Luego se agregó una alícuota de la solución multiestandar de calibración de concentración 2,5ppm (7.2), obteniéndose un nuevo valor para el peso total de ambos. De ésta forma, se prepararon muestras fortificadas en los 5 niveles de concentración. (Esquema 7.7.1).

#### 7.7.1 Esquema de preparación de los estándares de calibración en carne de cerdo.



### 7.8 Preparación de los Estándares y Muestras Control para la Cuantificación Mediante Bracketing en Matriz

Se prepararon 6 muestras control fortificando el homogenizado de carne con la solución multiestándar control (7.2) a un nivel de concentración cercano al límite máximo permitido para cada quinolona (100 ng/g). Se utilizaron soluciones de calibración para fortificar el homogenizado de carne en 2 niveles, a un nivel cercano a 50 ng/g el cual se utilizó como estándar bajo y a 150ng/g como estándar alto.

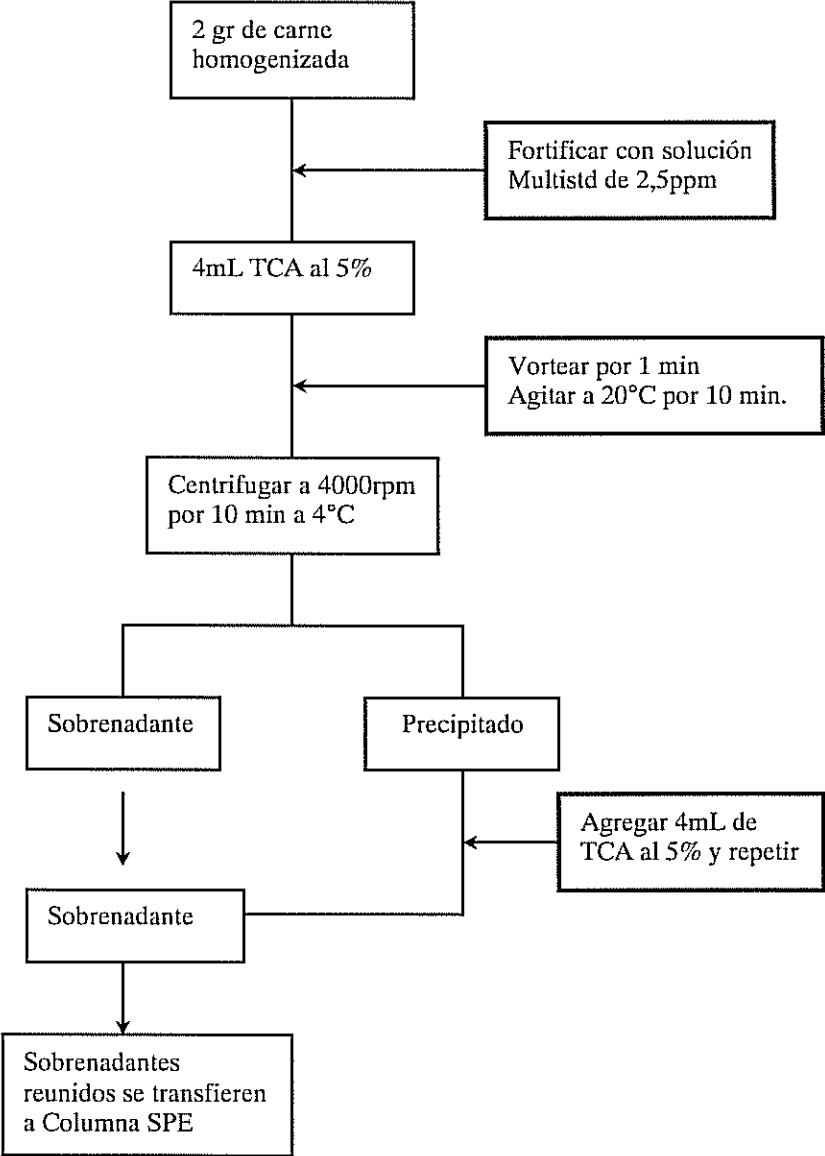


# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## 7.9 Procedimiento de Extracción

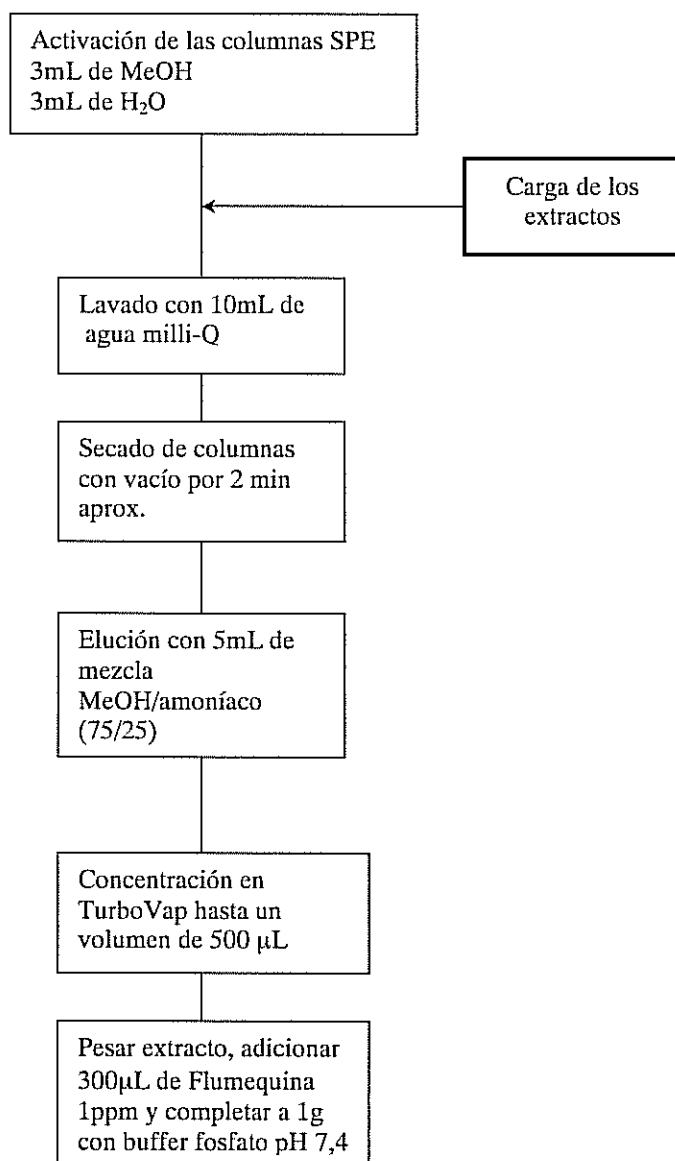
A los 2 grs de carne previamente fortificados, se le agregaron 4 mL de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5% homogenizando la mezcla en el vortex por 1 minuto. Luego, el homogenizado se colocó en un agitador orbital por 10 minutos a 20°C y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante y se repitió la extracción con la pella agregando nuevamente 4 mL de TCA al 5% (Esquema 7.9.1). Los sobrenadantes se cargaron en columnas Oasis C-18 de 200mg y capacidad de 6 cc previamente acondicionados con 3mL de metanol y 3mL de agua, lavando posteriormente con 10 mL de agua. Los analitos fueron eluidos con 5mL de una mezcla de metanol-amoniaco (25%) en una relación de 75:25. Las muestras fueron concentradas a 35°C hasta 0,5 mL, para luego adicionar el estándar interno y llevar a 1 gr con buffer fosfato pH 7,4. Las muestras fueron filtradas e inyectadas al HPLC. (Esquema 7.9.2)

### 7.9.1 Esquema del procedimiento de extracción de las quinolonas desde la matriz carne de cerdo.



## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 7.9.2 Esquema del procedimiento de purificación de las quinolonas en columnas de extracción en fase sólida.



## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 8 Optimización de las Condiciones Cromatográficas.

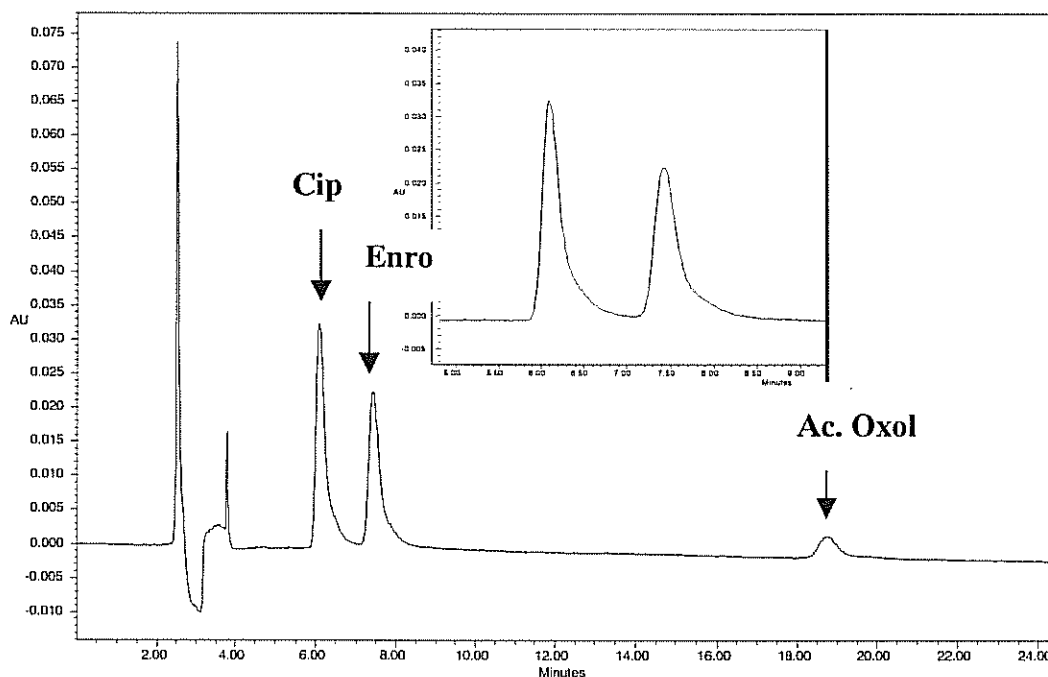
En literatura existen varios métodos para la determinación de quinolonas, destacándose los que utilizan detección por fluorescencia y detección UV por arreglo de diodos. A pesar de que la fluorescencia es más sensible, se decidió comenzar la optimización de las condiciones cromatográficas utilizando el detector de arreglo de diodos debido principalmente a la posibilidades de obtener los espectros completos de cada una de las quinolonas lo que ayuda tanto a la identificación de los peak cromatográficos, como a la detección de posibles coeluciones con interferentes.

Se probaron las siguientes condiciones cromatográficas para la determinación de ciprofloxacina, enrofloxacin, ácido oxolínico y flumequina:

- 1.- Columna: C18 tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , dimensiones 250 x 4,6mm  
Fase Movil: Acetonitrilo-buffer fosfato 0,02M pH 3,0 (7.2) (85:15)  
Flujo: 1mL/min  
Temperatura: 25 °C  
Detección: DAD.

Se observó que las señales de ciprofloxacina y enrofloxacin aparecían no-simétricas presentando colas en los peak. Se cambia la columna por una de menor tamaño de partículas. Además las señales de ciprofloxacina y enrofloxacin aparecen muy juntas por lo que se decide utilizar gradiente en la fase móvil.

**Figura 2.** Cromatograma de solución acuosa de quinolonas utilizando una columna C18 de tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .



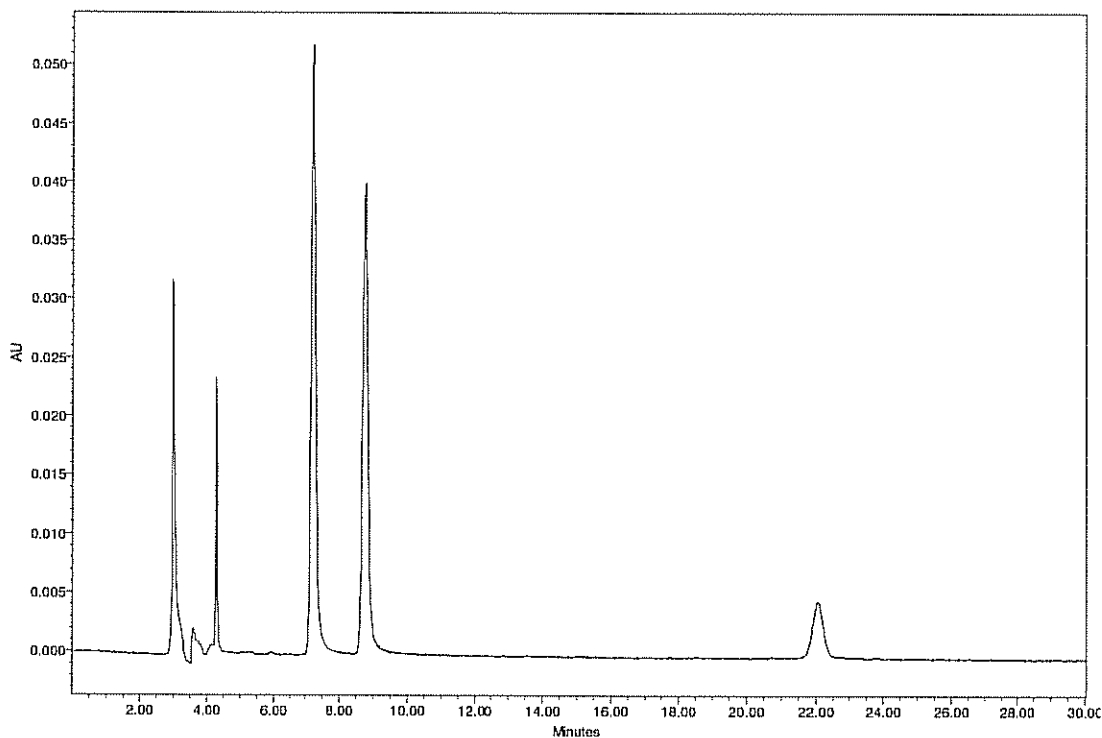
## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

2.- Columna: C18 tamaño de partícula de 3,5  $\mu\text{m}$ , dimensiones 250 x 4,6mm.  
Flujo: 1mL/min  
Temperatura: 25 °C  
Detección: DAD  
Fase Móvil: Gradiente

Tiempo	Acetonitrilo	Buffer Fosfato pH 3,0
0	18	82
10	18	82
11	33	67
25	33	67
26	18	82

Los cambios efectuados mejoraron bastante la forma y resolución de los peak como se observa en el siguiente cromatograma (Figura 3)

**Figura 3.** Cromatograma de solución acuosa de quinolonas utilizando una columna C18 e tamaño de partícula de 3,5  $\mu\text{m}$ .



## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

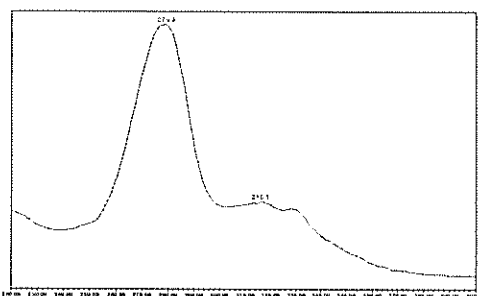
Utilizando estas condiciones de análisis, se inyectaron los estándares puros de ciprofloxacina, enrofloxacin, ácido oxolínico y flumequina para contruir la librería de compuestos. Los tiempos de retención y los espectros para cada una de las quinolonas se muestran a continuación:

**Figura 4.** Espectros de Ciprofloxacina, Enrofloxacin, Acido oxolinico y Flumequina.

### Ciprofloxacina

Tr: 7,2 min

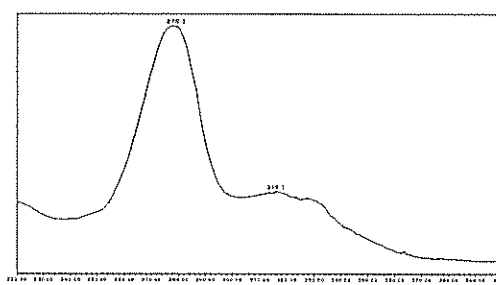
$\lambda_{max}$ : 279 nm, 316nm



### Enrofloxacin

Tr: 8,8min

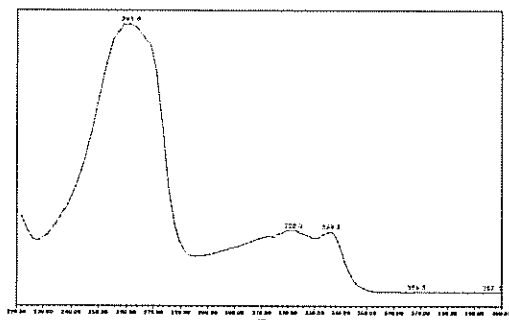
$\lambda_{max}$ : 279 nm, 316nm



### Acido Oxolínico

Tr: 22,1 min

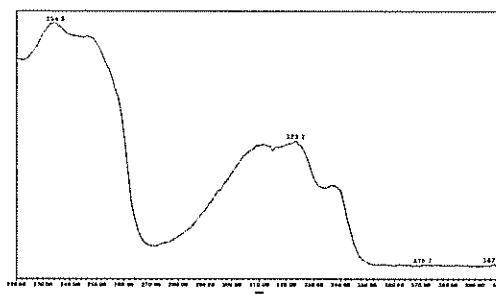
$\lambda_{max}$ : 261 nm, 322nm



### Flumequina

Tr: 22,1 min

$\lambda_{max}$ : 234 nm, 323nm



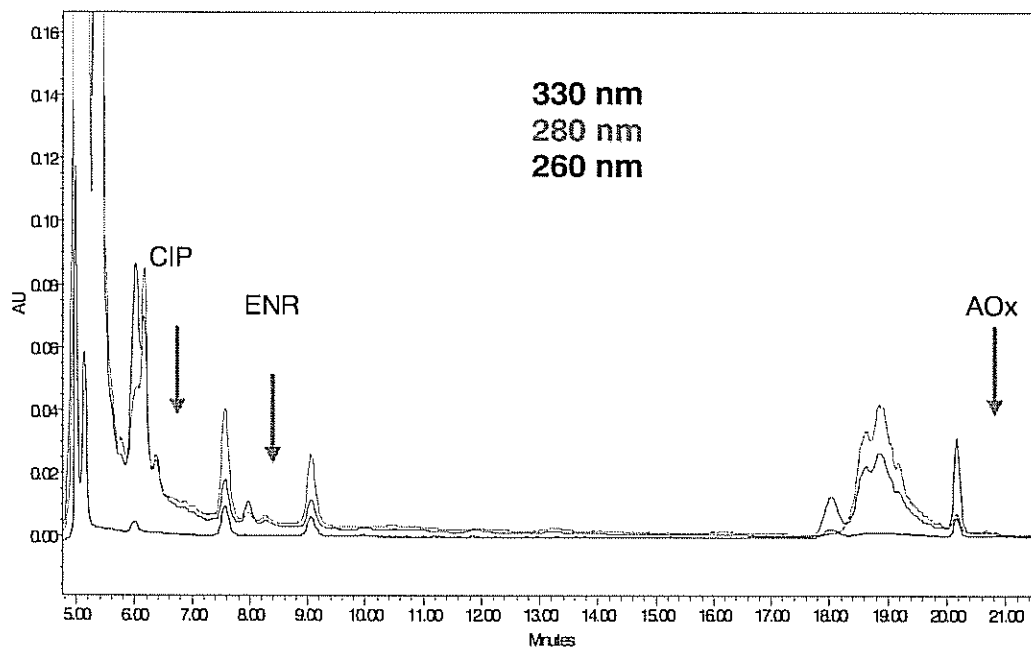
## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

Como se puede observar en el Cromatograma de la Figura 5, se logró extraer desde la matriz las 3 quinolonas utilizadas en la fortificación de la carne. Se observan señales de impurezas las cuales pueden ser casi eliminadas del cromatograma al ir variando la longitud de onda de integración.

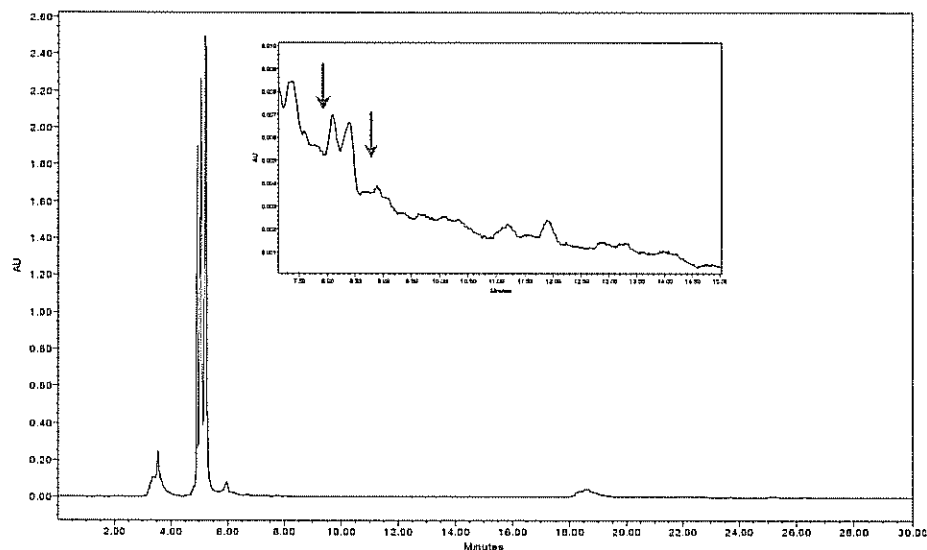
A 330 nm desaparecen casi completamente las señales interferentes, especialmente las que están cerca de la señal del ácido oxolinico, esto ayuda bastante en la integración de los peaks aunque conlleva una disminución en la sensibilidad del análisis.

Al observar un cromatograma de un blanco de extracción (Figura 6) podemos comprobar la ausencia de señales en las zonas donde aparecen las quinolonas de interés.

**Figura 5.** Cromatograma de la extracción de la matriz fortificado con Ciprofloxacina, Enrofloxacin y Acido oxolinico a 100ng/g.



**Figura 6.** Cromatograma de un extracción del blanco de matriz.



# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Curva de Calibración. Rango Lineal.

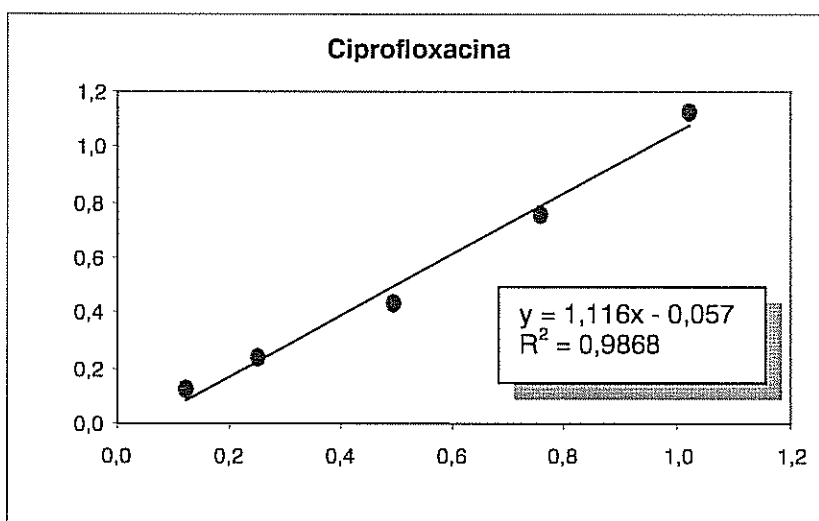
Para verificar la linealidad en el rango de trabajos se fortificó el homogenizado de carne en 5 niveles de concentración , 25ng/g, 50ng/g, 100ng/g, 150ng/g y 200 ng/g adicionando distintas alícuotas de la solución multiestandar de calibración.

Se extrajeron las muestras tal como se mostró en el esquema 4 y se adicionó antes de la inyección a cada uno de los extractos una alícuota del estándar interno Flumequina de 1ppm.

La preparación del blanco consistió en una muestra de 2g de carne homogenizada no fortificada a la cual sólo se le adicionó una alícuota del estándar interno Flumequina de 1ppm luego de pasar por el proceso de extracción .

Al graficar la razón entre las áreas de las quinolonas/área del estándar interno versus la razón entre la concentración de las quinolonas/concentración del estándar interno obtenemos las curvas de calibración mostradas en las Figuras 7, 8 y 9. Como se puede observar entre los rangos de concentración de aproximadamente 25ng/g y 200 ng/g existe un comportamiento lineal el cual se ve reflejado tanto al observar las curvas como al verificar los  $R^2$  obtenidos para cada una de ellas los cuales son muy cercanos a 1.

**Figura 7.** Curva de Calibración para Ciprofloxacina

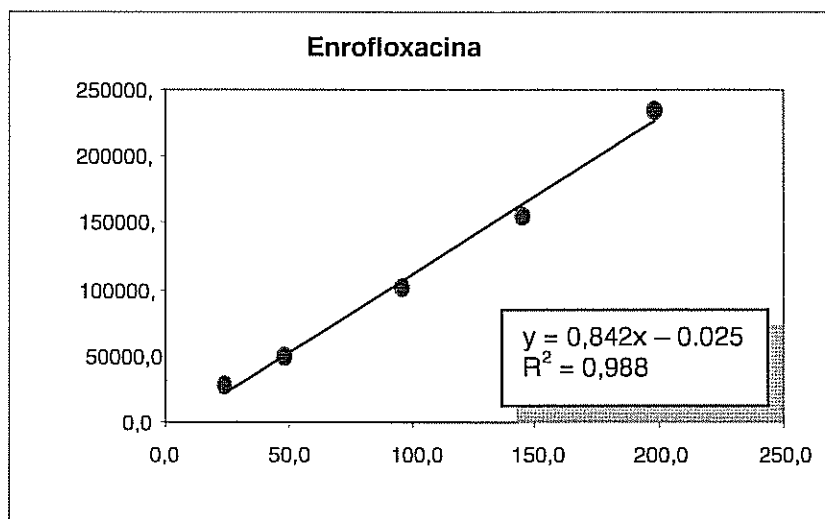


**Rango de trabajo: 23,39ng/g - 193,83 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Ciprofloxacina ng/g	Flumequina ng/g	Ciprofloxacina $\mu V \cdot \text{seg}$	Flumequina $\mu V \cdot \text{seg}$		
23,391	189,283	31915,0	267280,0	0,124	0,119
47,580	188,946	60205,0	257516,0	0,252	0,234
93,887	189,226	111575,0	258882,0	0,496	0,431
142,273	188,064	205582,0	271176,0	0,757	0,758
193,834	190,127	295284,0	261948,0	1,019	1,127

# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

**Figura 8.** Curva de Calibración para Enrofloxacin



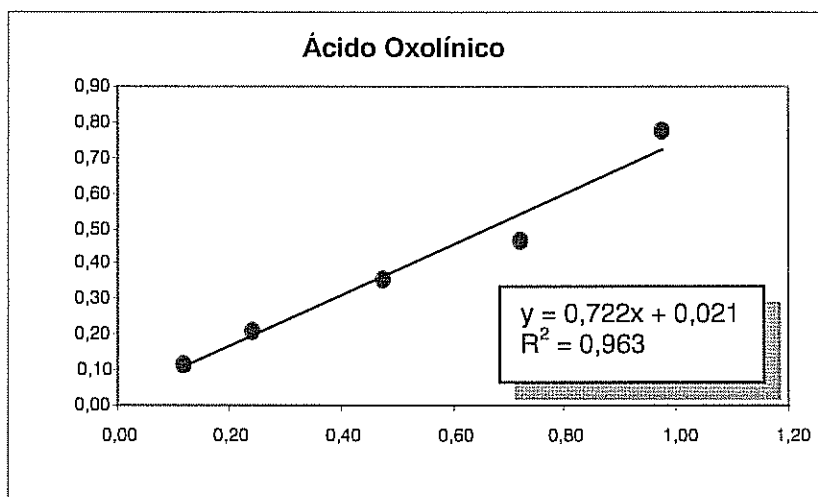
**Rango de trabajo: 23,90ng/g - 198,10 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Enrofloxacin ng/g	Flumequina ng/g	Enrofloxacin uV*seg	Flumequina uV*seg		
23,907	189,283	27247,0	267280,0	0,126	0,102
48,629	188,946	49581,0	257516,0	0,257	0,193
95,955	189,226	100934,0	258882,0	0,507	0,390
145,407	188,064	155909,0	271176,0	0,773	0,575
198,104	190,127	233900,0	261948,0	1,042	0,893



## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

**Figura 9.** Curva de Calibración para Ácido Oxolínico.



**Rango de trabajo: 22,32ng/g - 184,99 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Ácido Oxolínico ng/g	Flumequina ng/g	Ácido Oxolínico uV*seg	Flumequina uV*seg		
22,325	189,283	32017,0	267280,0	0,118	0,120
45,411	188,946	53788,0	257516,0	0,240	0,209
89,607	189,226	92277,0	258882,0	0,474	0,356
135,787	188,064	125616,0	271176,0	0,722	0,463
184,998	190,127	204212,0	261948,0	0,973	0,780

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 9.2 Cuantificación de las Quinolonas en Muestras Control mediante Bracketing

Para cuantificar cada una de las quinolonas en las muestras fortificadas, se utilizó el método de bracketing, en donde se midieron dos de los seis controles preparados independientemente entre medio de la medición de un estándar bajo y uno alto, hasta completar las seis muestras control. Luego se procedió a la cuantificación de estos controles y a la determinación de los siguientes parámetros:

#### 9.2.1 Recuperación.

La Recuperación se calculó según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{Concentración Observada}}{\text{Concentración Preparación}} \times 100$$

Los resultados se pueden observar a continuación.

**Tabla 2.** Resultados Obtenidos del promedio de 6 replicados independientes para la Recuperación de las quinolonas desde la matriz carne de cerdo.

	Conc de preparación (ng/g)	Conc Observada (ng/g)	% Recuperación
Ciprofloxacina	93.5	88,0	94,1
Enrofloxacin	106.5	109.9	103.3
Ácido Oxolínico	95.6	98.5	103.1

En los tres casos se obtuvieron muy buenas recuperaciones con valores cercanos al 100%, a los cuales se les aplicó una prueba t demostrándose que las recuperaciones para ciprofloxacina, enrofloxacin y ácido oxolínico estadísticamente no son significativamente distintas del 100%. Por lo tanto no se debe aplicar corrección en estos casos.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 9.2.2 Precisión bajo condiciones de repetibilidad

La precisión de los resultados es una medida de cuan cercanos están los resultados unos de otros y se expresa mediante la desviación estándar, que es un estimador de la dispersión de los resultados. Para determinar si un método es suficientemente preciso se realiza una prueba estadística donde se compara el valor de  $\chi^2$  de tabla al 95 de confianza con el  $\chi^2$  calculado para el método. Si el  $\chi^2$  calculado es menor al  $\chi^2$  de tabla entonces el método pasa el test de precisión. La ecuación para el cálculo de precisión en condiciones de repetición es la siguiente:

$$\chi^2_{\text{calculado}} = \left( \frac{S_w}{S_{w0}} \right)^2$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = \frac{\chi^2_{(n-1); 0,95}}{n-1}$$

Donde

$S_w$ : desviación estándar ínter laboratorio en condiciones de repetibilidad.

$S_{w0}$ : desviación estándar ínter laboratorio requerida (10% obtenido de literatura).

$n-1$ : grados de libertad

Los resultados obtenidos para el cálculo de la precisión bajo condiciones de repetibilidad muestran que en los tres casos, tanto para ciprofloxacina, enrofloxacin y ácido oxolínico se pasa la prueba de precisión. Los valores se pueden observar a continuación:

**Tabla 3.** Prueba de Precisión bajo condiciones de repetibilidad

	Ciprofloxacina	Enrofloxacin	Ácido Oxolínico
$S_w$	7,135	7,5474	3,788
$S_{w0}$	9,000	9,000	9,000
(n-1) Grados de Libertad	5	5	5
$\chi^2_{(n-1); 0,95}$	11,07	11,07	11,07
$\chi^2_{\text{calc}}$	3,14	3,54	0,87
Decisión	<b>No Rechazo</b>	<b>No Rechazo</b>	<b>No rechazo</b>

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 9.2.3 Incertidumbre

La incertidumbre es un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos razonablemente a la medida.

El cálculo de la incertidumbre del proceso de cuantificación cuando se usan razones de áreas, se explica a continuación. RC corresponde a la razón de concentración entre el analito y el estándar interno y RA corresponde la razón de área de los peaks respectivos, por lo tanto, la incertidumbre asociada esta dada por la combinación de las incertidumbres de cada una de esas concentraciones, basándose en la ley de propagación de errores.

De esta manera, la incertidumbre de RC se calcula como:

$$u\left(\frac{C_{std.bajo}}{C_{SI}}\right) = \frac{C_{std.bajo}}{C_{SI}} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_{std.bajo}}}{C_{std.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C_{SI}}}{C_{SI}}\right)^2}$$

Por otro lado, para calcular las incertidumbres en los valores de RA, se calcula primero la razón área del antibiótico/ área de STD interno para cada lectura. Luego, las incertidumbres de las razones de áreas se calculan como la desviación estándar del promedio de las razones obtenidas en cada caso, dividido por la raíz de n, siendo n el número de lecturas respectivas.

De esta manera el cálculo de incertidumbre de la concentración de la muestra se calcula a partir de la ley de propagación de errores en donde se combina la incertidumbre estándar de la razón de concentración de la muestra con la razón del estándar interno con la incertidumbre estándar de la concentración del estándar interno.

Entonces, el cálculo final de la incertidumbre de la concentración de la muestra es:

$$u(C_{mta}) = \sqrt{\left(\frac{u_{RA-mta}}{RA_{mta}}\right)^2 + \left(\frac{u_{RA-s.bajo}}{RA_{s.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{RA-s.alto}}{RA_{s.alto}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-s.bajo}}{C_{s.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-s.alto}}{C_{s.alto}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI-s.bajo}}{C_{SI-s.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI-s.alto}}{C_{SI-s.alto}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI-mta}}{C_{SI-mta}}\right)^2}$$

Los valores de incertidumbre obtenidos durante el desarrollo de este método, utilizando la Planilla de Kragten, se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Valores de incertidumbre asociada a la determinación de quinolonas en matriz.

	<b>C<sub>obs</sub> (ng/g)</b>	<b>U (ng/g)</b>	<b>RU (%)</b>
Ciprofloxacina	87,38	11,8	13,6
Enrofloxacina	110,31	12,0	11,0
Ácido Oxolinico	98,01	10,8	10,9

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 9.2.4 Sesgo Instrumental

En este trabajo se estudió el sesgo instrumental mediante la cuantificación de 6 controles acuosos preparados independientemente, con igual concentración de las 3 quinolonas. Estos controles fueron cuantificados mediante bracketing utilizando estándares altos y bajos, acuosos. La prueba de sesgo compara el valor de  $\Delta_{\text{calculado}}$  con el de  $\Delta_{\text{crítico}}$ , los cuales vienen dados por la siguiente ecuación.

$$\Delta_{\text{calc}} = |C_{\text{obs}} - C_{\text{prep}}|$$

$$\Delta_{\text{crítico}} = t_{0,975} \times \left( \frac{s}{n^{1/2}} \right) + U$$

Donde

$C_{\text{obs}}$ : es el promedio de la concentración calculada por bracketing para los n controles.

$C_{\text{prep}}$ : es el promedio de la concentración calcula de preparación de los controles.

$t_{0,975}$ : es el valor de t de tabla para n-1 grados de libertad y un 97,5% de confianza.

$s$ : es la desviación estándar de los valores de concentración obtenida por bracketing.

$n$ : Número de replicados

$U$ : es la incertidumbre de la concentración de preparación.

El criterio de decisión para la aceptación de la hipótesis nula a un nivel de significación ( $\Delta$ ) dado, esta dado por;

$$\Delta_{\text{calc}} < \Delta_{\text{crítico}}$$

Entonces se acepta la hipótesis nula de "no sesgo".

Como se observa en la tabla 5 la prueba de sesgo instrumental es pasada para la cuantificación de los controles de las 3 quinolonas, mostrando que no se detecta un sesgo instrumental mayor al esperado.

**Tabla 5. Prueba de Sesgo instrumental.**

	$C_{\text{obs}}$ (ng/g)	s	$C_{\text{prep}}$ (ng/g)	U	$\Delta_{\text{calc}}$	$\Delta_{\text{crítico}}$	Resultado
Cipro	201,77	7,10	197,55	6,4	4,22	13,85	Acepto
Enro	219,21	7,07	213,63	3,1	5,57	10,51	Acepto
Ac Oxol	205,61	2,74	201,96	4,70	3,64	7,57	Acepto

## **INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

### **10 CONCLUSIONES**

- 10.1 En este trabajo se describe la validación de un método por HPLC con detector de arreglo de diodos para la detección y cuantificación simultánea de ciprofloxacina, enrofloxacin y ácido oxolínico en matriz carne de cerdo utilizando como estándar interno flumequina.
- 10.2 Las condiciones experimentales óptimas fueron establecidas luego de realizar varios cambios a los métodos reportados en la literatura, logrando optimizar tanto extracción de los analitos desde la matriz como las condiciones cromatográficas para su detección.
- 10.3 El método fue validado mediante la comprobación de la linealidad del rango de trabajo, un estudio de recuperación utilizando cuantificación por bracketing, y determinando parámetros como la precisión y el sesgo del método, obteniéndose en todos ellos resultados satisfactorios.

**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN CARNE DE CERDO POR EAA  
CON VAPOR FRÍO.**

## INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO

1.	Objetivo.....	3
2.	Alcance .....	3
3.	Referencias.....	3
4.	Antecedentes.....	4
5.	Descripción del método utilizado.....	4
	5.1 Pre-tratamiento.....	4
	5.2 Medición.....	5
6.	Reactivos .....	5
7.	Aparatos y materiales.....	5
8.	Procedimiento .....	6
8.1	Pruebas experimentales.....	6
8.1.1	Tamaño de muestra .....	6
8.1.2	Programa de calentamiento.....	7
8.1.3	Composición de ácidos utilizados en la digestión de muestras. Eliminación de Interferencias.....	7
8.2	Procedimiento desarrollado para realizar la digestión cerrada por vía húmeda , utilizando horno microondas. ....	7
8.2.1	En muestras de carne de cerdo.....	7
8.2.2	En muestras de MRC BCR 186 .....	8
8.2.3	En muestras blancos.....	8
8.3	Medición.....	8
8.3.1	Condiciones de medición .....	8
8.3.2	Establecimiento de los límites de detección y cuantificación .....	9
8.3.3	Establecimiento del intervalo de confianza y preparación de los estándares de calibración.....	9
8.3.4	Preparación de curva de calibración y método de cuantificación.....	9
8.4	Evaluación de la precisión de repetibilidad del método .....	10
8.5	Evaluación de sesgo.....	11
8.6	Estudios de Recuperación.....	11
8.6.1	Evaluación de la incertidumbre de recuperación .....	12
8.7	Determinación de la incertidumbre del método.....	12
9.	Resultados obtenidos en el desarrollo y validación del método para la determinación de mercurio en carne de cerdo por vía húmeda en sistema cerrado mediante horno microondas y cuantificación por EAA por vapor frío.....	13
10.	Conclusiones.....	19



## 1 Objetivo

El objetivo de este estudio es validar un método de pre-tratamiento y medición de mercurio en matriz carne de cerdo, utilizando como pre- tratamiento de la muestra, la digestión ácida en horno de microondas y la medición de Hg en las muestras tratadas, mediante la técnica de EAA por vapor frío.

## 2 Alcance

Este estudio permitirá establecer un método de pre-tratamiento y medición de mercurio en muestras de carne, permitiendo cuantificar concentraciones mayores a 0.02 ug/ g de carne.

## 3 Referencias

- 3.1 F. Garcia Sayago, Tesis Doctoral , Facultad de Medicina y Cirugía, Tarragona, España, 2000.
- 3.2 Informe Parte I. Validación del Método para la determinación de mercurio en carne de cerdo, V-CMQ-090, Centro de Metrología Química, Fundación Chile, mayo 2006.
- 3.3 Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Directiva 2001/22/CE de la comisión de 8 de Marzo de 2001.
- 3.4 Lead and Mercury in Breast Milk, Gundacker et al., 110 (5), 873-878, Pediatrics, 2002.
- 3.5 A. Taylor et al; Atomic Spectrometry Update. Clinical and a biological materials, foods and beverages, J. Anal. At. Spectrom, 16 (4), 421-446, 2001.
- 3.6 Garcia-Rico et al, Determination of Total Metals in cultivated oysters, Journal of AOAC International, Vol.84, No 6, 2001.
- 3.7 Allan Jeffrey and Glenn Barry, Some problems associated with the determination of mercury in plant material and biological tissue; Commun Soil. Sci. Plant Anal, 31 (11-14), 1929-1934, 2000.
- 3.8 John Entwisle, Determination of mercury in microwave digest of foodstuffs by ICP-MS, LGC, Teddington, 2003.
- 3.9 BCR Information the Certification of the Contents (Mass Fraction of Cd, Pb, As, Hg, Se, Cu, Zn, Fe and Mn) in Three lyophilized Animal, Tissue Reference Materials; Dictorate- General for Science, Research and Development Community Bureau of Reference, 1986..
- 3.10 Programa de Control de Residuos en Productos de Origen Pecuario de Exportación en el Marco del Sistema Nacional de Control de Residuos Conjunto Salud- Agricultura, Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, Chile, 2005.
- 3.11 Flow Injection Mercury/Hydride Analyses, Recommended Analytical Conditions and General Information, Perkin Elmer, 1987.
- 3.12 ISO 11095:1996 (E). Linear calibration using reference materials.
- 3.13 EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2th Ed., 2000.
- 3.14 T. W. Vetter, NIST: "Quantifying Measurement Uncertainty in Analytical Chemistry- A Simplified Practical Approach, *Measurement Science Conference*, November 2000..
- 3.15 NIST Special Publication 829, "Use of NIST Standard Reference Materials for Decisions on Performance of Analytical Chemical Methods and Laboratories", CAC Quality Assurance Task Group, January 1992.
- 3.16 M. S. Levenson et al, J. Res. Nat. I. Inst. Stand. Technol., 105, 571, 2000.

- 3.17 J. Kragten, "Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique", *Analyst*. 119 (10), pp 2161-2165, 1994.
- 3.18 Workshop on estimating uncertainties for chemical analysis, NIST, October 16-17, 2001.
- 3.19 Thompson M., Ellison S., Wood R., "Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis" (IUPAC Technical Report ), *Pure Appl. Chem.*, Vol 74, N°5, p 835-855, 2002.
- 3.20 Guía ISO 33, Use of certified reference materials, 2000.
- 3.21 Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Directiva 2001/22/CE de la comisión de 8 de Marzo de 2001.
- 3.22 United Nations Environment Programme Chemicals; Global Mercury; Assessment Appendix; November 2002
- 3.23 D. L Nunes, E. Pereira dos Santos y col., *Spectrochimica Acta Part B* 60; 731-736; 2005.
- 3.24 Bovine Liver, Applications Disk File Name; MARS 5; 1998.

#### 4 Antecedentes

El mercurio es un metal pesado, potencialmente tóxico con propiedades hematotóxicas, neurotóxicas y nefrotóxicas, aún a muy bajas concentraciones. Este puede ser introducido al ambiente, a partir de fuentes naturales como consecuencia de su gasificación en depósitos minerales, de las emisiones de fuentes geotérmicas, de su volatilización en el suelo, de las actividades volcánicas, de sismos, de la foto-reducción de mercurio divalente en el agua, y de la transformación biológica de mercurio inorgánico en orgánico. Por otra parte, el mercurio puede introducirse también, por fuentes relacionadas con la industria y la energía, por ejemplo, el carbón que puede contener cantidades traza de mercurio en forma natural y los procesos de combustión en los cuales se emplea, se encuentran entre las fuentes más importantes de emisión de este metal al aire. No menos importante, es la contribución de la minería y la fundición de metales a la contaminación ambiental por mercurio, o la de los procesos de extracción de oro en los que se utiliza este metal<sup>3,1</sup>.

A diferencia de otros metales, el mercurio está continuamente recirculando en el ambiente, a lo cual se agrega su metilación a través de procesos biológicos y su bioacumulación en diferentes organismos vivos.

La contaminación del suelo y de los cultivos agrícolas ocurre tanto por el depósito de las partículas del aire, como de la irrigación de cultivos o su fertilización con aguas o con lodos de plantas de tratamiento de agua residual conteniendo concentraciones elevadas de mercurio de origen industrial.

Existen, por tanto, muchas formas en las cuales los alimentos que consumimos pueden estar expuestos y ser contaminados por mercurio, por lo que se requiere de un estricto control de esta situación, tanto en el mercado nacional como internacional de alimentos por parte de los organismos competentes. En este contexto, existen reglamentaciones internacionales con relación a los límites máximos permitidos para contenidos de mercurio. Tal es el caso de la directiva de la Comunidad Europea<sup>21</sup>, que establece dos límites permitidos, uno de 0.5 ug/g el cual es aplicado a la mayoría de las especies marinas, y un límite mayor de 1 ug/g para aquellas especies que naturalmente acumulan altos niveles de Mercurio. No obstante, tomando el criterio de los límites establecidos en países como Inglaterra, este límite baja a 0.3 ug/g<sup>22</sup>.

#### 5 Descripción del Método Estudiado

##### 5.1 Pre-tratamiento

## INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO

El metal mercurio es extraído por digestión por vía húmeda, en medio ácido, y en sistema cerrado mediante horno de microondas (MO).

### 5.2 Medición

La técnica de espectroscopia de absorción atómica por vapor frío se basa en la reacción de la muestra con un agente reductor, usualmente el Borohidruro de Sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). El borohidruro, libera hidrógeno en contacto con los ácidos, y el  $\text{Hg}^{2+}$  se reduce a su estado metálico. Dado que el  $\text{Hg}^0$  tiene una gran volatilidad, incluso a temperatura ambiente, éste se libera de la solución con una corriente de  $\text{N}_2$  y se transporta a la celda de cuarzo (mantenida a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ ). En estas condiciones se mide la absorción de las partículas atomizadas en la celda de cuarzo.

### 6 Reactivos

Agua desionizada para preparar todas las soluciones

- 6.1 Acido Nítrico 69-70% Instra Analyzed para análisis de trazas, J.T Baker.
- 6.2 Acido Clorhídrico 36.5 – 38 % Instra Analyzed para análisis de trazas, J.T Baker.
- 6.3 Borohidruro de Sodio p.a, Merck.
- 6.4 Hidróxido de Sodio p.a ,Merck.
- 6.5 Permanganato de Potasio, ( $\text{KMnO}_4$ ) p/a, MERCK.
- 6.6 Peróxido de Hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 31 %, Instra Analyzed, J.T. Baker.
- 6.7 Material de Referencia Certificado Hg SRM 3133;  $10.00 \pm 0.02\text{mg/g}$ ; Lote 991304; NIST.
- 6.8 Material de Referencia Certificado Hg 1000  $\pm 3\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Cat. 1000 33-1, Lote No. 522719; HIGH PURITY.
- 6.9 Solución Reductora, 0.2 % de  $\text{NaBH}_4$  y 0.05 % de  $\text{NaOH}$ .  
Se pesan 0.5 g de  $\text{NaOH}$  (6.4) se disuelven en aproximadamente 800 mL de agua. Luego se pesan 2 g de  $\text{NaBH}_4$ , (6.3) se disuelven en la solución de  $\text{NaOH}$ , y se afora a 1000 mL. Se filtra con papel GFC al vacío. La solución debe ser preparada al momento de usar.
- 6.10 Solución portadora:  $\text{HCl}$  3% (v/v).  
Adicionar 30 ml de  $\text{HCl}$  (6.2) y completar en matraz de 1 litro con agua desionizada.
- 6.11 Estándar acuoso de Hg de concentración 5 mg/L  
Tomar 0,5 mL de MRC (6.8) y completar en matraz de 100 mL con agua desionizada.
- 6.12 Estándar acuoso de Hg de concentración 0.05 mg/L.  
Tomar 1 mL de estándar acuoso de Hg (6.11) y completar en matraz de 100 mL con agua desionizada .
- 6.13 Permanganato de Potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) al 5 %.  
Se pesan 5 g de  $\text{KMnO}_4$  (6.5) y se completa con agua desionizada en matraz de 100 mL.
- 6.14 Carne de cerdo (pulpa)
- 6.15 Materia de Referencia certificado BCR 186, riñón de cerdo liofilizado; concentración de mercurio,  $1.97 \pm 0.04\text{ }\mu\text{g/g}$ .

### 7 Aparatos y materiales

- 7.1 Espectrofotómetro de Absorción Atómica, modelo Analyst 100, Perkin Elmer, equipado con un generador de hidruros, modelo FIAS-400, y software.
- 7.2 Lámpara de Mercurio de descarga de electrodos (EDL), Perkin Elmer, fuente de poder System 2.
- 7.3 Estufa con ventilación de aire, capaz de mantener una temperatura de  $95\text{ }^\circ\text{C}$ .



## INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO

- 7.4 Microondas MARS 5 CEM.  
 7.5 Balanza analítica, precisión 0.001 g  
 7.6 Desecador.  
 7.7 Material de vidrio clase A, el cual se lava previamente con Extran alcalino, luego con una solución de HNO<sub>3</sub> al 10 %, y se enjuaga con abundante agua desionizada. Posterior a este primer lavado, se vuelve a enjuagar cuatro veces con agua desionizada y se deja en HNO<sub>3</sub> al 10 % durante doce horas para volver a enjuagar cuatro veces con agua desionizada. Por último se deja 12 horas en agua desionizada y se seca en campana de flujo laminar.  
 En el caso de los vasos del microondas, se recomienda lavar estos, adicionando 5 mL de HNO<sub>3</sub> (6.1) y sometiendo al mismo programa de digestión de las muestras.

### 8 Procedimiento

#### 8.1 Pruebas experimentales.

En la primera parte de este trabajo (3.2), se presenta un procedimiento para el tratamiento de muestras de carne de cerdo, mediante digestión por microondas y la medición del mercurio presente en las muestras, utilizando EAA por vapor frío. Sin embargo, en el trabajo referido (3.2), no se logra optimizar las variables involucradas en el tratamiento de las muestras: tamaño de muestra, programa de temperatura, y composición de ácidos; debido a problemas operacionales presentados con el horno de microondas utilizado. En este trabajo, se intenta optimizar estas variables, utilizando un nuevo MO de la línea CEM (7.4) en el que la diferencia más relevante con relación al horno de microondas anterior, está dada por el programa de calentamiento. En el horno MO actual, el calentamiento es controlado por un programa de temperatura, a diferencia del anterior, el cual era controlado por un programa con rampa de potencia. Tomando en cuenta estas premisas, a continuación, se presenta el análisis de estas variables, y su influencia en la cuantificación de mercurio.

##### 8.1.1 Tamaño de muestra.

De acuerdo a las experiencias del trabajo anterior (3.2) y las obtenidas en este desarrollo experimental, se reduce el tamaño de muestra de carne a 2 g (carne fresca homogenizada). Como se discute en el apartado 9.2, un tamaño de muestra de 2 g, permite obtener un límite de cuantificación aceptable, lográndose una digestión efectiva de la muestra según las condiciones experimentales definidas y que se discuten en los apartados siguientes.

##### 8.1.2 Programa de calentamiento.

Para la elección del programa de calentamiento, según una rampa de temperatura, se consideraron los programas que recomienda el manual del MO CEM para muestras orgánicas, en este caso se selecciona el programa recomendado para digerir el MR de Hígado Bovino SRM 1577a (3.24); el que se presenta a continuación.

**Tabla 1** Programa de Calentamiento: Rampa de Temperatura

Etapa	Potencia Máxima	% de Potencia	Tiempo (min)	Presión (psi)	Temp (°C)	Mant (min)
1	600 W	100	10:00	350	210	10:00

## INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO

### 8.1.3 Composición de ácidos a utilizados en la digestión de las muestras. Eliminación de interferencias.

Considerando que el ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) resulta el ácido por excelencia en la digestión de muestras orgánicas, se toma éste como ácido de partida. Inicialmente se intentó ayudar a la digestión de estas muestras, incrementando la cantidad de ácido presente en estas. Sin embargo, la cantidad de  $\text{HNO}_3$  fue necesaria limitarla a un máximo de 5 ml, debido a la presencia de interferencias, las cuales elevaban los valores de Hg en las muestras<sup>3.5-3.8</sup>.

En trabajos publicados<sup>3.5 y 3.7</sup>, en los que se obtienen también altos resultados en la determinación de mercurio, los autores presentan como hipótesis, "que estos altos valores obtenidos se debían a interferencias por especies  $\text{NO}_x$  formadas (VNO), las cuales, absorben en longitudes de onda cercanas a la longitud de onda de absorción de Hg".

Por lo tanto, se decide incorporar una segunda digestión con peróxido de hidrógeno, como forma de disminuir la presencia de  $\text{NO}_x$  y con esto eliminar las interferencias. Esta recomendación fue tomada de la publicación 3.7; referida a; "Algunos problemas asociados con la determinación de mercurio en tejidos biológicos".

Los resultados que se obtienen en la determinación de mercurio en muestras digeridas con ácido nítrico y peróxido se presentan y discuten en el apartado 9.

### 8.2 Procedimiento desarrollado para realizar la digestión por vía húmeda cerrada utilizando horno de microondas.

#### 8.2.1 En muestras de carne de cerdo

- Tomar la carne y eliminar la grasa, cortarla y homogenizarla en minipimer
- Pesar la muestra de carne (6.14) (se recomienda 2 g de carne), pesando los vasos del horno de microondas, antes y después de adicionar la muestra.
- La masa de la muestra de carne ( $m_M$ ) se obtiene, por diferencia entre la masa del vaso con muestra de carne ( $m_{LL}$ ) y la masa de vaso vacío ( $m_V$ ); es decir;  $m_M = m_{LL} - m_V$
- Adicionar a la muestra una cantidad definida de  $\text{HNO}_3$  (6.1). (se recomienda 5 mL de  $\text{HNO}_3$ )
- Dejar la muestra digiriendo durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Antes de cerrar los vasos, se debe purgar los óxidos de nitrógeno volátiles (VNO) remanentes en la solución, con gas nitrógeno.
- Una vez eliminada gran parte de los VNO, se procede a cerrar los vasos, preparar el horno de microondas; y se someten las muestras al programa definido (**Tabla 1**).
- Una vez terminado el programa, los vasos permanecerán 20 min en un programa de enfriamiento.
- Finalizado el programa de enfriamiento, se abren los vasos del horno microonda, y se adiciona a la muestra digerida una cantidad definida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6.6) (se recomienda 3 mL).
- Los vasos se mantienen abiertos durante 20 minutos, para ayudar a la eliminación de los VNO, no obstante, antes de cerrar los vasos, se debe purgar también los VNO remanentes en la solución, con gas nitrógeno.
- Una vez eliminado gran parte de los VNO, se procede a cerrar los vasos, preparar el horno de microondas; y someter nuevamente, al mismo programa de temperatura (**Tabla 1**).
- Una vez terminado el programa, los vasos permanecerán 20 min en un programa de enfriamiento.
- Finalmente, se transfiere la muestra digerida en el vaso a un matraz aforado de 50 mL, colocando un embudo en dicho matraz, se lava bien la tapa y el vaso con agua desionizada.
- Antes aforar con agua desionizada, se adiciona un 3 % de HCl ( 6.2 ), lo que implica adicionar 1.5 mL de 6.2 en un matraz de 50mL. Finalmente, se adiciona una gota de permanganato de potasio (6.13) y se adiciona agua desionizada hasta completar el volumen del matraz.

### 8.2.2 En material de referencia certificado de riñón de cerdo, BCR 186.

Se pesa 0.1 g del MRC BCR 186 (6.15) y se realiza al mismo procedimiento que se detalla en 8.2.1 Previamente, se debe determinar la pérdida de masa por humedad de este material. Para esto, se procede según se informa en el reporte de la certificación de este material de referencia 3.9.

Según se indica en este documento, el procedimiento para determinar la pérdida de masa durante el secado es el siguiente.

- a. Tomar crisol vacío y secar alrededor de una hora, en estufa (7.3).
- b. Transferir el crisol a un desecador (7. 6) , hasta que se alcance temperatura ambiente, y pesar en balanza (7. 5) el crisol vacío ( $M_0$ )
- c. Colocar en el crisol aproximadamente 2 g de muestra de este material de referencia (6.15) y pesar en balanza crisol y muestra ( $M_1$ ).
- d. Colocar la muestra en estufa regulada, durante 2 horas a  $102 \pm 1$  °C.
- e. Transferir la muestra al desecador y pesar la muestra cuando se haya alcanzado la temperatura ambiente.
- f. Colocar nuevamente la muestra en estufa y secar durante 1 hora.
- g. Repetir proceso e.
- h. Repetir proceso e-f hasta que dos pesadas sucesivas muestren solo una pérdida de masa de 5 mg. La masa final registra es  $M_2$ .
  - Método de Cálculo de la pérdida de masa en el secado del material de referencia BCR 186

$$\text{Pérdida de masa por secado de la muestra (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} * 100$$

donde;

$M_0$ - masa en gramo del crisol después del paso b.

$M_1$ - masa en gramo del crisol con muestra después del proceso c.

$M_2$  - masa en gramo del crisol con muestra después del proceso h.

### 8.2.3 En muestras blancos.

Se adicionan todos los reactivos que involucra el proceso de digestión de la muestra, y se procede de igual forma que en 8.2.1.

El objetivo de este análisis es definir si existe algún tipo de contaminación en el proceso de digestión.

## 8.3 Medición

### 8.3.1 Condiciones de medición

Las condiciones instrumentales de operación que se establecieron previamente y que no varían en el desarrollo del proceso de medición para la determinación de Hg son:

Lámpara	:	Hg (EDL)
Tiempo de integración	:	15 s
Datos de procesamiento	:	Peak Height.
Slit	:	0.7 nm (Low)
Longitud de onda	:	253.7 nm
Temperatura de celda	:	100 °C
Flujo de gas carrier (N <sub>2</sub> )	:	50- 70 mL/min

Volumen de muestra : 500 uL  
Corrección de Background: No  
Flujo de ácido clorhídrico(portador): 8-16 mL /ciclo  
Flujo NaBH<sub>4</sub> (reductor) 4-8 mL /ciclo

Bajo estas condiciones, se realiza el chequeo de sensibilidad del equipo, evaluando la concentración característica del elemento, la cual corresponde a la concentración del elemento que genera una señal de 0.0044 unidades de Time Average. Se obtiene lo siguiente:

Concentración característica calculada : 0.4 ug/L.  
Concentración característica teórica (proveedor) : 0.5 ug/L.

### 8.3.2 Establecimiento del límite de detección y cuantificación.

El límite de detección (L.D.) se estimó a partir de la determinación de seis blancos tratados independientemente, lo cuales fueron tomados a partir de muestras de carne de cerdo (6.14). Se calcula la desviación estándar de las determinaciones, y se expresa el límite de detección como sigue:

$$LD = (s_{blanco} * 3) + señalblanco$$

Por su parte, el límite de cuantificación (L.C.) se establece como sigue

$$LC = (s_{blanco} * 10) + señalblanco$$

En el acápite 9.2, se presentan los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación.

En Chile, el Plan de Control de Residuos Exportación del SAG, establece un límite de detección de 0,01 ug/g<sup>3.10</sup>.

### 8.3.3 Establecimiento del intervalo de trabajo y preparación de los estándares de calibración.

Según el límite de detección y de cuantificación obtenido en este trabajo, cuyos resultados se presentan en el apartado 9.2, se establece como intervalo de trabajo para la cuantificación 1 – 6.0 ug/L.

Se prepararon estándares de mercurio dentro de este intervalo de trabajo, mediante diluciones sucesivas a partir de un material de referencia (6.7). En la última dilución de los estándares, se adiciona un 3 % de HCl (6.2) y 1 gota de permanganato de potasio (6.10) antes de completar el volumen de agua del matraz.

### 8.3.4 Medición de curva de calibración y método de cuantificación.

Se midieron curvas de calibración dentro del intervalo de trabajo establecido. La cuantificación del contenido de Mercurio Total en las muestras se realizó mediante el método de Bracketing<sup>3.12-3.13</sup>. La elaboración de las curvas de calibración permite constatar la linealidad de los puntos de bracketing en esta curva.

## INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO

De esta forma se obtienen los valores de concentración, por bracketing, en unidades de ug/l. Para poder obtener los valores cuantificados en (ug/g) se procede a calcular la concentración a partir de la siguiente expresión.

$$C(\mu\text{g/g}) = C \times \frac{V}{m} \times 1000$$

en donde:

C (ug/L) = Concentración obtenida de la ecuación de bracketing.  
 V (mL) = Relación de la masa promedio de la muestra (g) y el volumen final del matraz (mL) que contiene la muestra digerida.  
 m (g) = masa de la muestra de carne de cerdo ó MRC

Nota: En caso de un MRC, se incorpora a esta expresión un factor de corrección de humedad que aparece multiplicando en la expresión, cuyo cálculo se detalla en 8.2.2

En este estudio se tomó 0.1 g como cantidad de muestra para el material de referencia (6.15), lo que permite obtener un nivel de cuantificación de Hg de alrededor de 3.9 ug/L. Este nivel de cuantificación en una muestra de carne de cerdo, considerando el procedimiento descrito en (8.2.1) equivale a 0.1 ug de Hg/g de carne de cerdo. Este nivel de cuantificación, se encuentra por debajo del valor permisible de Hg legislado para este tipo de matriz, que alcanza que alcanza el valor más bajo en Inglaterra de 0.3 ug/g.(ver apartado 4)

En el **apartado 9.3** se detalla los resultados obtenidos en esta cuantificación.

#### 8.4 Evaluación de la precisión de repetibilidad del método.

Se realizó la evaluación de la precisión del método en condiciones de repetibilidad, a partir de las mediciones que se realizaron a 6 muestras de MRC BCR 186 (6.15). Los resultados de estas mediciones, se analizan mediante el test estadístico de evaluación de la precisión, recomendado en la Guía ISO 33 (3.20).

La precisión del método es evaluada por comparación de la desviación estándar  $S_w$  determinada bajo condiciones de repetibilidad, con el valor requerido de desviación,  $\sigma_{w0}$ . El valor de  $\sigma_{w0}$  expresado como forma porcentual es de un 4 % para este caso; el cual corresponde al valor más riguroso encontrado en las publicaciones relacionadas con análisis de Hg por métodos similares al desarrollado en este trabajo, en donde aparecen informados valores entre 4 hasta un 16 %<sup>3,7</sup>.

Se calcula la razón:

$$\chi^2 = \left( \frac{S_w}{\sigma_{w0}} \right)^2$$

El criterio de aceptación está dado por la comparación del valor de  $\chi^2$  calculado con el valor de tabla de la distribución  $\chi^2$ :

$$\chi_{TABLA}^2 = \frac{\chi_{n-1}^2; 0.95}{n-1}$$

Si  $\chi^2 < \chi_{TABLA}^2$  no hay evidencia de que el método no tiene la precisión requerida.

En el apartado 9.4 se ofrece los resultados obtenidos.



**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

**8.5 Evaluación del sesgo en la determinación.**

Para establecer si la determinación por EAA por vapor frío, entrega valores no sesgados, se realiza una prueba t a la hipótesis nula de no sesgo, esto es  $H_0: X=X_0$ <sup>3.15</sup>. Esta prueba consiste en comparar el **sesgo** ( $\Delta$ ), con un **valor crítico**( $\Delta_c$ ). Estos valores se definen a continuación.

$$\Delta = | \bar{x} - x_o |$$

donde:

- $\bar{x}$  = valor promedio de las "n" mediciones
- $x_o$  = valor certificado del material

$$\Delta_c = t_{0.975} \times \frac{s}{\sqrt{n}} + U$$

y donde:

- $t_{(n-1)}$  : valor de la tabla "t" para n-1 grados de libertad
- s : desviación estándar de las medidas
- n : número de replicados
- U : incertidumbre del material de referencia

El criterio de decisión para la aceptación de la hipótesis nula a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) dado esta dado por;

$$|\Delta| < \Delta_c$$

Entonces se acepta la hipótesis nula de "no sesgo".

**8.6 Estudios de Recuperación.**

Para evaluar el sesgo en la determinación de Mercurio para la matriz carne, utilizando el tratamiento previo de la muestra mediante digestión húmeda cerrada en horno microondas, se requiere realizar estudios de recuperación.

En este caso, como existe disponibilidad de un material de referencia certificado (CRM) de la matriz de las muestras que se analizan; la recuperación ( $\bar{R}_m$ ) es estimada por comparación del promedio de los análisis de las muestras replicadas del material de referencia certificado MRC con el valor certificado.

En este caso se analiza BCR 186 (6.15), según procedimiento que se detalla en 8.2.1. De esta forma, la recuperación se estima según la siguiente expresión.

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{CRM}}$$

donde :

- $\bar{C}_{obs}$  : Diferencia del promedio de los resultados de los replicados de las adiciones del MRC BCR 186 en riñón de cerdo liofilizada.
- $C_{CRM}$  : Valor certificado del material de referencia BCR 186

### 8.6.1 Evaluación de la Incertidumbre de recuperación.

Mediante la utilización material de referencia representativo, en este caso el MRC BCR 186.

La evaluación de la incertidumbre asociada a la recuperación mediante la utilización de un material de referencia representativo, se realiza a partir de la expresión siguiente.

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m * \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n * \bar{C}_{obs}^2} + \left(\frac{u(C_{CRM})}{C_{CRM}}\right)^2}$$

donde:

$s_{obs}$  : desviación estándar de los replicados de las concentraciones en las adiciones de MRC en la carne (MRC BCR 186)

$u(C_{CRM})$  : Incertidumbre estándar en el valor certificado del MRC (BCR 186).

### 8.7 Determinación de la incertidumbre del método.

Para poder calcular la incertidumbre, debemos considerar la ecuación que da cuenta de la concentración. Tomando en cuenta que en este trabajo la incertidumbre del método es estimada a partir de estudios de recuperación, la expresión del apartado 8.3.4, debe considerar el término de recuperación del método ( $R_m$ ).

La incertidumbre se calcula utilizando una planilla de Kragten<sup>3.15 y 3.17</sup>

El método de cálculo de Kragten es una herramienta para estimar la incertidumbre combinada, basada en cálculos a partir del modelo que rige el proceso de medición y de las incertidumbres estándares asociadas a cada componentes del modelo.

La incertidumbre asociada a un resultado que depende de dos o más variables, se calcula utilizando la "Ley de propagación de los errores" representada por la ecuación general que se muestra a continuación:

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^k \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} u(x_i)\right)^2 + \sum_{i,j=1}^k \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \frac{\partial y}{\partial x_j} u(x_i, x_j)\right)}$$

El procedimiento de cálculo de Kragten aprovecha una aproximación numérica de las derivadas parciales (bajo ciertas condiciones) resultantes de la ecuación de medición, de la siguiente forma:

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} \cong \frac{y(x_i + u(x_i)) - u(x)}{u(x_i)}$$

Se construye una hoja de cálculo, considerando esta aproximación como base del desarrollo. Para ello se debe incorporar en celdas predeterminadas de la hoja de cálculo: la ecuación de medición, los valores numéricos de los componentes de la ecuación y las incertidumbres estándares correspondientes. Las diferentes operaciones matemáticas definidas en las celdas permiten finalmente obtener la incertidumbre estándar combinada.

Los valores que se ingresan a esta planilla se describen a continuación.

## INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO

*Incertidumbre de las concentraciones de los estándares:* corresponden a las obtenidas por preparación.

*Incertidumbre de las Absorbancias:* corresponde a la desviación estándar del promedio, dividida por la raíz cuadrada de las n mediciones.

$$U_{Abs} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

*Incertidumbre del Volumen final:* este incluye 3 fuentes de incertidumbre que se combinan como se muestra:

$$U_{dil} = \sqrt{U_{fabricante}^2 + U_{llenado}^2 + U_{efectoT}^2}$$

*Incertidumbre de la masa:* está dado por la incertidumbre de la pesada, que se calcula:

$$U_{pesada} = \sqrt{U_{repetibilidad}^2 + U_{masas}^2 + U_{balanza}^2}$$

La incertidumbre asociada a la recuperación:

$$U_R \text{ ( se detalla en acápite 8.6.1 )}$$

Los resultados se presentan en el apartado 9.6 .

### 9. Resultados obtenidos en el desarrollo y validación de un método para la determinación de mercurio en carne de cerdo por vía húmeda en sistema cerrado mediante horno microonda y cuantificación por EAA por vapor frío.

#### 9.1 Resultados preliminares

Continuando el desarrollo experimental de este trabajo, y tomando como antecedentes, los resultados obtenidos en estudios preliminares anteriores (ver informe 3.2), se continuó el estudio como se describe a continuación.

Inicialmente, se analizaron muestras de carne de cerdo y muestras de carne de cerdo con adición de estándar acuoso.

Para esto se analizaron 3 muestras de carne de cerdo con y sin adición de estándar acuoso, para un tamaño de muestra de 3 g y se trataron, siguiendo un procedimiento similar al descrito en 8.2.1. El tratamiento utilizado en este estudio preliminar, difiere del procedimiento 8.2.1, solo en que las muestras en la dilución final se encuentran en un medio de HNO<sub>3</sub> y no en HCl como se detalla en este procedimiento.

**Tabla 2** Resultados obtenidos en la cuantificación de Hg en muestras tratadas mediante horno microonda

Nº	Con tratamiento digestión		Muestra control acuoso ug/L
	Muestra Carne de cerdo UA	Muestra carne de cerdo con adición de std acuoso ug/L	
1	0.0026	2.02	1.97
2	0.0023	2.29	2.08
3	0.0018	2.01	2.12
Prom.	0.0022	2.11	2.06
C.V (%)		7.6 ( para gráficos seleccionados)	3.9
C <sub>nom</sub>		2.0	2.0
R		106	

**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

De los resultados que se reportan en la **Tabla 2**, resulta importante destacar, que se requirió varias veces repetir la medición de las muestras y los estándares acuosos, debido a que la forma que se obtenía de los gráficos absorbancia vs tiempo (picos anchos e irregulares), demostraba problemas en la reacción de la muestra con el borohidruro, lo que podría obedecer a problemas de interferencia o a problemas operacionales. Por otro lado, para la muestra de carne se obtiene "algún nivel" de unidades de absorbancia, y esta posible de falsa detección de Hg, podría obedecer a interferencias por la presencia de VNO, los cuales absorben a la misma longitud de onda que el Hg.

Debido a estas posibles interferencias, y a la pobre repetibilidad de las mediciones de las muestras de carne y de los estándares acuosos, se decide disminuir el tamaño de la muestra a digerir, y mantener una composición de un 3 % de HCl en la última dilución de los estándares y de las muestras.

**Tabla 3**

Muestras lectura	por	Muestras digeridas		Muestras lecturas	
		MRC BCR 186		Controles acuosos	
		ug/L	ug/g	Muestras	ug/L
MR1		3.85	2.00	C1	4.03
MR2		4.78	2.34	C2	3.81
MR3		3.74	2.02	C3	4.04
MR4		3.92	2.07	C4	4.04
MR5		3.94	2.18		
MR6		3.87	2.11		
MR1		4.13	2.14		
MR2		4.65	2.43		
MR3		4.14	2.23		
MR4		4.08	2.18		
MR5		3.93	2.17		
MR6		4.15	2.26		
promedio			2.18		3.98
C:V (%)			5.9		2.9
C <sub>nom</sub> (R %)			1.97 (111 %)		4.01

En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de Hg para muestras de MR de riñón de cerdo (6.15), digeridas en horno microonda, según procedimiento 8.2. Se utilizó un tamaño de muestra de este MR de 0.1 g y la muestra fue disuelta finalmente en un 3 % de HCl. De acuerdo a estos resultados, se observa que los valores se encuentran algo por encima del valor certificado del MR obteniéndose un 111 % de recuperación, Además, 24 horas después de adicionar el HCl. comienza a observarse un precipitado en las soluciones digeridas y en los estándares.

Es por esto, que se decide nuevamente repetir el ensayo, manteniendo las muestras finalmente en una solución ácida de HNO<sub>3</sub>, al 3 %.

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de MR de riñón de cerdo, y en muestras de cerdo, tomando en cuenta esta consideración, es decir manteniendo las muestras disueltas en una solución ácida de HNO<sub>3</sub>. De acuerdo a estos resultados experimentales, si bien las muestras en HNO<sub>3</sub>, mantienen una apariencia estable, la medición no es reproducible, se obtienen formas de picos irregulares que no pudieron ser cuantificados. Es por esto que finalmente se recomienda mantener en la dilución final las muestras digeridas y estándares acuosos en un medio de HCl al 3 %.

**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

Dichos resultados pudieron ser también corroborados por los obtenidos en la literatura (3.23), para muestras digeridas de materiales biológicos, en las cuales, se obtienen también señales no reproducibles, cuando estas muestras se mantienen en HNO<sub>3</sub>. La explicación que se le da a este hallazgo es que se presentan problemas en la reacción de reducción del Hg<sup>+2</sup> a Hg<sup>0</sup> con el borohidruro, cuando las muestras se encuentran en un medio de HNO<sub>3</sub>.

De acuerdo a esto, se decide finalmente que las muestras deberán ser mantenidas en su dilución final en un medio de HCl al 3 %, para que de esta forma se favorezca siempre la reacción de las muestras con el borohidruro en la reducción del Hg<sup>+2</sup> a Hg<sup>0</sup>, obteniendo una señal reproducible. Es importante señalar que con vista a mantener la apariencia estable de la solución, es necesario que la medición se realice en un plazo no mayor a las 24 horas como forma de evitar la presencia de precipitados en la solución.

**Tabla 4**

Muestras digeridas				Muestras lecturas	
Muestra de MRC BCR 186	ug/g	Muestra de carne de cerdo	UA	Muestras Controles Acuosos	ug/L
MR1	1.93	M1	0.0015	C1	4.07
MR2	1.87	M2	0.0027	C2	3.70
MR3	1.94	M3	0.0014	C3	3.77
MR4	1.92	M4	0.0014	C4	4.24
MR5	1.98	M5	0.0013	C5	4.21
MR6	1.88			C6	3.89
MR1	1.98				
MR2	1.94				
MR3	2.03				
MR4	1.92				
MR5	1.76				
MR6	1.82				
prom	1.91		0.0017		3.98
C:V (%)	4.2 (gráficos seleccionados)				2.8 (gráficos seleccionados)
C <sub>nom.</sub> ( R )	1.97 (R= 97 %)				4.01

Tomando en cuenta estas experiencias obtenidas de estos resultados preliminares, se procede a realizar la **Validación del Método para la determinación de Hg**, en las muestras de carne de cerdo, material de referencia de riñón de cerdo liofilizado y blancos de digestión.; utilizando el procedimiento propuesto en 8.2 el que considera un medio de HCl al 3 % en la dilución final de las muestras digeridas.

**9.2 Límite de detección y de cuantificación.**

En la **Tabla 5** se presentan los valores de absorbancia obtenidos para 6 muestras de carne de cerdo que fueron tratadas independientemente y medidas según el método desarrollado y detallado en 8.2.1. Como se detalla en el procedimiento, se utiliza como tamaño de muestra una masa de carne de cerdo de 2 g.

Los límites de detección y cuantificación (LD y LC) expresados en absorbancia; que se presentan también en esta tabla, fueron calculados según las expresiones definidas en el acápite 8.3.2.

**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

**Tabla 5** Valores de absorbancia obtenidos en la medición de muestras de carne de cerdo digeridas.

Medidas	Abs/bco	L.D (abs)	L.C (abs)
1	0.002	0.003	0.007
2	0.003	0.004	0.009
3	0.007		
4	0.001	0.003	0.007
5	0.001	0.003	0.007
6	0.001	0.003	0.007
<b>prom</b>	<b>0.0017</b>	<b>0.0035</b>	<b>0.0076</b>
<b>ds</b>	<b>0.0006</b>		

Los límites de detección y de cuantificación expresados en ug/L, se obtuvieron a partir de los valores de pendiente (0.0088) e intercepto ( 0.0004), obtenidos a partir de la curva de calibración medidas en el intervalo de concentraciones de 1.0 – 5.9 ug/L. Esta curva de calibración, fue medida conjuntamente con las muestras de carne de cerdo.

Los valores de los límites de detección y cuantificación que se obtienen según el método desarrollado para la determinación de Hg en carne de cerdo, son los siguientes.

$$LD \text{ (expresado en ug/l)} = 0.4 \quad \text{y} \quad LC \text{ (ug/l)} = 0.8$$

considerando 2 g de carne de cerdo, y completando en matraz de 50 mL, se obtiene;

$$LD \text{ (expresado en } \frac{ug \text{ de Hg}}{g \text{ de cerdo}}) = 0.009 \quad \text{y} \quad LC \text{ (} \frac{ug \text{ de Hg}}{g \text{ de cerdo}}) = 0.020$$

Es importante destacar que este método desarrollado para la determinación de Hg en carne provee un límite de detección similar al límite de detección que establece el Plan de Control de Residuos Exportación del SAG en Chile (0.010 ug/g) y más de 15 veces el límite de cuantificación, si tomamos como referencia el límite permisible legislado por Inglaterra para especies marinas (0.3 ug/g).

**9.3** **Cuantificación de Hg en muestras de material de referencia certificado de riñón de cerdo liofilizado (BCR 186)**

Se cuantificó la concentración de Hg por bracketing, en muestras del material de referencia de riñón de cerdo liofilizado certificado en Hg. Las curvas de calibración se presentan en el 11.3.

En la **Tabla 6** se presentan los valores de concentración obtenida.

**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

**Tabla 6 Concentraciones de Hg en ug/L (ug/g) obtenidas en el MRC BCR 186.**

MRC BCR 186	Concentración de Hg	
	ug/L	ug/g
MR1	4.10	2.27
MR2	4.49	2.41
MR3	4.04	2.20
MR4	4.09	2.23
MR5	4.23	2.32
MR6	4.09	2.17
MR1	3.99	2.21
MR3	4.18	2.28
MR4	4.42	2.40
MR5	4.33	2.37
MR6	4.07	2.25
Prom.	4.18	2.28
C:V (%)		3.7
C <sub>nom</sub>		1.97

Como se observa en la Tabla 6, se cuantifica Hg a niveles de 2 ug /g en un material de referencia certificado con una desviación estándar relativa que no supera el 4 %.

**9.4 Evaluación de la precisión del método en condiciones de repetibilidad.**

De acuerdo a los resultados de concentración de Hg obtenidos, se realiza una evaluación de la precisión. En la **Tabla 7** se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 7 Evaluación de la precisión en condiciones de repetibilidad.**

	MRC BCR 186
C.V (S <sub>wo</sub> : %)	4
S <sub>wo</sub> (ug/L)	0.079
S <sub>w</sub>	0.084
g.l	5
χ <sup>2</sup> (n-1);0.95	11.1
χ <sup>2</sup> calc.	5.7

Se obtiene que  $\chi^2_{calc.} < \chi^2_{(n-1);0.95}$  por tanto el método evaluado presenta una precisión requerida, al cuantificar la concentración de Hg en muestras de un MRC de riñón de cerdo. Para este análisis, los valores de precisión obtenidos, fueron comparados con una desviación estándar relativa del 4 %, el cual corresponde al valor más riguroso encontrado en las publicaciones relacionadas con análisis de Hg por métodos similares al desarrollado en este trabajo, en donde aparecen informados valores entre 4 hasta un 16 %<sup>3,7</sup>.

**9.5 Evaluación de la Recuperación y de su incertidumbre asociada.**

Al evaluar la recuperación en la cuantificación de Hg en el MRC BCR 186, se obtiene un nivel de recuperación de un 116 %, con una incertidumbre asociada de un 1.7 %.

Este nivel de recuperación obtenido, se encuentra por encima de lo que se reporta en algunos de los trabajos consultados (90-110 %)<sup>3,5-3,8,3,23</sup>. Según explican los autores de estas publicaciones.

**INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN DE METODO**

Estos valores obtenidos en la medición de Hg por sobre lo esperado, puede deberse a que aún persisten interferencias en la medición, debido a la presencia de óxidos de nitrógenos remanentes en la solución digerida, los cuales absorben a la misma longitud de onda del Hg, provocando un incremento de la señal de Hg.

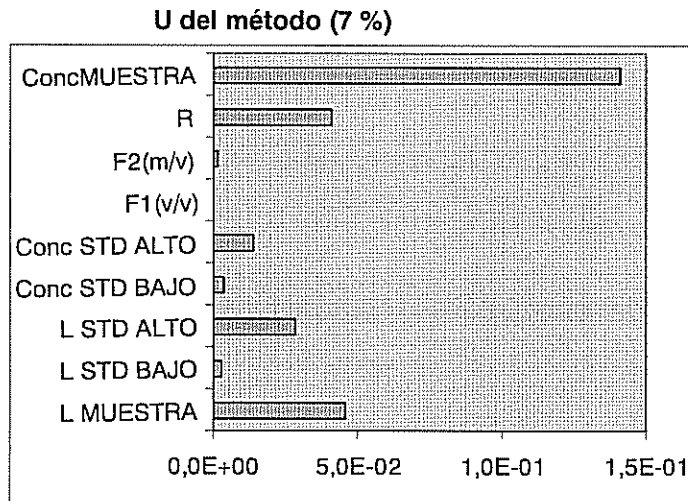
La disminución de estas interferencias se ha tratado en otros trabajos, a través de la adición de ácido sulfámico en las soluciones digeridas, lo cual ha reducido considerablemente los efectos de esta interferencia.

**9.6 Evaluación de la Incertidumbre en la determinación de Hg en el MRC BCR 186 a partir del método desarrollado**

Se obtiene una incertidumbre relativa del orden del 7 %.

En el **Gráfico 1** se ilustran los aportes individuales en la incertidumbre de la concentración de Hg en el MRC de riñón de cerdo, BCR 186.

**Gráfico 1** Aportes individuales en la incertidumbre de la concentración de Hg en el MRC BCR 186





## 10 Conclusiones y Recomendaciones

- 1- Se desarrolla y se valida un método de pre-tratamiento por digestión húmeda cerrada en horno de microondas, y medición de mercurio por EAA por vapor frío para muestras de carne de cerdo
- 2- El límite de detección, que proporciona este método (0.009 ug/g) es similar al límite de detección regulado por el SAG.
- 3- Se obtiene una precisión del método adecuada con un coeficiente de variación de un 4 %.
- 4- En la determinación de Mercurio en el MRC de riñón de cerdo se obtiene una incertidumbre del método de un 7 %.
- 5- En las evaluaciones realizadas en la cuantificación de Hg para el MRC BCR 186, se obtiene un nivel de recuperación de un 116 % por encima de lo esperado si se compara con lo reportado en otros trabajos. Se considera que este nivel de recuperación por encima de lo esperado se debe a que aún persisten interferencias por la presencia de remanentes en la solución digerida, de óxidos de nitrógeno volátiles.
- 6- De acuerdo a los resultados de recuperación obtenidos se recomienda buscar otras formas posibles de disminuir estas interferencias, como puede ser la adición de ácido sulfámico en la solución digerida, la que en determinado nivel de concentración podría reducir el efecto de estos NO<sub>x</sub>, reduciendo las interferencias y obteniendo niveles de recuperación más acorde a los que reporta la literatura.



**INFORME TÉCNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE TETRACICLINAS EN CERDO POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.  
PROCEDIMIENTO II**

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### INDICE

<b>1.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>ALCANCE</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>3</b>
<b>4.</b>	<b>DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ESTUDIADO</b>	<b>4</b>
4.1	Antecedentes	4
4.2	Principio	5
<b>5.</b>	<b>EQUIPAMIENTO</b>	<b>6</b>
<b>6.</b>	<b>REACTIVOS</b>	<b>6</b>
<b>7.</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>	<b>7</b>
7.1	Preparación de soluciones de estándares concentrados	7
7.2	Preparación de soluciones intermedias multiestándar	7
7.2.1	Esquema de preparación de soluciones intermedias multiestándar	7
7.3	Preparación de solución intermedia de estándar interno	8
7.4	Preparación de estándares de para curva de calibración en medio acuoso	8
7.5	Preparación de estándares para curva de calibración en matriz	8
7.5.1	Esquema de preparación de estándares de calibración en carne	8
7.6	Preparación de estándares y muestras controles para cuantificación mediante bracketing en matriz	9
7.7	Preparación de ácido oxálico 0.01 m acuoso	9
7.8	Preparación de ácido oxálico 0.01 m metanólico	9
7.9	Preparación de buffer Mc Ilvaine	10
7.10	Preparación de metanol al 5% en agua	10
7.11.	Activación de las columnas de extracción en fase sólida	10
7.12.	Procedimiento de extracción	10
7.12.1	Esquema del procedimiento de extracción	11
7.12.2	Esquema de purificación de las tetraciclinas en columnas de extracción en fase sólida	12
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>13</b>
8.1	Condiciones Cromatográficas	13
8.2	Curva de calibración. Rango lineal	15
8.2.1	Tetraciclina	15
8.2.2	Oxitetraciclina	16
8.2.3	Clortetraciclina	16
8.3	Cuantificación de tetraciclinas en muestras control mediante bracketing	17
8.3.1	Evaluación de la Precisión	18
8.3.2	Cálculo de la Incertidumbre	18
8.3.3	Evaluación del sesgo	20
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 1. OBJETIVO

Validar un método analítico para la determinación de Tetraciclinas en carne de cerdo a través de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detector con Arreglo de Diodos.

### 2. ALCANCE

Determinación de la concentración de Oxitetraciclina, Tetraciclina y Clortetraciclina en un rango de concentración de hasta 150 µg/kg en los extractos finales obtenidos, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detección de Arreglo de Diodos.

### 3. REFERENCIAS

- 3.1 M H Thomas: Simultaneous determination of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline in milk by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, N° 4, (1989).
- 3.2 A L Cinquna, F Longo, G. Anastasi: Validation of a high - performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatog A*, **987**, (2003) 227-233.
- 3.3 T R De Lange, R Diaz: Método de determinación de tetraciclinas en tejido por HPLC-Diode Array. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Salud y Consumo. España (2003).
- 3.4 J MacNeil, V Martz, G Korsrud: Chlortetracycline, oxytetracycline, and tetracycline in edible animal tissues, liquid chromatographic method: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem International* **79**, N° 2, (1996).
- 3.5 Protocolo de uso Z-CMQ-008 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC).
- 3.6 Committee for Veterinary medicinal products: Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, Summary report. OJ N° L73, 19.3.92.
- 3.7 F Schenck, P Callery: Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J. Chromatog A*, **812** (1998) 99-109.
- 3.8 M Aerts, A Hogenboom, U Brinkman: Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J Chromatog B*, **667** (1995) 1-40.  
Anderson, H Rupp, W Wen-Hsin: Complexities in tetracycline analysis. Chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatog A*, **1075** (2005) 23-32.
- 3.9 R Delépeé, H Pouliquen: Ion-paired solid phase extraction as a sample preparation strategy for the high-performance liquid chromatographic determination of oxytetracycline in the bryophyte *Fontinalis antipyretica*. *Analytica Chim. Acta*, **475** (2003) 117-123.
- 3.10 J M Wessels, W E Ford, W Szymczak, S Schneider: The Complexation of Tetracycline and Anhydrotetracycline with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>: A Spectroscopic Study. *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 9323 – 9331. Y Wen, Y Wang, Y Feng: Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta* **xx** (2006) en prensa.
- 3.12 F K Muriuki, W O Ogara, F M Njeruh, E S Mitema: Tetracycline residue levels in cattle meat from Nairobi slaughter house in Kenya. *J. Vet. Sci. B* **2** (2001) 97 – 101.
- 3.13 C R Anderson, H S Rupp, W-H Wu: Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J. Chromatog. A* **1075** (2005) 23 – 32. (Review)
- 3.14 H Li, P J Kijak, S B Turnipseed, W Cui: Analysis of veterinary drug residues in shrimp: A multi-class method by liquid chromatography–quadrupole ion trap mass spectrometry *J. Chromatog. B* **xx** (2006) en prensa.

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

- 3.15 R Coyne, O Bergh, O B Samuelson: One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. *J. Chromatog. B* **810** (2004) 325 – 328.
- 3.16 M Touraki, P Rigas, P Pergandis, C Kastritsis: Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatog. B* **663** (1995) 167 – 171.
- 3.17 A P Cooper, G W F Stubbings, M Kelly, J A Tarbin, W H H Farrington, G Shearer: Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography–high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. *J. Chromatog. A* **812** (1998) 321 – 326.
- 3.18 G Carnignan, K carrier, S Sved: Assay of Oxytetracycline residues in salmon muscle by Liquid Chromatographic with ultraviolet detection. *J. AOAC. Int* **76** (1993) 325 – 328.
- 3.19 J Sunderland, A Lovering, C Tobin, A McGowan, J Roe, A Delsol: Determination by HPLC of chlortetracycline in pig faeces. *J. Antimicrob. Chemotherapy* **52** (2003) 135 – 137.
- 3.20 S Schneider, M Schmitt, G Brehm, M Reiber, P Matousek, M Towrie: Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ . *Photochem. Photobiol. Sci* **2** (2003) 1107 – 1117.
- 3.21 FSIS: CLG – TET2.01 9/25/03. Qualitative Identification of Tetracyclines in tissues.
- 3.22 H T Lu, Y Jiang, H Li, F Chen, M Wong: Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Doxycycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Tetracycline Antibiotics by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Chromatographia* **60** (2004) 259 – 264.
- 3.23 H Senyuva, T Özden, D Y Sarica: High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline Residue in Cured Meat Products. *Turk. J. Chem.* **24** (2000) 395 – 400.
- 3.24 EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2th Edition, 2000.

**4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ESTUDIADO**

**4.1 Antecedentes**

Las tetraciclinas son antibióticos ampliamente utilizados en el control de enfermedades bacterianas desde su descubrimiento a mediados de 1900 (Figura 1). Estos antibióticos han jugado un rol importante en la salud tanto de humanos como en medicina veterinaria, debido a que presentan una actividad de amplio espectro contra organismos Gram-positivos y Gram-negativos y además presentan un bajo costo. Su uso en medicina veterinaria esta relacionado con la prevención y control de enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso de estos antibióticos ha llegado a ser un serio problema puesto que dejan residuos en los alimentos que pueden ser tóxicos o bien producir reacciones alérgicas en individuos hipersensibles. Por otro lado, el consumo prolongado de bajas dosis de antibióticos puede inducir la resistencia bacteriana a estos mismos antibióticos. Con el fin de evitar estos efectos, la Unión Europea ha establecido concentraciones límite máximas permitidas (MRL) para diversos residuos en alimentos, siendo en general para las tetraciclinas de 100 µg/kg en músculo de cerdo.

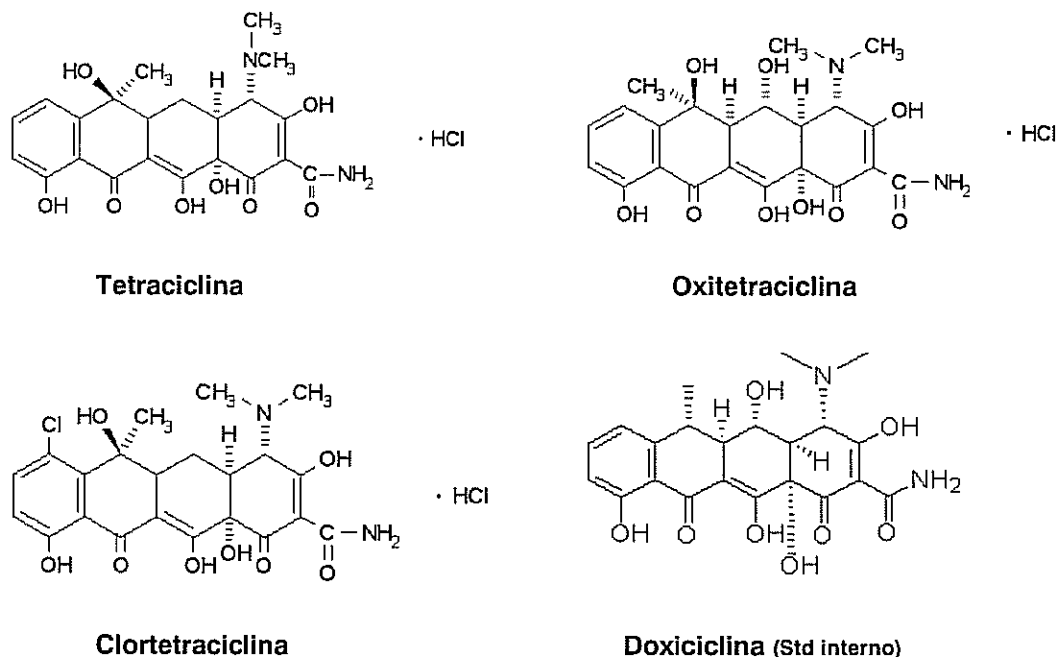


Figura 1. Estructura Química de las Tetraciclinas estudiadas.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 4.2 Principio

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia es un método que es utilizado extensamente para la separación de mezclas complejas. Como toda técnica cromatográfica, la separación de los analitos se basa en el reparto de cada analito en la fase estacionaria (sólido químicamente activo) y la competencia por un mismo sitio con la fase móvil (solvente con gran afinidad a la fase estacionaria). La afinidad de cada analito con la fase estacionaria, dada por su constante de reparto, permite la separación de los componentes de una muestra los cuales son posteriormente detectados y cuantificados.

En este estudio, el cromatógrafo tiene acoplado un detector UV-vis con arreglo de diodos. La tecnología de este tipo de detectores permite el monitoreo continuo del espectro de absorción del eluato proveniente de la columna. De esta manera se obtiene el espectro completo de la elución de un peak, lo que ayuda a la identificación y cuantificación de un determinado componente.

En la bibliografía existen diversos métodos para la determinación de tetraciclinas en diferentes matrices y formulaciones farmacológicas, en donde un número importante de ellas cumplen con los requerimientos para la detección de estos antibióticos en tejidos. En este estudio se cumple con algunos de los requerimientos de validación internacionales basados en la Guía EC/657/2002 para este tipo de mediciones, al tiempo que presentan la sensibilidad y especificidad requerida.

Las Tetraciclinas presentan absorción de radiación UV-vis, con dos bandas bien definidas cuyos máximos están entre 260 y 350 nm aproximadamente.

Dada la estructura química de las Tetraciclinas, la técnica de extracción y las condiciones cromatográficas están relacionadas con la solubilidad y estabilidad que éstas tienen en soluciones de pH ácido. A diferencia de otros antibióticos, las Tetraciclinas no presentan una importante interacción con proteínas, cuando son aplicados en animales durante el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, presentan una gran capacidad para formar complejos con cationes divalentes, por lo que el uso de EDTA se hace imprescindible para eliminar este tipo de interferentes que están presentes en las distintas matrices.

Por lo tanto, el procedimiento de extracción se divide en dos etapas. La primera consiste en extraer los antibióticos desde la matriz con buffer con un alto contenido de EDTA. La segunda etapa de purificación o clean up, donde el extracto obtenido es sometido a una extracción en fase sólida con el objetivo de concentrar el analito y remover grasas y otros interferentes provenientes de la matriz.

La cuantificación se realizó mediante bracketing previa verificación del rango lineal.

### 5. EQUIPAMIENTO

- 5.1 Material de vidrio clase A.
- 5.2 Balanza Sartorius MC1 RC 210P
- 5.3 Sistema de vacío multicolumna "Manifold"
- 5.4 Columnas SPE C-18 Waters Oasis HLB 6cc (0,2 g) Extraction Cartridges.
- 5.5 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia equipado con un detector de arreglo de diodos (HPLC - DAD), Waters.
- 5.6 Columna XTerra RP<sub>8</sub> 5 µm, 3.5x150 mm para HPLC.
- 5.7 Gas Helio (como desgasificador de los componentes de la Fase Móvil).
- 5.8 Jeringa Hamilton de 500 µL.
- 5.9 Centrífuga HERMLE Z300K
- 5.10 Turbo Vap
- 5.11 Jeringas de 1 mL desechables
- 5.12 Jeringas de 10 mL desechables
- 5.13 Filtros Millipore 13 mm de diámetro, desechables.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

- 5.14 Vortex
- 5.15 Viales de 4 mL silanizados con tapa rosca de polipropileno con septum de goma, Waters.
- 5.16 Tubos ámbar de 40 mL con tapa rosca de polipropileno con septa de goma (2.5 cm diámetro).
- 5.17 Tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 50 mL con tapa.
- 5.18 Micropipeta electrónica 50-1000  $\mu$ L.
- 5.19 Micropipeta electrónica 20-300  $\mu$ L.
- 5.20 Procesador de alimentos MiniPrimer Braum 400w.
- 5.21 Baño regulado con agitación GFL 1092

### 6 REACTIVOS

- 6.1 Tetraciclina Sigma, estándar control Lote 092K1607
- 6.2 Tetraciclina Riedel de Haën, estándar calibración Lote 3301X
- 6.3 Oxitetraciclina Sigma Lote, estándar control 111K1540
- 6.4 Oxitetraciclina Riedel de Haën, estándar calibración Lote 3174X
- 6.5 Clortetraciclina Sigma, estándar control Lote 073K1208
- 6.6 Clortetraciclina Riedel de Haën, estándar calibración Lote 3027X
- 6.7 Doxiciclina Sigma Lote 062K1572
- 6.8 Acido Cítrico monohidratado P.A. Merck
- 6.9 Acido Oxálico dihidratado P.A. Merck
- 6.10 Fosfato bibásico de Sodio P.A. Merck
- 6.11 Tritriplex III (EDTA) P.A. Merck
- 6.12 Acetonitrilo grado gradiente para cromatografía líquida Merck (ACN)
- 6.13 Metanol grado gradiente para cromatografía líquida Merck (MeOH)

### 7 PROCEDIMIENTO

#### 7.1 PREPARACION DE SOLUCIONES DE ESTANDARES CONCENTRADOS

La preparación de los estándares de calibración y control se realiza en forma gravimétrica, a partir de los sólidos correspondientes, considerando la presentación de los mismos para el cálculo de la concentración (es decir, si presenta como antibiótico neutro o como sal).

En una navecilla de aluminio de masa conocida se pesa la cantidad aproximada del sólido para obtener una concentración final de 100 ppm. La navecilla completa se transfiere al matraz de vidrio, previamente pesado (vacío), y se afora con metanol. El matraz con la solución se pesa nuevamente. Los cálculos de concentración se realizan por diferencia de pesada.

#### 7.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES INTERMEDIAS MULTIESTÁNDAR

Para la preparación de estándares de calibración es necesario preparar diluciones intermedias a partir de los estándares concentrados preparados como se describe en 7.1. Las soluciones intermedias se preparan como multiestándares, es decir, contienen todos los antibióticos a considerar en la calibración, en este caso Tetraciclina, Oxitetraciclina y Clortetraciclina.

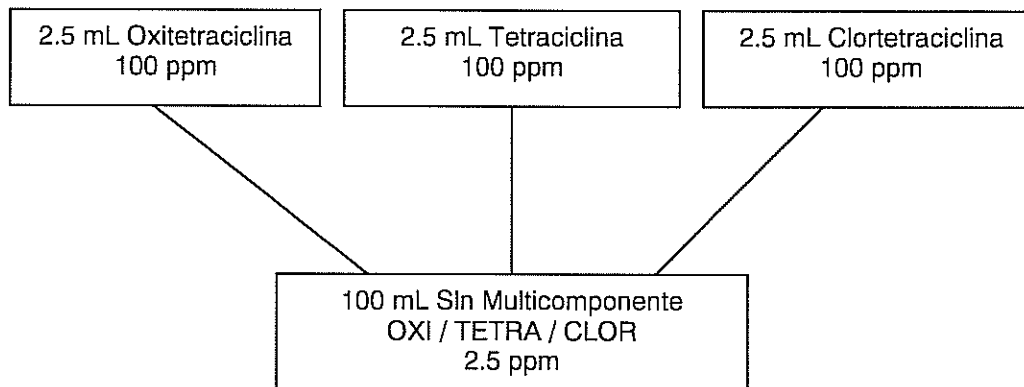
A partir de cada una de las soluciones concentradas y en función de la concentración de la solución de partida, se toma una alícuota necesaria para obtener una concentración final de 2.5 ppm y se adiciona a un matraz vacío previamente pesado. El volumen de cada antibiótico adicionado se registra por pesada. Finalmente, luego de haber agregado todos los antibióticos, se afora al volumen del matraz con ácido oxálico acuoso 0.01M, registrando la masa final.



## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 7.2.1 ESQUEMA DE PREPARACION DE SOLUCIONES INTERMEDIAS MULTIESTÁNDAR

El siguiente esquema resume la preparación de las soluciones multicomponente de calibración y control, a partir de soluciones stock de cada antibiótico. Tanto para la solución multicomponente de calibración como la de control, el procedimiento seguido fue el mismo.



### 7.3 PREPARACION DE SOLUCION INTERMEDIA DE ESTANDAR INTERNO

La preparación de la solución intermedia del estándar interno Doxiciclina se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en el punto anterior.

En un matraz aforado de masa conocida se adiciona una alícuota de la solución stock. Se registra su masa y luego se afora con ácido oxálico acuoso 0.01M registrando la masa final. La concentración de esta solución es de 2.5 ppm.

### 7.4 PREPARACION DE ESTANDARES DE PARA CURVA DE CALIBRACIÓN EN MEDIO ACUOSO

Los estándares de calibración para la curva de calibración en medio acuoso, se prepararon a partir de la adición creciente de alícuotas tomadas de la solución intermedia multicomponente de calibración.

Se adiciona un alícuota de la solución intermedia multicomponente en un vial previamente pesado y se registra su masa. Luego se adiciona una alícuota de estándar interno, se anota su masa y se adiciona ácido oxálico acuoso para completar la masa final a 1g. El rango de trabajo fue de 20 – 150 µg/Kg.

### 7.5 PREPARACION DE ESTANDARES PARA CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ

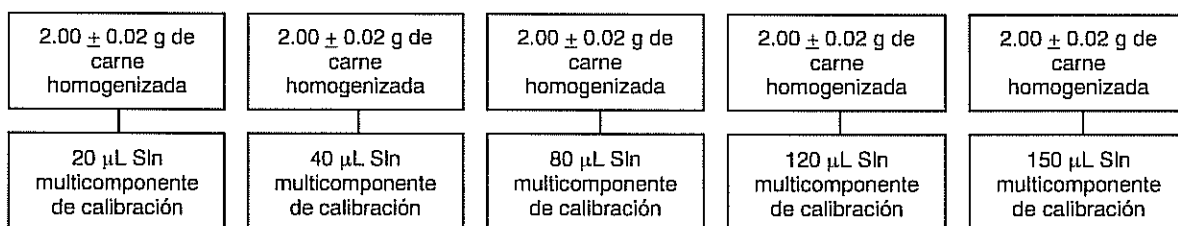
La preparación de la curva de calibración en matriz carne se realizó pesando muestras de carne previamente homogenizada, las que fueron fortificadas con alícuotas crecientes de las soluciones multicomponente de calibración. Para esto se pesó una muestra de carne en un tubo de polipropileno de masa conocida y luego se agregó una alícuota de solución multicomponente, registrándose el peso total. De esta manera se obtuvo una curva de calibración con cinco niveles de concentración dentro de un rango de 20 – 150 µg/Kg.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

Las muestras blanco se prepararon agregando a una muestra de carne una alícuota de agua de volumen equivalente de solución multicomponente de calibración adicionado en las otras muestras.

### 7.5.1 ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE CALIBRACIÓN EN CARNE

El siguiente esquema resume la preparación de las muestras fortificadas de carne de cerdo mediante la adición de alícuotas de la solución multicomponente de calibración.



### 7.6 PREPARACION DE ESTANDARES Y MUESTRAS CONTROLES PARA CUANTIFICACION MEDIANTE BRACKETING EN MATRIZ

Se prepararon seis muestras controles a sólo un nivel de concentración (100 µg/Kg), a los cuales se les agregó una alícuota equivalente de solución multicomponente control de 2.5 ppm tomada en la preparación de las muestras de calibración para el mismo nivel de fortificación.

La preparación de los estándares de bracketing se realizó bajo el mismo procedimiento antes descrito, pero sólo a dos niveles de concentración (50 y 120 µg/Kg).

### 7.7 PREPARACION DE ACIDO OXALICO 0.01 M ACUOSO

Esta solución acuosa se prepara disolviendo 1.26 g de ácido oxálico en agua. Luego se transfiere cuantitativamente a matraz aforado de 1 L y se completa el volumen hasta el aforo.

### 7.8 PREPARACION DE ACIDO OXALICO 0.01 M METANOLICO

Esta solución se prepara disolviendo 1.26 g de ácido oxálico en metanol. Luego se transfiere cuantitativamente a matraz aforado de 1 L y se completa el volumen con metanol hasta el aforo.

### 7.9 PREPARACION DE BUFFER MC ILVAINE

Pesar 21 g de ácido cítrico monohidratado y 28.4 g de fosfato de sodio bibásico, para preparar 1 L de solución 0.1 M y 1L de solución 0.2 M, respectivamente.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

Al litro de solución de ácido cítrico 0.1 M, se agregan 625 mL de la solución de fosfato. Se obtiene una mezcla de volumen final de 1625 mL a los cuales se agregan 60.5 de EDTA (Tritriplex III). Agitar hasta obtener una solución traslúcida.

El pH de esta solución debe ser 4.00. Si es necesario, ajustar el pH con HCl o NaOH.

### 7.10 PREPARACION DE METANOL AL 5% EN AGUA

Diluir 5 mL de metanol en 100 ml de agua milli-Q. Esta solución debe ser preparada cada día.

### 7.11. ACTIVACIÓN DE LAS COLUMNAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Las columnas de extracción en fase sólida deben ser activadas antes de usar, con el fin de activar los sitios de unión. Este procedimiento se realiza agregando a cada columna 7 mL de metanol, luego 7 mL de agua y finalmente 7 mL de buffer Mc Ilvaine.

### 7.12. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

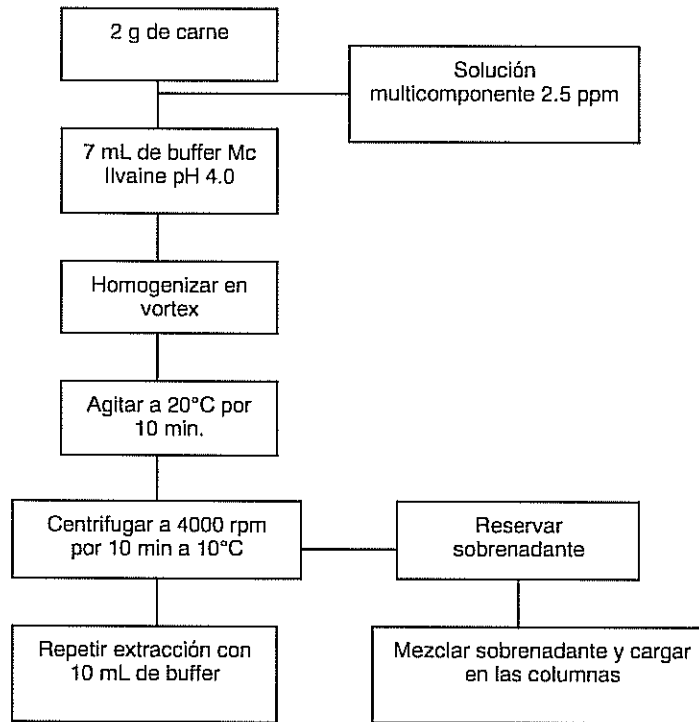
Adicionar a las muestras previamente pesadas y fortificadas 10 mL de buffer Mc Ilvaine. Agitar en vortex durante 1 minuto y luego agitar en baño termostatzado a 20°C por 10 minutos. La mezcla homogénea obtenida se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos a 10°C. Se separa el sobrenadante en otro tubo de polipropileno y se mantiene refrigerado. Se repite el procedimiento de extracción y se mezclan los extractos obtenidos. Estos extractos se cargan en las columnas de extracción en fase sólida previamente acondicionadas. Cuando se ha cargado todo el extracto, las columnas son lavadas con 10 mL de agua milli-Q y 2 mL de solución metanólica al 5%. Dejar secar las columnas aplicando vacío durante 2 minutos aproximadamente.

Las tetraciclinas son eluidas de las columnas con 3 mL de ácido oxálico 0.01 M en metanol.

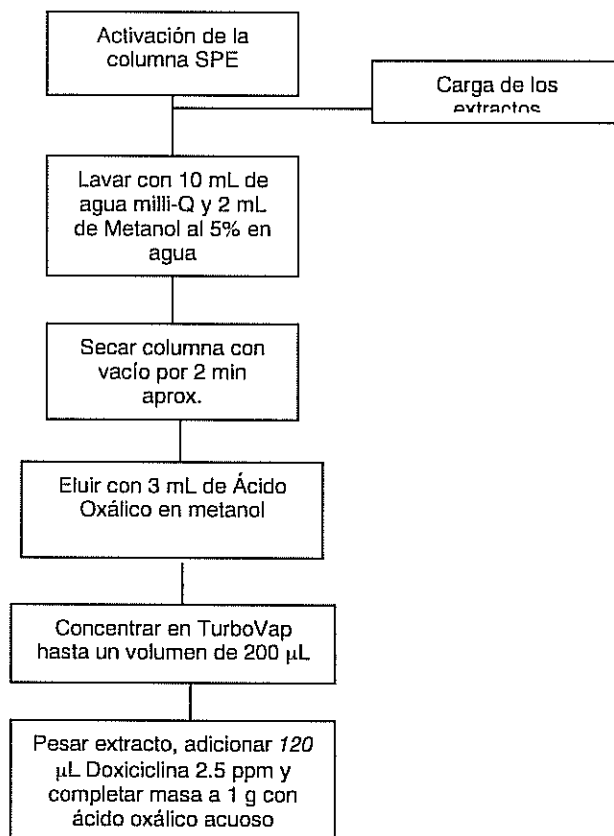
Posteriormente se reduce el volumen bajo corriente de nitrógeno en TurboVap a 35°C hasta un volumen aproximado de 200 µL. El extracto se transfiere a un vial ámbar previamente pesado y que contiene una masa conocida de estándar interno, se registra su masa y se adiciona ácido oxálico acuoso hasta completar la masa a 1 g.

Filtrar e inyectar.

7.12.1 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN



7.12.2 ESQUEMA DE PURIFICACIÓN DE LAS TETRACICLINAS EN COLUMNAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Condiciones Cromatográficas

Debido a la estructura química de las tetraciclinas la extracción y clean-up de estos antibióticos desde distintas matrices y la siguiente determinación por vía cromatografía líquida puede ser dificultosa. Existen diversas publicaciones en donde se describen los principales problemas y desafíos en el desarrollo de un método para la determinación cuantitativa de la tetraciclinas, sin embargo, la resolución de algunos de estos problemas esta basado en comprender la química asociada a estos antibióticos. Por otro lado, como todo compuesto, pueden presentar un pequeño porcentaje de impurezas, los cuales pueden ser principalmente productos de degradación propia de estos antibióticos que presentan estructuras químicas análogas.

Con estos antecedentes, las condiciones cromatográficas fueron optimizadas a través de la inyección de soluciones acuosas de las tetraciclinas y de los extractos provenientes de la matriz. Las condiciones que se consideraron en la optimización de las condiciones cromatográficas son:

- Modificación de la composición de la fase móvil (proporción de solventes).
- Cambio de algunos solventes por otros en la fase móvil.
- Cambio de flujo durante la corrida cromatográfica.
- Modificación del pH.
- Cambio de la columna cromatográfica (distinto relleno, dimensiones y tamaño de partícula).
- Modificación de las condiciones de extracción.

Las principales dificultades que se presentaron fueron la elución de las cuatro tetraciclinas con el frente de la fase móvil, el solapamiento de señales y la cantidad de metanol que contiene la muestra al ser inyectada, puesto que este solvente distorsiona la forma de los peaks.

Los parámetros cromatográficos que mostraron mejores resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla1. Condiciones cromatográficas HPLC-DAD

Parámetro	
Flujo	0.8 – 1.1 mL/min
Fase móvil	Ácido Oxálico acuoso 0.01 M / ACN (gradiente)
Temperatura de la columna	35 °C
Volumen de inyección (Loop)	200 µL
Columna	C <sub>8</sub> , 150 x 3.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm
Rango espectral	210 – 450 nm, λ <sub>OBS</sub> 354 nm

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

Tabla 2. Composición de la fase móvil para el análisis en gradiente de las tetraciclinas

Tiempo, min	Flujo, mL/min	% ACN	% ácido oxálico 0.01 M	Curva gradiente
0	0.8	10	90	-
7	0.8	30	70	6
8	1.1	30	70	6
10	1.1	30	70	6
12	0.8	10	90	6
20	0.8	10	90	6

Con estas condiciones cromatográficas se obtuvieron cromatogramas como el que se muestra en la Figura 2. En esta figura se observan los peaks correspondientes a cada una de las cuatro tetraciclinas, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Clortetraciclina y Doxiciclina, presentando peaks definidos y separados. Como es sabido, el tiempo de retención es uno de los principales parámetros para la asignación de señales, sin embargo, en este estudio la asignación se realizó a través de la comparación de los espectros de absorción de cada peak con el asignado a una determinada tetraciclina (Figura 3), tomando como referencia los tiempos de retención y la adición de alícuotas sucesivas de estándar a una misma muestra observando el crecimiento de la señal.

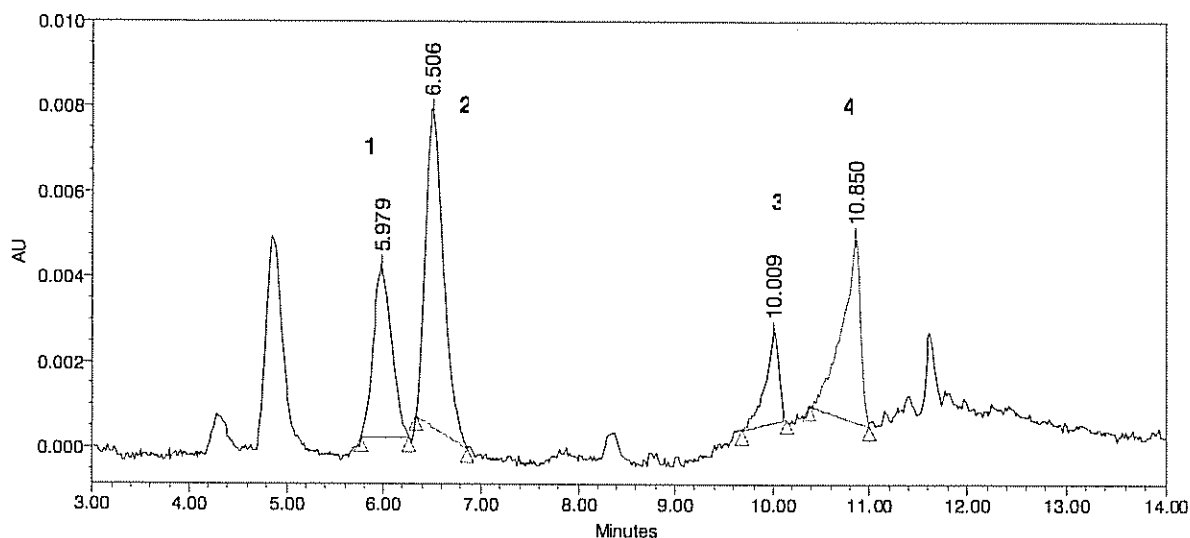


Figura 2. Cromatograma obtenido para nivel de fortificación de 100 ng/g en matriz. (1) Oxitetraciclina, (2) Tetraciclina, (3) Clortetraciclina, (4) Doxiciclina.

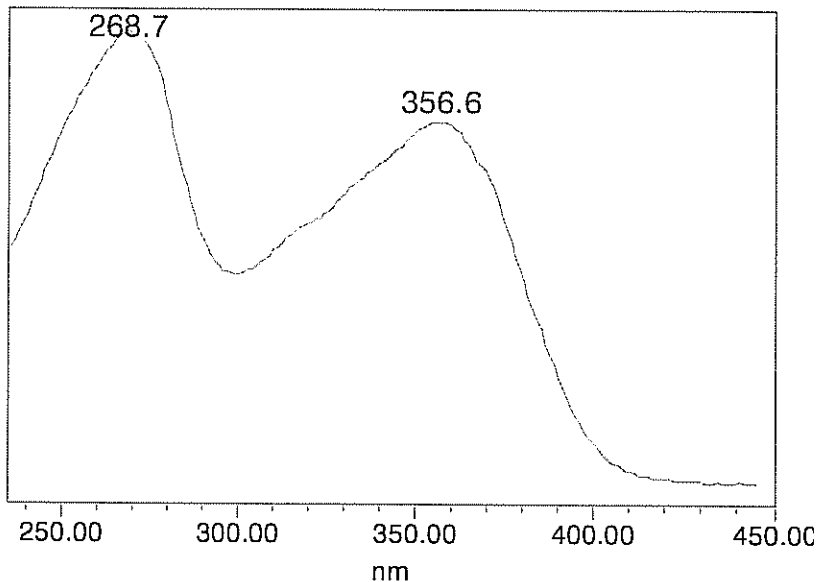


Figura 3. Espectro de absorción de Tetraciclina bajo condiciones finales de elución.

## 8.2 CURVA DE CALIBRACIÓN. RANGO LINEAL

Las siguientes figuras muestran las curvas de calibración obtenidas para cada tetraciclina en donde se observa el rango lineal de respuesta del detector para cada analito validado. Cada gráfico representa la relación entre la razón de la concentración entre analito y el estándar interno (RC) y la razón de las áreas de respuesta del analito y el estándar interno (RA).

### 8.2.1 Tetraciclina

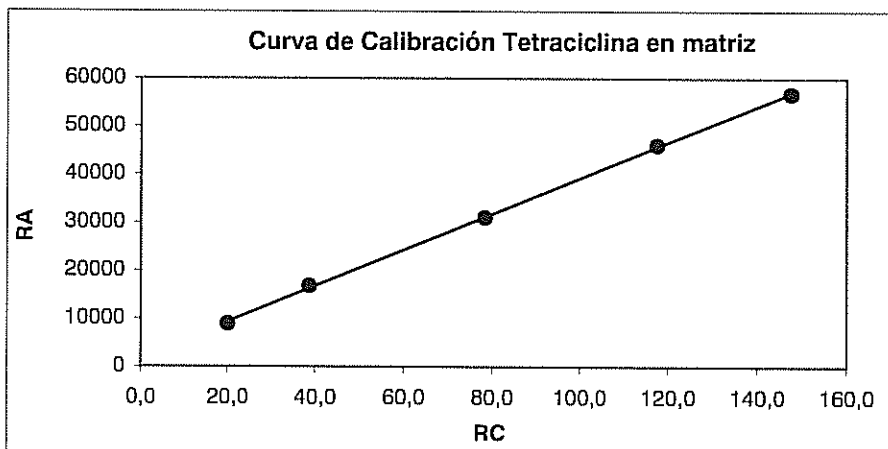


Figura 4. Curva de calibración de Tetraciclina en carne de cerdo.



**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

El rango de concentración que comprende esta figura es 20 - 150 ng/g. La ecuación de regresión lineal para esta gráfica es la siguiente:

$$RA = 0.0210 + 0.6876 RC$$

$$R^2 = 0.9957$$

**8.2.2 Oxitetraciclina**

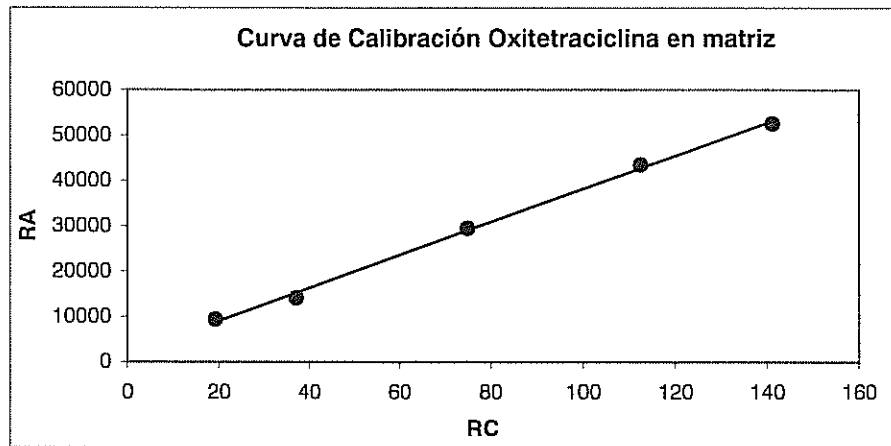


Figura 5. Curva de calibración de Oxitetraciclina en carne de cerdo.

El rango de concentración que comprende esta figura es 20 - 150 ng/g. La ecuación de regresión lineal para esta gráfica es la siguiente:

$$RA = 0.0225 + 0.6676 RC$$

$$R^2 = 0.9924$$

**8.2.3 Clortetraciclina**

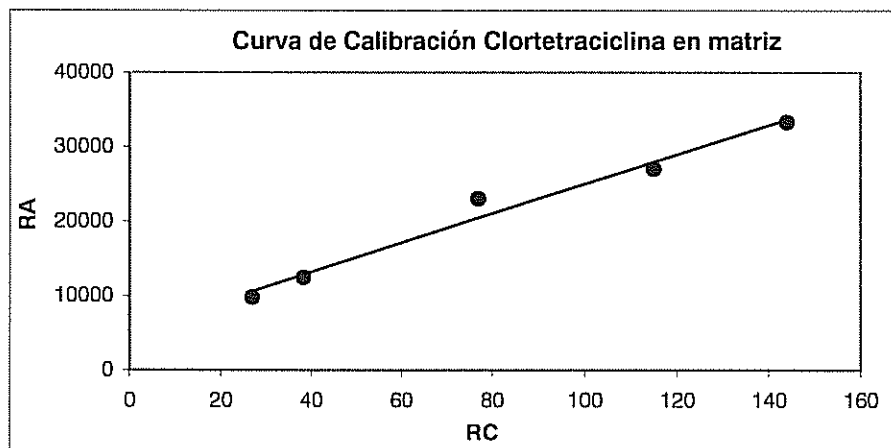


Figura 6. Curva de calibración de Clortetraciclina en carne de cerdo.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

El rango de concentración que comprende esta figura es 27 - 150 ng/g. La ecuación de regresión lineal para esta gráfica es la siguiente:

$$RA = 0.0793 + 0.3632 RC$$

$$R^2 = 0.9915$$

Como se puede observar, para los tres analitos el rango de concentración elegido representa un buen rango de trabajo. La concentración de Límite máximo de residuo permitido (100 µg/kg) esta en medio del rango lineal de la curva de calibración, lo que permite realizar la cuantificación de muestras controles a través de bracketing.

### 8.3 CUANTIFICACION DE TETRACICLINAS EN MUESTRAS CONTROL MEDIANTE BRACKETING

Para cuantificar cada una de las tetraciclinas en las muestras fortificadas, se utilizó el método de bracketing, en donde se inyecta el extracto proveniente de una muestra fortificada con las soluciones de estándares de calibración, llamadas estándar bajo y estándar alto y, los valores de concentración de estos estándares corresponden a los calculados por preparación.

Tabla 3. Resultados del análisis de las 6 muestras de carne fortificadas.

	$C_{Prep}$ (ng/g)	$C_{obs}$ (ng/g)	CV (%)	Recuperación (%)
Tetraciclina	70.4	70.2	10.5	100
Oxitetraciclina	76.5	68.4	8.8	89
Clortetraciclina	70.2	72.4	12.8	103

Estos valores representan la obtención de resultados satisfactorios que indican un óptimo procedimiento de extracción y de las condiciones cromatográficas. Por otra parte, se evaluó la recuperación de los antibióticos relacionando la concentración obtenida a través de la cuantificación por bracketing y la de preparación. Esto porque al no contar con materiales de referencia certificados de estos antibióticos en esta matriz, las guías internacionales sobre la validación de métodos analíticos recomiendan la evaluación de la recuperación, puesto que es un buen indicativo de la eficiencia del proceso completo de extracción. Los valores de recuperación obtenidos son satisfactorios y la evaluación de los datos a través de test estadísticos indican que estos no son significativamente diferente del 100 %.

#### 8.3.1 Evaluación de la Recuperación

Para estudiar el efecto de la matriz en la medición, y la eficiencia del proceso de extracción de los antibióticos en la carne de cerdo, mediante extracción en fase sólida, se prepararon muestras con adición de los antibióticos considerados en este estudio.

La recuperación promedio obtenida (R) estará dada por:

$$R = \frac{C_{obs}}{C_{Prep}} \times 100$$

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

Donde,  $C_{obs}$  es la concentración promedio observada en las muestras con adición de tetraciclinas, y  $C_{Prep}$  es la concentración de antibiótico agregada a las muestras medidas. Se debe evaluar si el R obtenido es diferente de 1. Para ello se hace la siguiente prueba en la cual se comparan los valores de t calculado (t) respecto a un t crítico ( $t_c$ ). Los valores de cada uno de ellos esta dado por:

$$t = \left[ \frac{(R - 1)}{u_R} \right]$$

$$t_c = t_{\text{tabla}(n-1;0.95)}$$

Si  $t < t_c$  no hay evidencia de que R sea diferente de 1.

La tabla 4 resume los resultados del test de evaluación de la recuperación.

Tabla 4. Resultados de la evaluación de recuperación.

	t	$t_c$	Decisión
Tetraciclina	2.21	2.78	No se corrige
Oxitetraciclina	0.61	2.57	No se corrige
Clortetraciclina	0.22	2.57	No se corrige

Los valores de recuperación obtenidos son satisfactorios y la evaluación de los datos a través de test estadísticos indican que estos no son significativamente diferente del 100 %.

### 8.3.1 Evaluación de la Precisión

La precisión de las determinaciones se evalúa mediante la prueba de  $\chi^2$ . Se evalúa un parámetro calculado versus un valor crítico. Los valores de cada uno de ellos están dado por:

$$\chi^2 = \left( \frac{S_w}{\sigma_w} \right)^2$$

$$\chi_{\text{tabla}}^2 = \left( \frac{\chi_{n-1;0.95}^2}{n-1} \right)$$

Donde,  $S_w$  es la desviación estándar intralaboratorio en condiciones de repetibilidad,  $\sigma_w$  es el valor requerido de desviación estándar intralaboratorio,  $\chi_{(n-1); 0.95}^2$  es el valor obtenido de tabla para el número de grados de libertad correspondientes. Si  $\chi_c^2 < \chi_{\text{tabla}}^2$  no hay evidencia de que el método no tiene la precisión requerida.

Dado que no hay datos de desviación estándar requerida para las mediciones de tetraciclinas en cerdo, se adopta como valor de desviación estándar requerida, un 7%, considerando la información que existe en bibliografía.

La precisión de la determinaciones provenientes de la cuantificación de las muestras fortificadas mediante bracketing, se evaluó bajo condiciones de repetibilidad. Según valores obtenidos de la

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

bibliografía el valor de  $\sigma_{Req}$  es de 7% y con este valor se tiene que  $\chi_{Tabla}$  es 11.07. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4, los que indican que el método desarrollado y validado cuenta con una buena precisión y cumple con los requerimientos para este tipo de análisis.

Tabla 4. Resultados de la evaluación de la precisión.

	$\sigma_{obs}$	$\chi_{Calc}$
Tetraciclina	7.34	5.50
Oxitetraciclina	6.03	3.72
Clortetraciclina	9.24	8.71

**8.3.2 Cálculo de la Incertidumbre**

El cálculo de la incertidumbre del proceso de cuantificación cuando se usan razones de áreas, se explica a continuación. RC corresponde la razón de concentración entre el analito y el estándar interno y RA corresponde la razón de área de los peaks respectivos, por lo tanto, la incertidumbre asociada esta dada por la combinación de las incertidumbres de cada una de esas concentraciones, basándose en la ley de propagación de errores.

De esta manera, la incertidumbre de RC se calcula como:

$$u\left(\frac{C_{std.bajo}}{C_{SI}}\right) = \frac{C_{std.bajo}}{C_{SI}} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_{std.bajo}}}{C_{std.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C_{SI}}}{C_{SI}}\right)^2}$$

Por otro lado, para calcular las incertidumbres en los valores de RA, se calcula primero la razón área del antibiótico/ área de STD interno para cada lectura. Luego, las incertidumbres de las razones de áreas se calculan como la desviación estándar del promedio de las razones obtenidas en cada caso, dividido por la raíz de n, siendo n el número de lecturas respectivas.

De esta manera el cálculo de incertidumbre de la concentración de la muestra se calcula a partir de la ley de propagación de errores en donde se combina la incertidumbre estándar de la razón de concentración de la muestra con la razón del estándar interno con la incertidumbre estándar de la concentración del estándar interno.

Entonces, el cálculo final de la incertidumbre de la concentración de la muestra es:

$$u(C_{mta}) = \sqrt{\left(\frac{u_{RA-mta}}{RA_{mta}}\right)^2 + \left(\frac{u_{RA-s.bajo}}{RA_{s.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{RA-s.alto}}{RA_{s.alto}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-s.bajo}}{C_{s.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-s.alto}}{C_{s.alto}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI-s.bajo}}{C_{SI-s.bajo}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI-s.alto}}{C_{SI-s.alto}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C-SI-mta}}{C_{SI-mta}}\right)^2}$$

La incertidumbre relativa reportada en distintas publicaciones para la determinación de tetraciclinas en distintas matrices es del orden de 15 – 20 %. Los valores de incertidumbre obtenidos durante el desarrollo de este método a partir de la Planilla de Kragten se muestran en la tabla 5.

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

Tabla 5. Valores de incertidumbre asociada a la determinación de tetraciclinas en matriz.

	<b>C<sub>obs</sub> (ng/g)</b>	<b>U (ng/g)</b>	<b>RU (%)</b>
Tetraciclina	70.2	8.3	11.7
Oxitetraciclina	68.4	13.4	19.4
Clortetraciclina	72.4	28.1	38.6

Si bien la Tetraciclina y la Oxitetraciclina presentan valores de incertidumbre relativa que están dentro del rango que se reporta en la bibliografía, los resultados de la Clortetraciclina no satisface los requerimientos establecidos a pesar de presentar una buena recuperación y precisión. Para identificar de manera mas clara cuales son las principales fuentes que contribuyen el valor de incertidumbre, se graficó la contribución de cada factor considerado en la cuantificación de cada una de las tetraciclinas. La Figura 7 muestra el aporte de cada factor en el valor de incertidumbre de la Clortetraciclina.

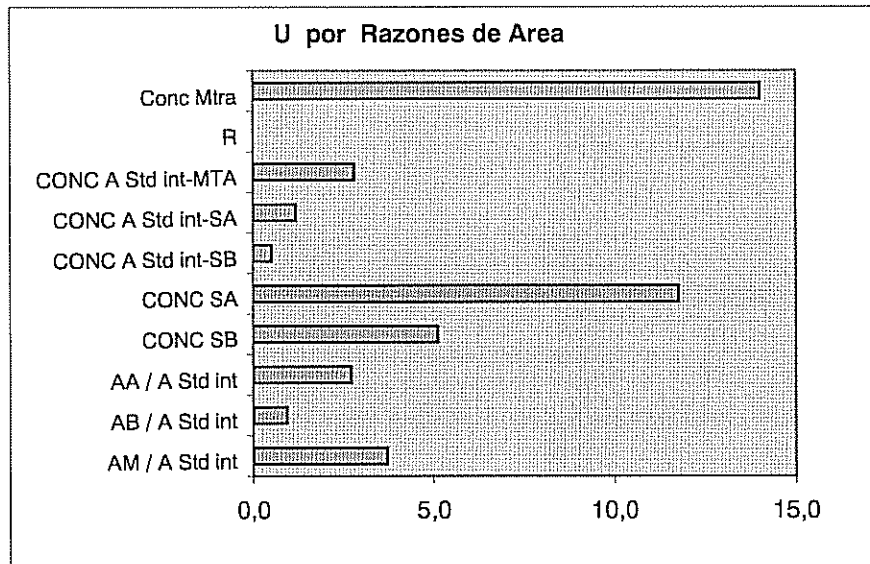


Figura 7. Aporte de cada factor en el valor de incertidumbre de la Clortetraciclina.

Esta figura representa la tendencia observada en las tres tetraciclinas, en donde claramente la mayor fuente de incertidumbre está relacionada a la incertidumbre en la concentración del estándar. Por lo tanto, disminuir esta variable depende de la elección de un estándar que presente menor incertidumbre en su concentración. Sin embargo, debido a los buenos resultados obtenidos en el desarrollo y validación de este método, se debería esperar una incertidumbre relativa en la concentración de las muestras cercanas al coeficiente de variación proveniente de los valores obtenidos.

### 8.3.3 Evaluación del sesgo

La estimación del sesgo ( $\Delta$ ) se evaluó considerando la diferencia entre el valor absoluto de concentración promedio observada y la concentración calculada de la preparación, es decir,

$$\Delta = \left| \bar{x} - x_o \right|$$

Donde:

$\bar{x}$  = valor promedio de las "n" mediciones

$x_o$  = valor calculado por preparación

$$\Delta c = t_{0.975} \times \frac{s}{\sqrt{n}} + U$$

El valor crítico ( $\Delta c$ ) para probar sesgo se define como:

Donde:

$t_{(0.975)}$  : valor de la tabla "t" para n-1 grados de libertad

s : desviación estándar de las medidas

n : número de replicados

U : incertidumbre de la concentración en la preparación

El criterio de decisión para la aceptación de la hipótesis nula a un nivel de significación ( $\Delta$ ) dado, esta dado por;

$$|\Delta| < \Delta c$$

Entonces se acepta la hipótesis nula de "no sesgo"

Los resultados obtenidos de la prueba de sesgo se presentan en la tabla 6, para lo cual se tomó como control de lectura 6 muestras independientes preparadas en fase móvil cuantificadas mediante bracketing, como una medida de evaluar el sesgo instrumental, debido a que no se trabajó con material de referencia certificado.

Al calcular los valores se determina que el método es no sesgado para los tres antibióticos, Tetraciclina, Oxitetraciclina y Clortetraciclina.

Tabla 6. Resultados de la evaluación del sesgo en muestras acuosas de control.

	$C_{OBS}$ (ng/g)	CV (%)	$C_{prep}$ (ng/g)	U	$\Delta$	$\Delta c$	Resultado
Tetraciclina	160.2	5.6	142.9	8.6	17.34	18.04	Acepto
Oxitetraciclina	150.9	4.3	154.7	7.1	3.72	13.83	Acepto
Clortetraciclina	152.9	13.8	142.4	18	10.51	40.11	Acepto

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 9. CONCLUSIONES

El método descrito en este informe representa un importante mejoramiento de las condiciones previamente reportadas para la determinación de 3 tetraciclinas en carne de cerdo. Se ha desarrollado un método rápido y eficiente para la determinación simultánea de Tetraciclina, Oxitetraciclina y Clortetraciclina.

A pesar de que el método es menos sensible para la Clortetraciclina (según los resultados observados en la curva de calibración) este método presenta resultados satisfactorios en términos de recuperación, precisión, sesgo e incertidumbre con valores que son del orden a los reportados previamente en la bibliografía.

La cuantificación mediante bracketing resulta ser adecuada para la determinación de la concentración de estas tetraciclinas en carne de cerdo.

El método propuesto puede ser adoptado como método de análisis rutinario con un procedimiento que puede realizarse en un día. Sin embargo, es importante considerar que antes de implementar el método de análisis en cualquier laboratorio se debe ser prudente en la modificación de cualquiera de las condiciones. Esto porque para esta familia de antibióticos afectan factores tan importantes como: las propiedades y posición de grupos funcionales, las constante de disociación ácida, estados iónicos (controlado por pH), la naturaleza del solvente y de la columna cromatográfica, la presencia de metales quelantes, etc.

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE SULFONAMIDAS EN CARNE DE CERDO POR HPLC CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS.**



# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## INDICE

1.	Objetivos .....	3
2.	Alcance .....	3
3.	Referencias .....	3
4.	Descripción del Método Estudiado.....	4
4.1	Antecedentes .....	4
4.2	Principio.....	5
5.	Equipamiento .....	6
6.	Reactivos.....	6
7.	Procedimiento .....	7
7.1	Buffer fosfato 0,05M pH 4,5 .....	7
7.2	Preparación de soluciones stock .....	7
7.3	Preparación de Solución Multiestándar intermedia .....	8
7.4	Preparación de la Solución Intermedia del Estándar Interno .....	8
7.5	Preparación Estándares para la curva de Calibración en Matriz .....	8
7.6	Procedimiento de Extracción.....	9
8.	Optimización de las Condiciones Cromatográficas.....	12
9.	Optimización de las Condiciones de Extracción desde la Matriz .....	15
10.	Resultados .....	17
10.1	Curva de Calibración. Rango Lineal.....	17
11	Conclusiones.....	22

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 1. OBJETIVO

Validar un método analítico para la determinación de seis Sulfonamidas: Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaquinoxalina y Sulfadimetoxina en carne de cerdo a través de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con Detector con Arreglo de Diodos.

### 2. ALCANCE

Este trabajo permitirá establecer las condiciones experimentales óptimas para la cuantificación de Sulfonamidas en carne de cerdo en un rango de concentración de hasta 200ng/g utilizando HPLC con detector de arreglo de diodos.

### 3. REFERENCIAS

- 3.1 Council Regulation n° 2377/90. Updated up to 12.10.2005.
- 3.2 Commission Decision del 14 de Agosto del 2002. (2002/657/EC)
- 3.3 J. Kragten, (1994) "Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique", *Analyst*, **119** (10), 2161-2165.
- 3.4 Austin, R.L., Hsieh, L., Malbrough, M., Short, C., Barker, S. (1990) "Multiresidue Method for the Determination of Sulfonamides in Pork Tissue". *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 423-426.
- 3.5 European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA/MRL/026/95). Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products. Sulfonamides Summary Reports 1, 2, 3.
- 3.6 Kim, D., Choi, J., Kim, J., Woon Lee, D. (2002) "Determination of Sulfonamides in Meat by Liquid Chromatography Coupled with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry". *Bull Korean Chem. Soc.*, **23**, 1590-1594.
- 3.7 Kunihiro, K., Furusawa, N., (2001) "Matriz Solid-phase Dispersion Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Determination of Residual Sulfonamides in Chicken" *J. of Chromatography A*, **937**, 49-55.
- 3.8 Stoev, G., Michailova, A., (2000) "Quantitative Determination of Sulphonamide Residues in Foods of Animal Origin by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection" *J of Chromatography A*, **871**, 37-42.
- 3.9 Shao, B., Dong, D., Wu, Y., Meng, J., Tu, X., Xu, S., (2005) "Simultaneous Determination of 17 Sulfonamide Residues in Porcine Meat, Kidney and Liver by Solid-phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry" *Analytica Chimica Acta*, **546**, 174-181.
- 3.10 Guo-Zhen, F., Jing-Xing, H., Shuo, W., (2006) "Multiwalled Carbon Nanotubes as Sorbent for On-line Coupling of Solid-phase Extraction to High-performance Liquid Chromatography for Simultaneous Determination of 10 Sulfonamides in Eggs and Pork" *J. of Chromatography A*, **1127**, 12-17.
- 3.11 Hela, W., Brandtner, M., Widek, R., Schuh, R., "Determination of Sulfonamides in animal tissue using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection" *Food Chemistry*, **83**, 601-608.

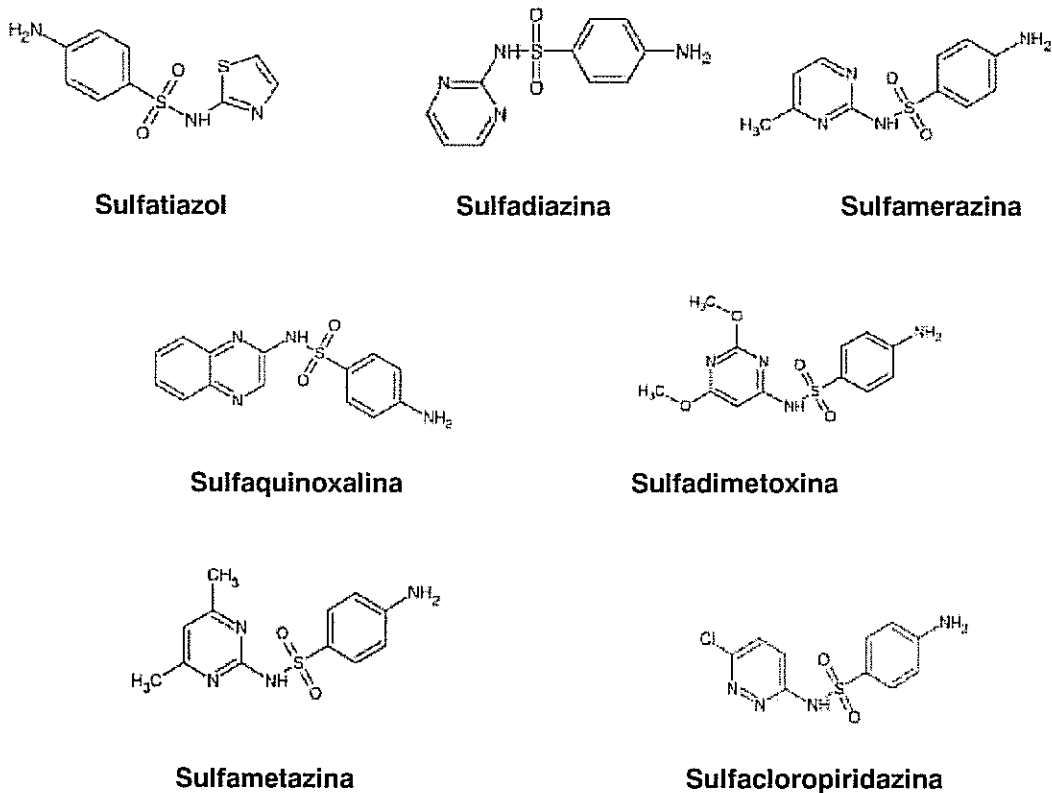
# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## 4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ESTUDIADO

### 4.1 Antecedentes

Las Sulfonamidas (Figura 1) son un grupo importante de antibióticos sintéticos que han sido utilizados tanto en terapia veterinaria y humana, son altamente activos contra un amplio rango de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo. Las Sulfonamidas inhiben la multiplicación bacteriana actuando como inhibidores competitivos del ácido p-aminobenzoico en el ciclo metabólico del ácido fólico.

Figura 1. Estructura de algunas sulfonamidas.



Estas drogas han sido ampliamente introducidas en la producción de alimentos, cobrando con esto gran importancia sus residuos debido a que han sido involucrados en el desarrollo de resistencias y alergias entre otros efectos, implicando un riesgo para la salud humana. Existen reportes de bioensayos con roedores tratados con sulfametazina que desarrollaron tumores, además existe evidencia de toxicidad de las sulfonamidas en la glándula tiroide. Debido a esto, es que organismos como el FDA y la Unión Europea, a través de la Normativa Europea 2377/90 han establecidos límites máximos permitidos de 100 µg/Kg para estas sustancias presentes en alimentos de origen animal.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

Para la determinación de sulfonamidas se han sido desarrollados diversos métodos basados en cromatografía gaseosa y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) tanto con detección de fluorescencia como con detección UV.

Debido a su naturaleza polar, la extracción de las sulfonamidas desde la matriz presenta algunas complicaciones las cuales se ven reflejadas tanto en la presencia de interferentes como en las bajas recuperaciones obtenidas. Para la extracción de estos analitos desde la matriz se han reportado diferentes procedimientos los cuales varían principalmente en el extractante usado. El tratamiento de la muestra incluye generalmente pasos de extracción con solventes orgánicos de polaridad mediana, ó mezclas orgánicas-acuosas ácidas seguidas por varias extracciones líquido-líquido o líquido-sólido.

En este informe se presenta la puesta a punto de un adecuado método cromatográfico de cuantificación de sulfonamidas en matriz músculo de cerdo, optimizando tanto las condiciones cromatográficas como la extracción de la matriz para su detección dentro de los rangos de concentraciones máximas permitidas, utilizando como estándar interno sulfacloropiridazina.

### 4.2. Principio

El método de cuantificación para la determinación de Sulfonamidas: Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaquinoxalina y Sulfadimetoxina en músculo de cerdo presentado fue realizado utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplado a un detector de arreglo de diodos. Como toda técnica cromatográfica, la separación de los analitos se basa en el reparto de cada analito en la fase estacionaria (sólido químicamente activo) y la competencia por un mismo sitio con la fase móvil (solvente con gran afinidad a la fase estacionaria). La afinidad de cada analito con la fase estacionaria, dada por su constante de reparto, permite la separación de los componentes de una muestra los cuales son posteriormente detectados y cuantificados. La tecnología del detector de arreglo de diodos permite el monitoreo continuo del espectro de absorción del eluato proveniente de la columna. De esta manera se obtiene el espectro completo de la elución de un peak, lo que ayuda a la identificación y cuantificación de un determinado componente.

El procedimiento involucrado en la extracción de las sulfonamidas desde carne de cerdo utiliza acetato de etilo como extractante. La purificación es realizada mediante extracción líquido-sólido utilizando columnas de fase reversa (C-18) eluyendo a los analitos con mezcla metanol/diclorometano para posteriormente de una evaporación y dilución en buffer pH 4,5, realizando los análisis en cromatografía líquida con fase móvil en gradiente y registrando las señales entre los 200nm y 400nm.

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 5. EQUIPAMIENTO

- 5.1 Equipo de HPLC compuesto por: Bomba cuaternaria Waters 6010 E, calefactor de columna, sistema de adquisición de datos "Empower software" y un detector de arreglo de diodos. El estudio se realizó con una columna Waters X-Terra RP-18 de tamaño de partículas de 3,5 $\mu$ m y dimensiones 250 x 4,6 mm y una precolumna de la misma marca. Se inyectaron las muestras manualmente en un loop de 200  $\mu$ L.
- 5.2 Viales ambar de 4 mL Restek con tapa rosca de ptf/silicona, marca Restek.
- 5.3 Vortex
- 5.4 Turbovap
- 5.5 Balanza Sartorius MC 210P.
- 5.6 Sistema de vacío multicolumna "Manifold".
- 5.7 Columnas SPE C-18 Waters Oasis HLB 6cc (0,2g) Extraction Cartridges.
- 5.8 Jeringa Hamilton de 500  $\mu$ L.
- 5.9 Gas Helio.
- 5.10 Material de vidrio clase A
- 5.11 Micropipetas electrónica de 50-1000
- 5.12 Micropipeta electrónica de 20-300  $\mu$ L.
- 5.13 Centrifuga HERMLE Z300K.
- 5.14 Filtros Millipore 13 mm de diámetro, desechables.
- 5.15 Procesador de alimentos Braun Multiquick.
- 5.16 Baño Termorregulado con agitación GFL1092.

### 6. REACTIVOS

- 6.1 Acetonitrilo, Lichrosolv, uso HPLC, Merck.
- 6.2 Metanol, Lichrosolv, uso HPLC, Merck.
- 6.3 Fosfato de sodio monobásico, p.a, Merck.
- 6.4 Hidróxido de sodio, p.a., Merck.
- 6.5 Diclorometano, Merck.
- 6.6 Acido Clorhídrico p.a Merck.
- 6.7 Hidróxido de sodio, p.a, Merck.
- 6.8 Sulfatiazol Vetranal.
- 6.9 Sulfatiazol Sigma.
- 6.10 Sulfadiazina Vetranal.
- 6.11 Sulfadiazina Sigma.
- 6.12 Sulfamerazina Vetranal.
- 6.13 Sulfamerazina Sigma.
- 6.14 Sulfadimetoxina Vetranal.
- 6.15 Sulfadimetoxina Sigma.
- 6.16 Sulfametazina Vetranal.
- 6.17 Sulfametazina Sigma.
- 6.18 Sulfaquinoxalina Vetranal.
- 6.19 Sulfaquinoxalina Sigma.
- 6.20 Sulfaclorpiridazina Vetranal.

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**7. PROCEDIMIENTO**

**7.1 Buffer Fosfato 0,05M pH 4.5**

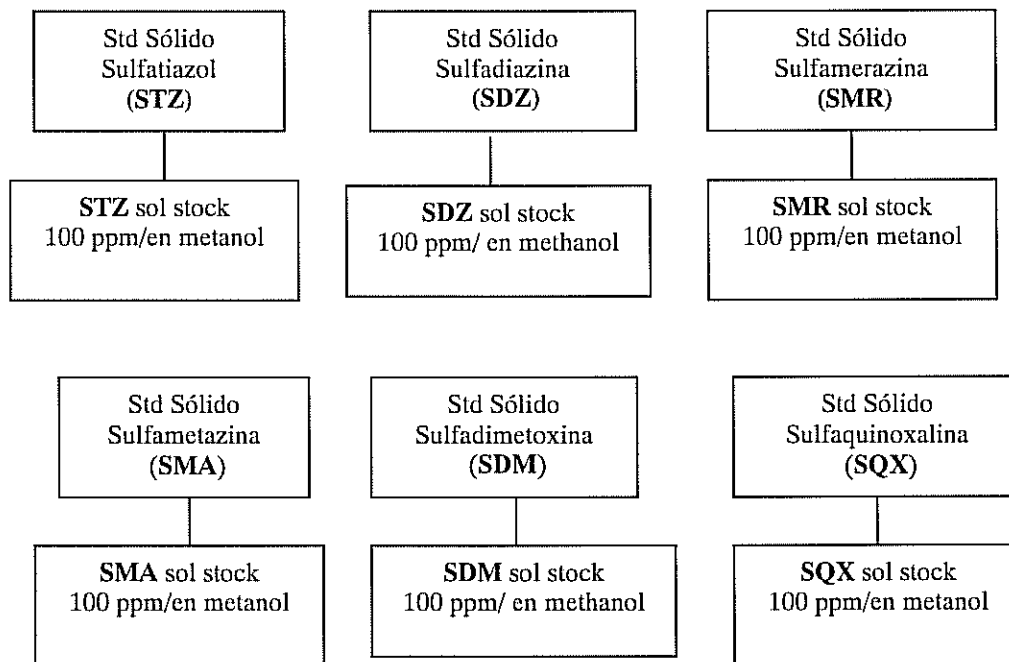
Disolver en agua 6,0 g de fosfato de sodio monobásico. Diluir hasta 1000 mL.

**7.2 Preparación de Soluciones de Stock de Calibración y Control**

La preparación de estándares de calibración, estándar interno, controles se llevó a cabo mediante técnica gravimétrica. Todas las soluciones preparadas fueron mantenidas en viales ámbar a temperaturas de aproximadamente 4 °C.

Todos los reactivos de calibración fueron preparados a partir de la sal de alta pureza correspondiente (Fluka). Los controles fueron preparados a partir de los compuestos sólidos de menor pureza (AppliChem y Sigma). Se pesó 10 mg de la sulfonamida correspondiente y se disolvió en 100 mL de metanol (6.2). En el esquema 7.4.1 se muestra el diagrama de preparación de las soluciones concentradas.

**7.2.1 Esquema de Preparación Soluciones Stock de Calibración y de Control.**

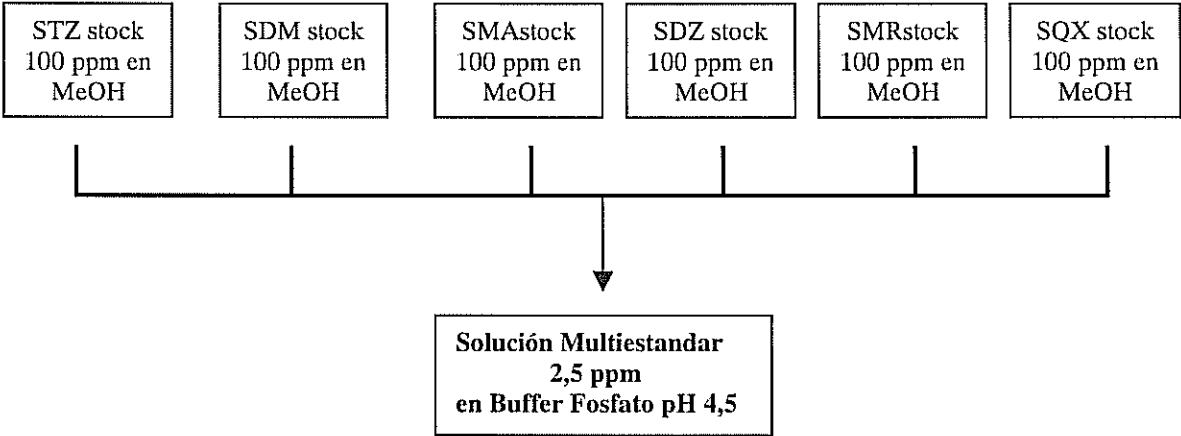


# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## 7.3 Preparación de Soluciones Intermedias Multiestándar

Se pesa una alícuota de 2,5mL de cada una de las sulfonamidas stock en un matraz de 100mL. Luego se afora la solución con buffer fosfato pH 4,5 (7.1), para obtener una solución multiestándar de 2,5ppm. Tanto para la solución multicomponente de calibración como control, el procedimiento seguido es el que se muestra en el esquema 7.3.1.

### 7.3.1 Esquema de preparación de una solución multiestándar de sulfonamidas a 2,5 ppm.



## 7.4 Preparación de Solución Intermedia de Estándar Interno.

La preparación de la solución intermedia del estándar interno Sulfaclopiridazina se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en el punto anterior.

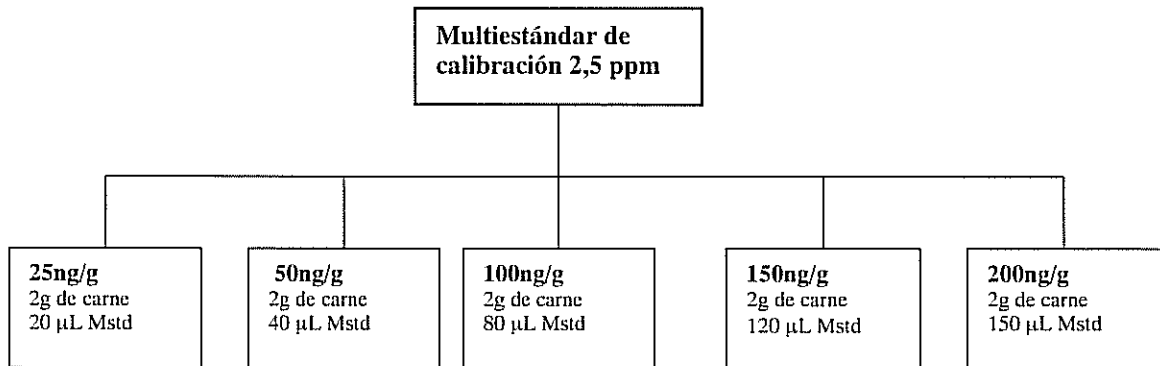
En un matraz aforado de masa conocida se adiciona una alícuota de la solución stock. Se registra su masa y luego se afora con la solución buffer fosfato pH 4,5 (7.1) registrándose la masa final. La concentración de esta solución es de aproximadamente 2ppm.

## 7.5 Preparación de Estándares para la Curva de Calibración en Matriz.

A la carne adquirida comercialmente se le quita la grasa y el tejido conectivo para ser luego picada en cubos y molida utilizando un procesador de alimentos hasta obtener una pasta homogénea. Se pesaron  $2 \pm 0,01g$  y se fortificó el homogenizado de carne en 5 niveles de concentración, 25ng/g, 50ng/g, 100ng/g, 150ng/g y 200 ng/g adicionando distintas alícuotas de la solución multiestándar de calibración. El procedimiento seguido fue registrar el peso de una cantidad aproximada de 2g de carne homogenizada, en un tubo de masa conocida. Luego se agregó una alícuota de la solución multiestándar de calibración de concentración 2,5ppm (7.2), obteniéndose un nuevo valor para el peso total de ambos. De ésta forma, se prepararon muestras fortificadas en los 5 niveles de concentración. (Esquema 7.7.1).

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 7.5.1 Esquema de preparación de los estándares de calibración en carne de cerdo.



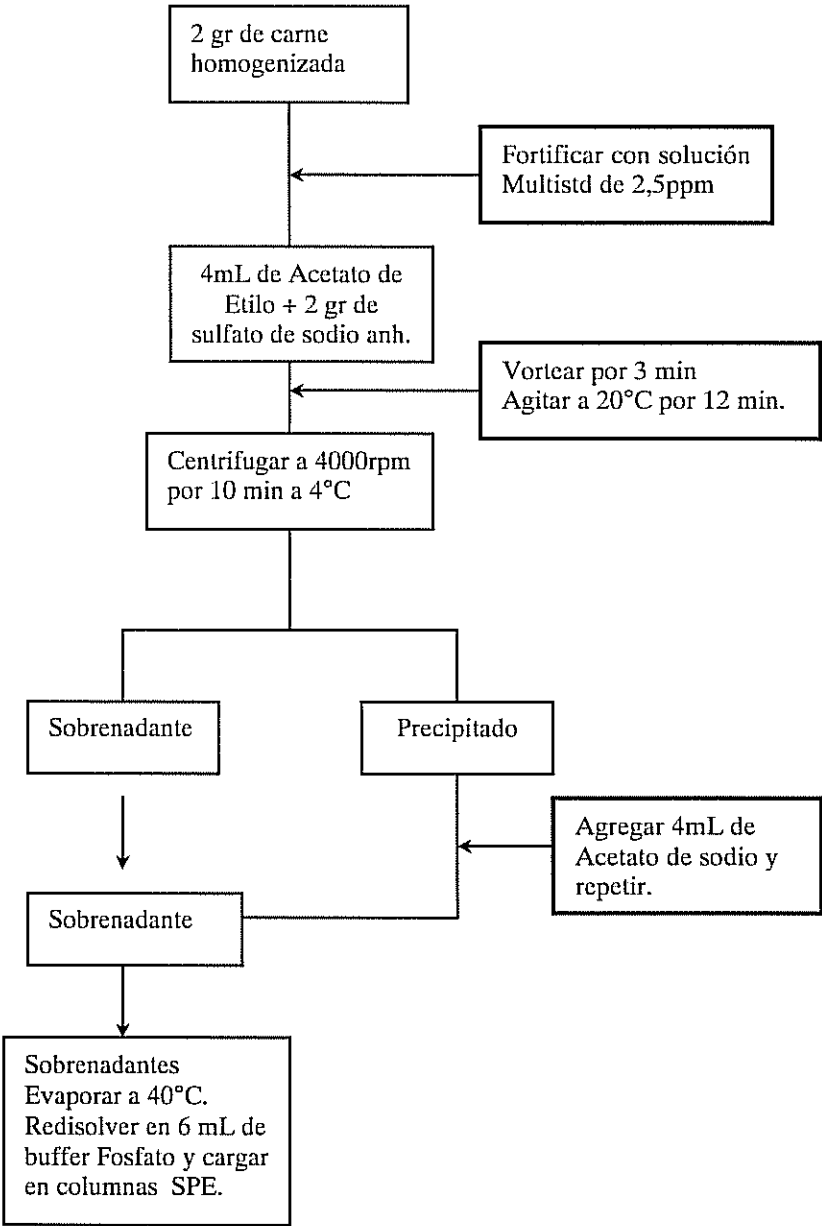
### 7.6 Procedimiento de Extracción

A los 2 grs de carne previamente fortificados, se le agregaron 4 mL de acetato de etilo y 2gr de sulfato de sodio anhidro homogenizando la mezcla en el vortex por 3 minutos. Luego, el homogenizado se colocó en un agitador orbital por 12 minutos a 20°C y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante y se repitió la extracción con la pella agregando nuevamente 4 mL de acetato de sodio anhidro (Esquema 7.6.1). Los sobrenadantes se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno por 35 minutos a 40°C, redisolviéndose el residuo en 6 mL de buffer fosfato pH 4,5. Los extractos disueltos se cargaron en columnas Oasis C-18 de 200mg y capacidad de 6 cc previamente acondicionados con 6mL de metanol, 6 mL de agua y 6 mL de buffer fosfato pH 4,5, lavando posteriormente con 20 mL de agua y 18 ml de agua con metanol al 5%. Los analitos fueron eluidos con 4mL de una mezcla de metanol-diclorometano en una relación de 80:20. Las muestras fueron concentradas a 40°C hasta casi sequedad, para luego redissolverlas en 600 µL de buffer fosfato pH 4,5 adicionar el estándar interno y llevar a 1 gr con buffer fosfato pH 4,5. Las muestras fueron filtradas e inyectadas al HPLC. (Esquema 7.6.2)



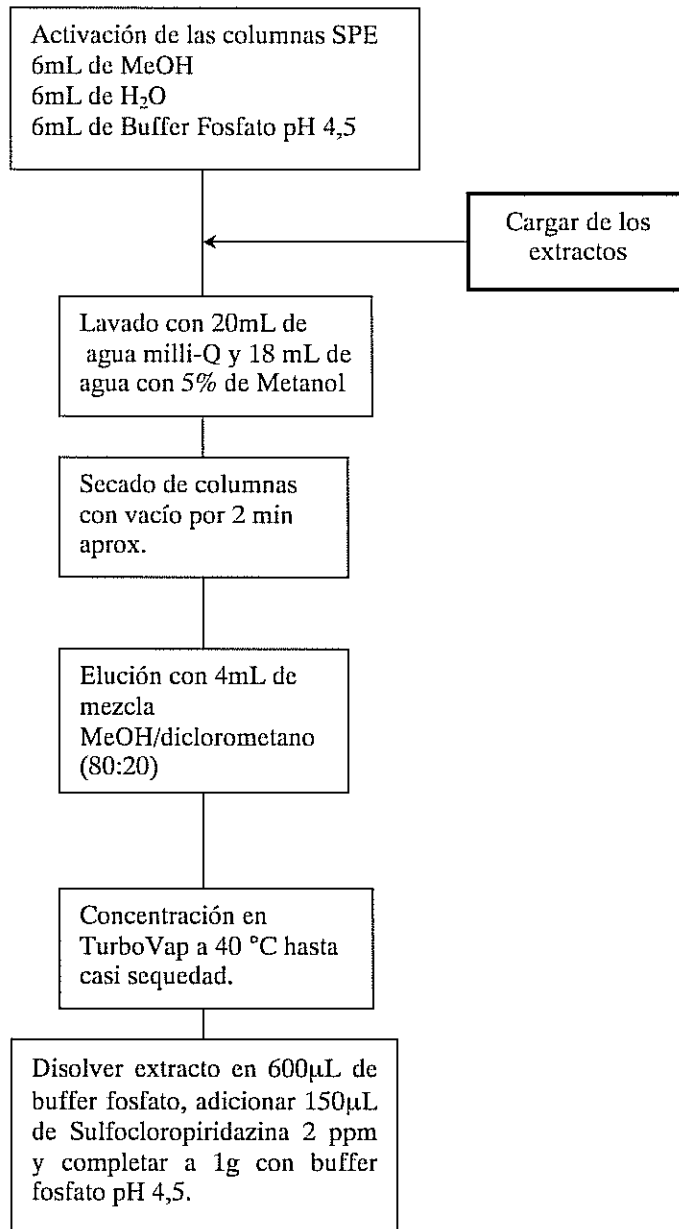
**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**7.6.1 Esquema del procedimiento de extracción de las sulfonamidas desde la matriz carne de cerdo.**



**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**7.6.2 Esquema del procedimiento de purificación de las sulfonamidas en columnas de extracción en fase sólida.**



**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**8 Optimización del las Condiciones Cromatográficas.**

En literatura existen varios métodos para la determinación de sulfonamidas, destacandose los que utilizan detección UV por arreglo de diodos debido principalmente a la posibilidades de obtener los espectros completos de cada una de las sulfonamidas lo que ayuda tanto a la identificación de los peak cromatográficos, como a la detección de posibles coeluciones con interferentes.

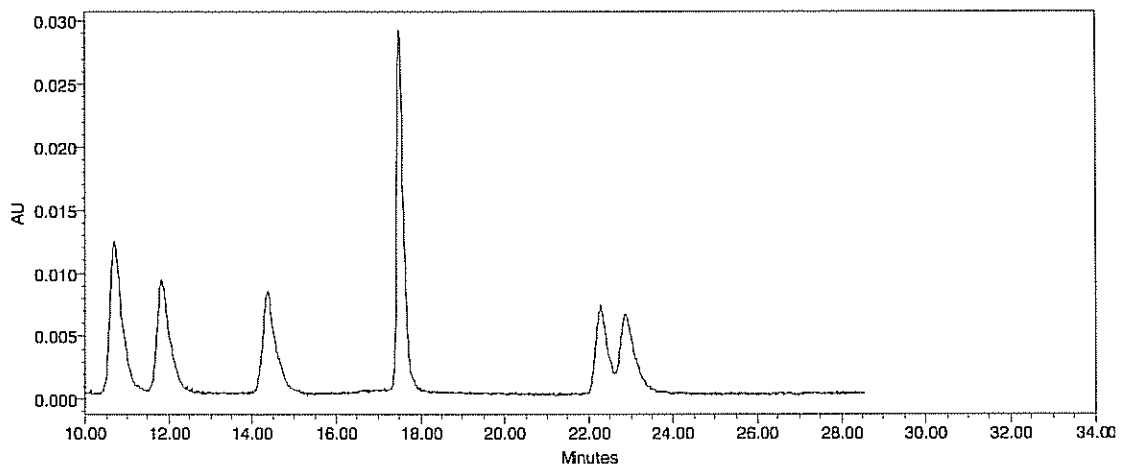
Se probaron las siguientes condiciones cromatográficas para la determinación de Sulfonamidas: Sulfatiazol (STZ), Sulfadiazina (SDZ), Sulfametazina (SMA), Sulfamerazina (SMR), Sulfaquinoxalina (SQX), Sulfadimetoxina (SDM) y Sulfacloropiridazina (SCP):

- 1.- Columna: C18 tamaño de partícula de 3,5 µm, dimensiones 250 x 4,6mm.
- Flujo: 1,2 mL/min
- Temperatura: 25 °C
- Detección: DAD.
- Fase Movil: Gradiente Acetonitrilo-buffer fosfato 0,05M pH 4,5 (7.1)

Tiempo	Acetonitrilo	Buffer Fosfato pH 4,5
0	15	85
10	15	85
11	30	70
19	30	70
20	15	85
35	15	85

Se observó que los pares de señales de correspondientes a sulfametazina, sulfamerazina y sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina aparecen solapadas entre si.

**Figura 2.** Cromatograma de solución acuosa de sulfonamidas (150ng/g) utilizando el Gradiente 1.



# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

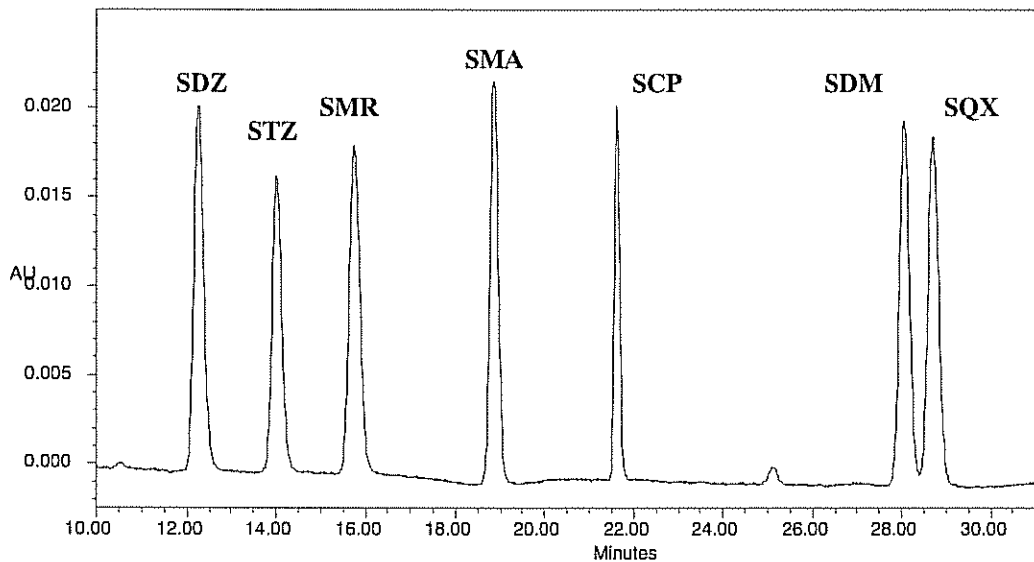
Se probaron varias modificaciones al gradiente 1 , variando tanto las proporciones de acetonitrilo y buffer fosfato pH 4,5 como el flujo de la fase móvil, encontrándose finalmente que las mejores condiciones cromatográficas para la cuantificación de sulfonamidas son las siguientes:

Columna: C18 tamaño de partícula de 3,5  $\mu\text{m}$ , dimensiones 250 x 4,6mm.  
Flujo: 0,7 mL/min  
Temperatura: 25 °C  
Detección: DAD.  
Fase Movil: Gradiente Acetonitrilo-buffer fosfato 0,05M pH 4,5 (7.1)

Tiempo	Acetonitrilo	Buffer Fosfato pH 3,0
0	11	89
9	15	85
12	31	69
17	31	69
23	15	85
30	11	89

Los cambios efectuados mejoraron bastante la forma y resolución de los peak como se observa en el siguiente cromatograma (Figura 3)

**Figura 3.** Cromatograma de solución acuosa de sulfonamidas (150 ng/g) utilizando las condiciones cromatográficas finales.



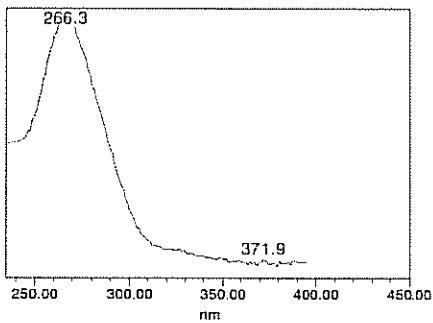
**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

Utilizando estas condiciones de análisis, se inyectaron los estándares puros de Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaquinoxalina, Sulfadimetoxina y Sulfaclopiridazina para contruir la librería de compuestos.

Los tiempos de retención y los espectros para cada una de las sulfonamidas se muestran a continuación:

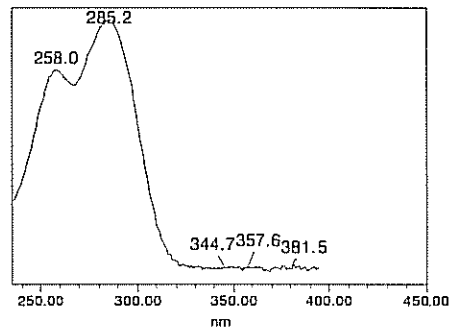
**Figura 4.** Espectros de Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaquinoxalina, Sulfadimetoxina y Sulfaclopiridazina:

**Sulfadiazina (SDZ)**



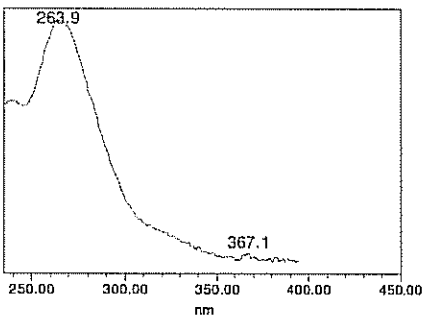
Tr: 12,2 min  
 $\lambda_{max}$ : 266,3 nm

**Sulfatiazol (STZ)**



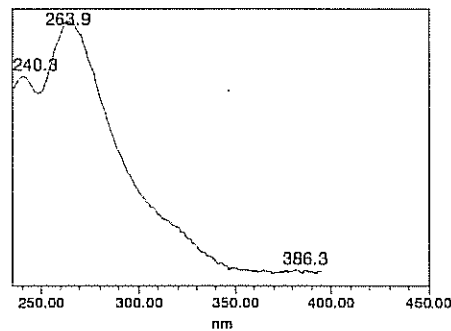
Tr: 8,8min  
 $\lambda_{max}$ : 258,0 nm; 285,2 nm.

**Sulfamerazina (SMR)**



Tr: 15,7 min  
 $\lambda_{max}$ : 263nm.

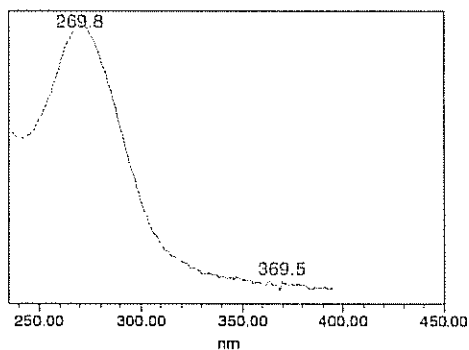
**Sulfametazina (SMA)**



Tr: 18,8 min  
 $\lambda_{max}$ : 240,3 nm, 363,9nm

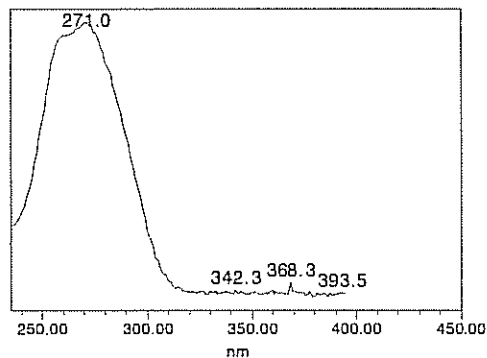
## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### Sulfaclopiridazina



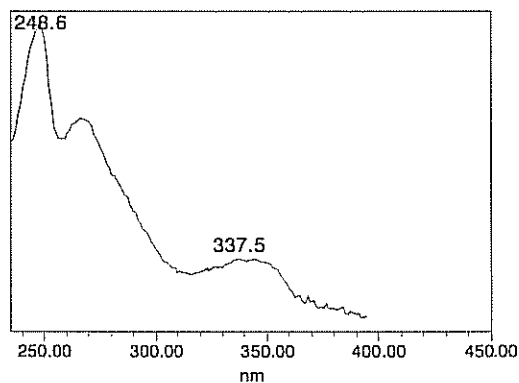
Tr: 21,6 min  
 $\lambda_{\text{max}}$ : 269 nm.

### Sulfadimetoxina



Tr: 28,1 min  
 $\lambda_{\text{max}}$ : 271 nm

### Sulfaquinoxalina



Tr: 28,7 min  
 $\lambda_{\text{max}}$ : 248,6 nm, 337,5nm.

## 9 Optimización del las Condiciones de Extracción desde la Matriz.

Para extraer las sulfonamidas desde la matriz carne de cerdo se probaron diferentes procedimientos utilizando como extractantes Cloroformo : Acetona (2/1), Acetonitrilo : Buffer fosfato, Acetato de Etilo entre otros. También se estudió la etapa del cleanup variando tanto el acondicionamiento de las columnas como el lavado y la extracción final de las sulfonamidas desde las columnas Oasis. Los principales problemas que se presentaron en esta etapa fueron lograr una adecuada recuperación de las sulfonamias y eliminar interferentes que se solapaban con las señales de los analitos analizados. Finalmente se logró obtener buenos rendimientos pero no fue posible eliminar un interferente que solapa la señal de sulfatiazol haciendo imposible su adecuada cuanificación.

# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

Las mejores condiciones de extracción y cleanup encontradas fueron las descritas con detalle en el punto 7.6, utilizando acetato de etilo como extractante desde la matriz en presencia de sulfato de sodio anhidro y cargando los extractos disueltos en buffer en las columnas precondicionadas con metanol, agua y buffer fosfato pH 4,5, realizando lavados con agua y agua con metanol al 5% y eluyendo finalmente las sulfonamidas con una mezcla metanol : diclorometano en una proporción de 80/20.

La longitud de onda de integración donde se puede observar y cuantificar de mejor forma las señales de las sulfonamidas es 270 nm. A continuación se muestra un cromatograma de un extracto de carne de cerdo contaminado con 150 ng/g de sulfonamidas (Figura 5) y un cromatograma de un blanco de matriz (Figura 6).

Figura 5. Cromatograma de un extracto de carne de cerdo contaminado a un nivel de 150 ng/g en cada sulfonamida.

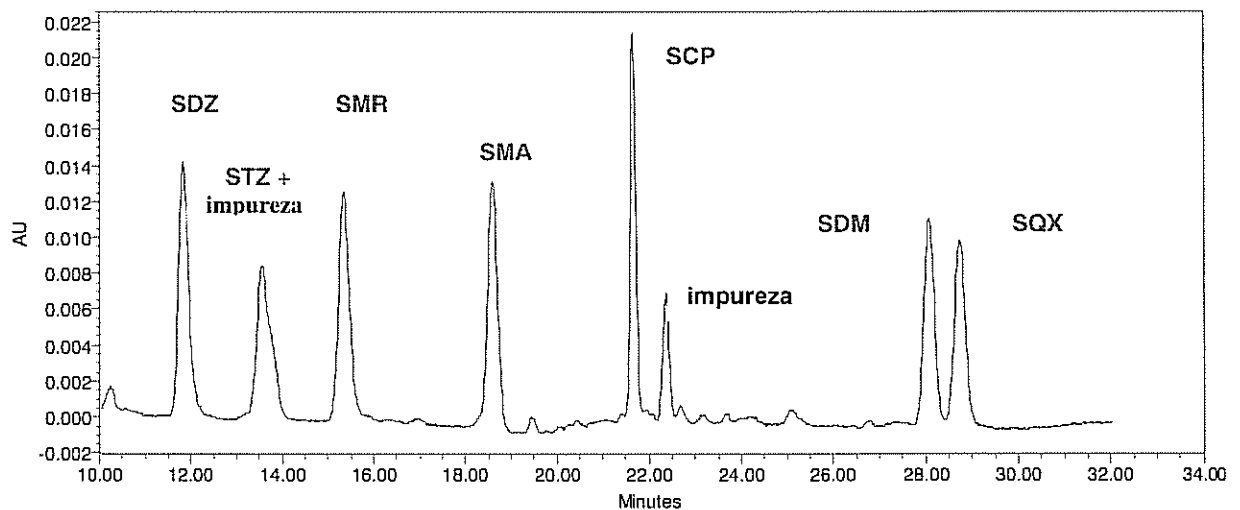
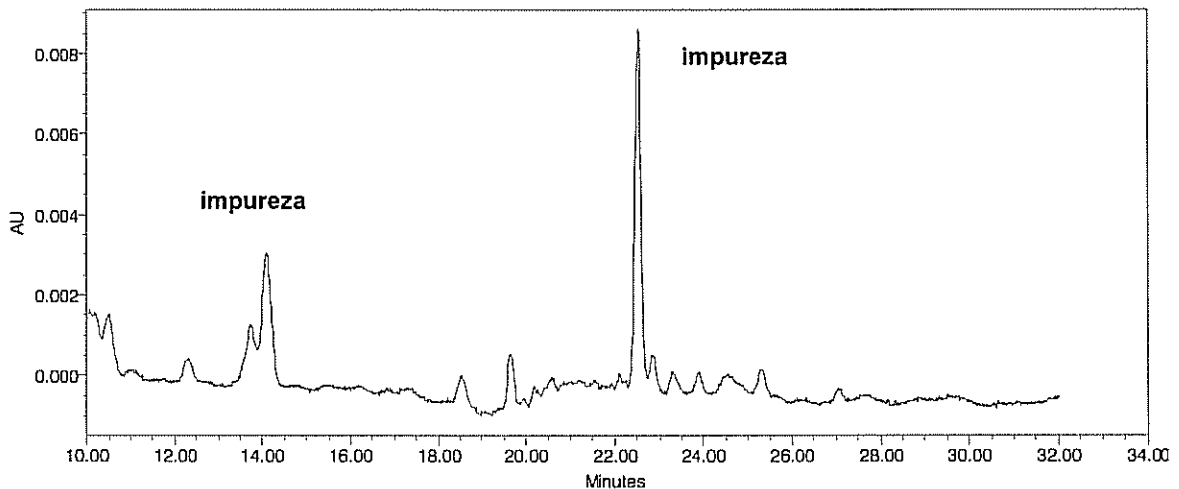


Figura 6 Cromatograma de un blanco de carne de cerdo sin contaminar.



# INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

## 10 RESULTADOS

### 10.1 Curva de Calibración. Rango Lineal.

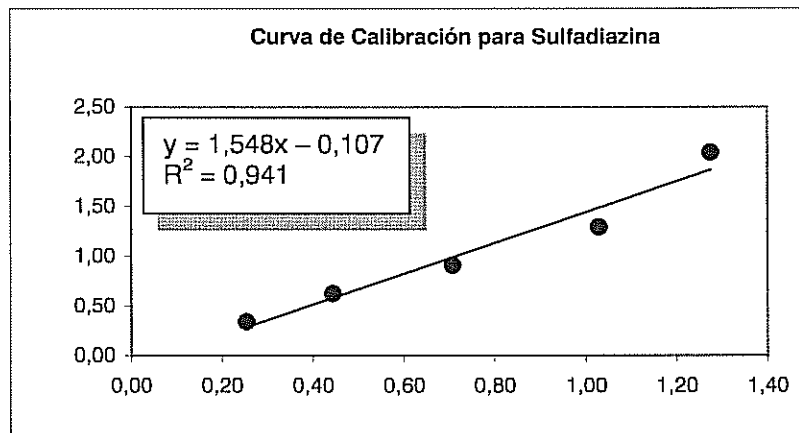
Para verificar la linealidad en el rango de trabajos se fortificó el homogenizado de carne en 5 niveles de concentración, 30 ng/g, 50ng/g, 100ng/g, 150ng/g y 200 ng/g adicionando distintas alicuotas de la solución multiestandar de calibración.

Se extrajeron las muestras tal como se mostró en el esquema 4 y se adicionó antes de la inyección a cada uno de los extractos una alicuota del estándar interno Sulfaclopiridazina.

La preparación del blanco consistió en una muestra de 2g de carne homogenizada no fortificada a la cual sólo se le adicionó una alicuota del estándar interno Sulfaclopiridazina luego de pasar por el proceso de extracción .

Al graficar la razón entre las áreas de las sulfonamidas/área del estándar interno versus la razón entre la concentración de las sulfonamida/concentración del estándar interno obtenemos las curvas de calibración mostradas en las Figuras 7-11. Como se puede observar entre los rangos de concentración de aproximadamente 30 ng/g y 200 ng/g existe un comportamiento lineal el cual se ve reflejado tanto al observar las curvas como al verificar los  $R^2$  obtenidos para cada una de ellas.

**Figura 7.** Curva de Calibración para Sulfadiazina



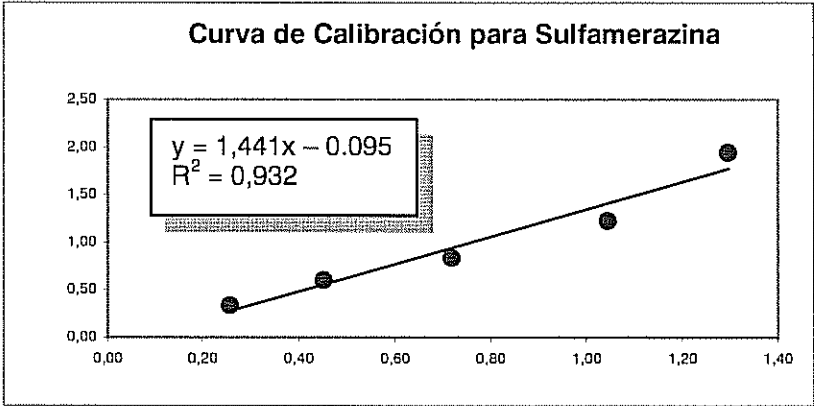
**Rango de trabajo: 36,92 ng/g – 184,94 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Sulfadiazina ng/g	Sulfaclopiridazina ng/g	Sulfadiazina uV*seg	Sulfaclopiridazina uV*seg		
36,918	145,564	57427	168864	0,254	0,340
64,306	144,738	105009	168217	0,444	0,624
102,927	145,343	154331	169339	0,708	0,911
148,977	144,824	219273	169515	1,029	1,294
184,939	144,986	342852	168073	1,276	2,040



**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**Figura 8.** Curva de Calibración para Sulfamerazina

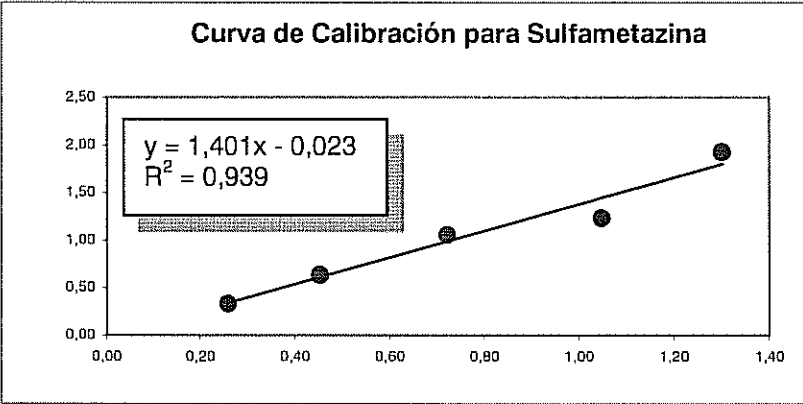


**Rango de trabajo: 37,51 ng/g – 187,88 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Sulfamerazina ng/g	Sulfaclopiridazina ng/g	Sulfamerazina uV*seg	Sulfaclopiridazina uV*seg		
37,506	145,564	56964	168864	0,258	0,337
65,330	144,738	101581	168217	0,451	0,604
104,566	145,343	142147	169339	0,719	0,839
151,349	144,824	208372	169515	1,045	1,229
187,884	144,986	327129	168073	1,296	1,946

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**Figura 9.** Curva de Calibración para Sulfametazina.

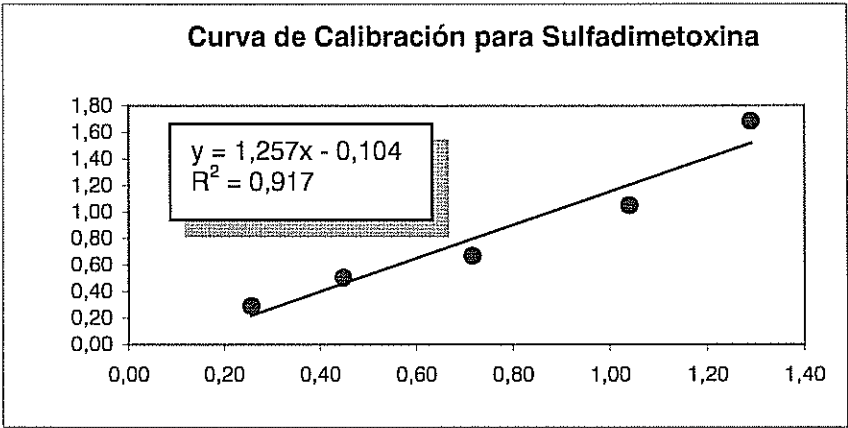


**Rango de trabajo: 37,66 ng/g – 188,69 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Sulfametazina ng/g	Sulfacloropiridazina ng/g	Sulfametazina uV*seg	Sulfacloropiridazina uV*seg		
37,667	145,564	56281	168864	0,259	0,333
65,609	144,738	107094	168217	0,453	0,637
105,013	145,343	178963	169339	0,723	1,057
151,997	144,824	209048	169515	1,050	1,233
188,688	144,986	323954	168073	1,301	1,927

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**Figura 10.** Curva de Calibración para Sulfadimetoxina.

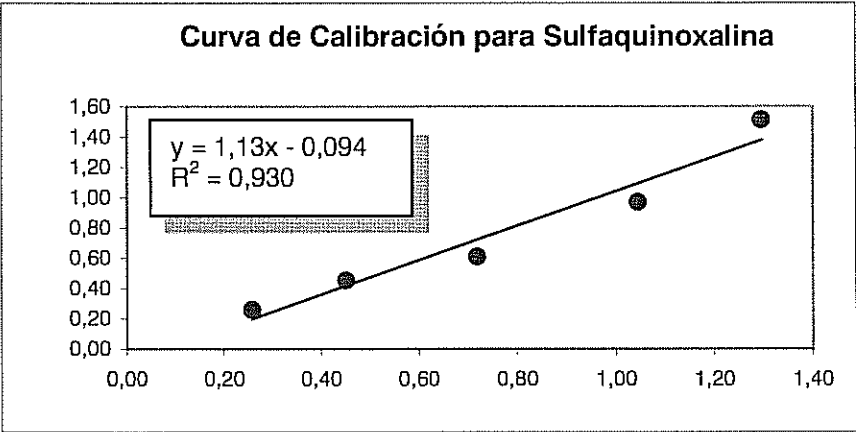


**Rango de trabajo: 37,24 ng/g – 187,05 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Sulfadimetoxina ng/g	Sulfadimetoxina ng/g	Sulfadimetoxina uV*seg	Sulfadimetoxina uV*seg		
37,340	145,564	49383	168864	0,257	0,292
65,040	144,738	84631	168217	0,449	0,503
104,102	145,343	113321	169339	0,716	0,669
150,677	144,824	178118	169515	1,040	1,051
187,050	144,986	283054	168073	1,290	1,684

**INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS**

**Figura 11.** Curva de Calibración para Sulfaquinoxalina.



**Rango de trabajo: 37,51 ng/g – 187,91 ng/g**

Concentración		Área		Razón de Concentración	Razón de Áreas
Sulfaquinoxalina ng/g	Sulfadicloropiridazina ng/g	Sulfaquinoxalina uV*seg	Sulfadcloropiridazina uV*seg		
37,512	145,564	44013	168864	0,258	0,261
65,340	144,738	76359	168217	0,451	0,454
104,582	145,343	103610	169339	0,720	0,612
151,372	144,824	164375	169515	1,045	0,970
187,913	144,986	254318	168073	1,296	1,513

## INFORME TECNICO DE VALIDACION DE METODOS

### 11 CONCLUSIONES

- 11.1 En este trabajo se describe el desarrollo de un método por HPLC con detector de arreglo de diodos para la detección y cuantificación simultánea de Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaquinoxalina y Sulfadimetoxina en matriz carne de cerdo utilizando como estándar interno Sulfacloropiridazina.
- 11.2 La cuantificación en matriz de Sulfatiazol no fue posible debido a la presencia de una señal interferente que se solapa con la señal de este analito. Se realizarán otras modificaciones a las realizadas que permitan eliminar los interferentes que impiden la cuantificación de sulfatiazol en la matriz.
- 11.3 Las condiciones experimentales óptimas fueron establecidas luego de realizar varios cambios a los métodos reportados en la literatura, logrando optimizar tanto la extracción de los analitos desde la matriz como las condiciones cromatográficas para su detección.
- 11.4 Se pudo comprobar la linealidad en el rango de trabajo para Sulfadiazina, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaquinoxalina y Sulfadimetoxina en matriz, realizándose en este momento los estudios de recuperación, precisión y sesgo que permitirán validar esta metodología de cuantificación de sulfonamidas en carne de cerdo.