



Archivos de Medicina Veterinaria

ISSN: 0301-732X

archmv@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

San Martín, A.; Cañon, H.; Iragüen, D.
Ensayo rápido para la determinación simultánea de enrofloxacin y ciprofloxacina en leche mediante
Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 33, núm. 1, 2001, pp. 115-124
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013744014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org





redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

-  Como citar este artículo
-  Agregar a favoritos
-  Enviar a e-mail
-  Imprimir HTML

Arch. med. vet. v.33 n.1 Valdivia 2001

Ensayo rápido para la determinación simultánea de enrofloxacin y ciprofloxacina en leche mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

A fast assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk by high performance liquid chromatography

A. SAN MARTÍN, M.V, DMV; H. CAÑÓN, MV, cM. Sc; D. IRAGÜEN, MV.

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Av. Santa Rosa 11735, Correo 2, Casilla 15, La Pintana, Santiago, Chile. Fax: 56-2-541 6840.

SUMMARY

A fast liquid chromatography method with detection of fluorescence for enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine milk (powder, pasteurized, raw) is reported. The procedures consisted of successive extraction of milk with acidified ethanol concentrated by dryness and reconstituted for the chromatographic analysis. The analysis is performed by isocratic elution using an acetonitrile-2% acetic acid (15:85) mobile phase and silica dimetiloctadecil column with fluorescence detection at excitation and emission wavelengths of 278 and 450 nm. respectively. The limit of detection and quantification was 5 ng/ml for enrofloxacin and ciprofloxacin. Both analytes presented a lineal behaviour when the different concentrations of the pure standards and contaminated matrixes were analyzed; the coefficients of correlation were higher than 0.99. The percentages of recovery of both analytes in the different matrixes were between 82.9 and 115%.

Key words: analytical methodology, enrofloxacin, ciprofloxacin, milk.

INTRODUCCIÓN

Los agentes antimicrobianos en medicina veterinaria son la principal herramienta terapéutica en el control y tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas en animales de producción; sin embargo, la presencia de residuos de estos quimioterápicos en la leche se ha convertido en un tema de interés en los consumidores ([Jones y Seymour, 1987](#); [Hutchinson y Sears, 1994](#)).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que entre los principales problemas en salud pública que generan los residuos de antimicrobianos en productos de origen animal figuran las reacciones anafilácticas ([Van Arsdel, 1983](#)), alteraciones de la flora intestinal humana ([Gorbach, 1993](#)) y alteraciones tóxicas específicas como es el caso de cloranfenicol ([Kucers, 1980](#)).

Las quinolonas, en particular, poseen efectos adversos específicos a nivel de cartílago de crecimiento en diversos animales jóvenes de laboratorio, comprobándose también este efecto en niños ([Stahman y Lode, 1989](#)). En humanos, su uso se ha restringido fuertemente, contraindicándose en el caso de niños, adolescentes, mujeres en estado de gestación y lactancia. La artropatía en las especies juveniles se ha observado con todas las quinolonas, sin embargo el mecanismo por el cual se produce este efecto aún permanece sin aclarar. Los hallazgos patológicos, macroscópicos y microscópicos, en perros y ratas de laboratorio enfrentados a quinolonas, son de agrupación de condrocitos y erosiones en el cartílago de crecimiento de las articulaciones que soportan el mayor peso del animal ([World Health Organization, 1995](#); [Center for Veterinary Medicinal Products, 1998](#)).

Las quinolonas pueden además afectar en forma inespecífica diversos sistemas, provocando alteraciones a nivel gastrointestinal, renal, cardiovascular, sistema nervioso central, ocular, como también alteraciones en la espermatogénesis, mutagenicidad y fotosensibilidad ([Stahlmann y Lode, 1989](#)).

La enrofloxacin es una fluoroquinolona que actúa sobre algunas bacterias gramnegativas y grampositivas; es recomendada para el tratamiento de enfermedades respiratorias, gastrointestinales y urinarias de bovinos, cerdos y aves en la Unión Europea ([Center for Veterinary Medicinal Products, 1998](#)).

En la reunión número 43 del Comité de Expertos de la OMS ([World Health Organization, 1995](#)), celebrada en Ginebra, se dio un MRL de 10 ng/ml hipotético para enrofloxacin en leche bovina, basándose en métodos analíticos con límites de cuantificación de 5 ng/ml para esta droga en leche.

Por otro lado, la Agencia Europea de Evaluación de productos Medicinales ([Center for Veterinary Medicinal Products, 1998](#)), recomendó la inclusión de enrofloxacin en vacas lactantes con un MRL de 100 ng/ml en leche bovina, considerando la suma de residuos de enrofloxacin y ciprofloxacin.

Existen diversos métodos basados en la Cromatografía Líquida de Alta Precisión, para la determinación de enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacin en diferentes tejidos ([Hormazabal y col., 1991](#); [Martínez y col., 1997](#)); sin embargo, existen escasas publicaciones para la determinación de éstos en leche ([Roybal y col., 1997](#)).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método por Cromatografía Líquida de Alta Precisión rápido, simple y con buena sensibilidad para la determinación simultánea de residuos de enrofloxacin y ciprofloxacin en leche bovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos: Enrofloxacin (100% pureza) se obtuvo de Bayer Chile, mientras que ciprofloxacin (98.3% pureza) fue obtenido del Instituto de Investigaciones y Ensayos Farmacológicos de la Universidad de Chile (IDIEF, Universidad de Chile). Todos los reactivos químicos fueron grado analítico. Estos fueron:

- Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker).
- Agua grado HPLC (Millipore).
- Ácido acético grado ACS, glacial, libre de aldehído (Riedel de Haën) para preparar soluciones acuosas

- Etanol absoluto: alcohol etílico deshidratado(Riedel de Haën).
- Fase móvil: acetonitrilo-ácido acético al 2% (15:85).
- Solución de extracción: ácido acético al 1%- etanol absoluto (1:99).
- Filtros: 13 mm x 0,45 mm nylon (Gelman Science)

SOLUCIONES STOCK Y CONCENTRACIONES DE TRABAJO PARA CADA ANALITO:

a. Soluciones stock (1000 mg/ml): Se pesaron 25.0 ± 0.5 mg (después de corregir según pureza) de enrofloxacin y ciprofloxacina. Cada una se diluyó en 25 ml de NaOH 0,03 M. Estas se almacenaron a 4°C protegidas de la luz, condiciones bajo las cuales son estables por 30 días.

b. Solución intermedia (1 ug/ml): 25 ml de la solución stock de enrofloxacin y ciprofloxacina se diluyeron en 25 ml de ácido acético al 1%, quedando una solución intermedia de 1.0 mg/ml (s.i.). Esta se preparó el día en que se analizaron.

c. Concentraciones de trabajo de los analitos puros : De la s.i. se utilizaron alícuotas de .5, 10, 20, 40, 80 y 100 μ l y se enrasaron a 2 ml con ácido acético al 1%, quedando concentraciones de 2,5, 5, 10, 20, 40, 50 ng/ml respectivamente. Estas se prepararon el día en que se analizaron.

d. Concentraciones de trabajo de los analitos en las muestras fortificadas:* De la s.i. se utilizaron alícuotas de 25, 50, 100, 200 y 250 μ l para agregar en 5 ml de leche control, obteniéndose niveles de fortificación de 5, 10, 20, 40, 50 ng/ml de leche, respectivamente. Estas se prepararon el día en que se analizaron las muestras.

Muestras: Se utilizaron tres tipos de leche: leche en polvo, leche pasteurizada y leche cruda libres de antibióticos; esta última fue mantenida a -25°C hasta su análisis.

La leche cruda se obtuvo de vacas en producción láctea, clínicamente sanas de la Estación Experimental "La Platina", INIA, Santiago, Chile. Los animales no recibieron tratamiento o alimentación con agentes antimicrobianos por al menos 8 semanas antes de obtener la leche, como lo señala [Reichmuth y col. \(1997\)](#).

* Muestra fortificada: tejido o fluido que contiene concentraciones conocidas del elemento analizado, agregado a la muestra de tejido o fluido de control. [Codex Alimentarius, 1995](#) "Residuos de Medicamentos Veterinarios".

CONDICIONES GEOGRAFICAS:

Los análisis fueron realizados en un sistema Waters con una bomba isocrática 510, autosampler 717 plus, detector de fluorescencia 474 e integrador 746. El detector se operó con una longitud de onda de excitación de 278 nm y emisión de 450 nm. Se utilizó una columna analítica Symmetry C18 (25 cm x 4,6 mm DI, Waters) y una precolumna Sentry Guard mBondapack C18 (2 cm x 3,9 mm DI, Waters) empaquetadas con partículas de dimetiloctadecil sílica de 5 y 10 μ m, respectivamente.

Se ocupó un flujo de fase móvil de 1,0 ml/min. inyectando alícuotas de 50 μ l a la columna analítica.

PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Para la extracción de las muestras se siguió como pauta el trabajo de [Roybal y col. \(1997\)](#) con modificaciones.

Se colocaron 5 ml de leche (cruda, pasteurizada o polvo reconstituida) en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml. En este momento se contaminó con la concentración de trabajo preparada previamente para cada droga; se cerró el tubo y se esperaron al menos 30 min., permitiendo que la droga se impregnara en la leche. Se agregaron 25 ml de la solución de extracción, se agitó durante 15 s y se agregaron 4 g de sulfato de sodio. Se agitó por 15 s y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min; el sobrenadante se pasó a otro tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Al sedimento anterior se agregaron nuevamente 25 ml de solución de extracción, se agitó hasta dispersar y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Ambos sobrenadantes se juntaron y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min, traspasando el nuevo sobrenadante a un matraz Erlenmeyer de 50 ml. En este trabajo, las muestras no se pasaron por columnas de extracción en fase sólida como señala [Roybal y col. \(1997\)](#). Nuestra modificación fue que el sobrenadante final se llevó directamente a sequedad bajo un flujo de nitrógeno

se filtró a un vial de HPLC para el análisis cromatográfico.

VALIDACIÓN DEL ENSAYO. Para la validación del ensayo se siguieron las recomendaciones entregadas por el [Codex Alimentarius \(1995\)](#), [Food and Drug Administration \(1997\)](#) y Servicio Agrícola Ganadero del Ministerio de Agricultura, Chile ([SAG, 1999](#)), para lo cual se definieron los siguientes aspectos:

Especificidad: Debido a que el método debe ser capaz de discriminar entre las impurezas propias de la leche y los analitos de interés, primero se analizaron las drogas puras a una concentración de 10ng/ml, con el fin de definir sus tiempos de retención. Luego se analizaron 20 muestras diferentes de leche cruda libre de antimicrobianos, 5 de leche pasteurizada y 5 de leche en polvo reconstituida.

Una vez definido si existían impurezas en las diferentes muestras de leche, que pudieran interferir con los analitos en estudio, se confirmó la especificidad del método fortificando las diferentes leches con enrofloxacin y ciprofloxacina simultáneamente.

Límite de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.): Ya que en las muestras de leche sin antimicrobiano, no existían interferencias en los tiempos de retención de enrofloxacin y ciprofloxacina, el L.D. se determinó como la menor señal detectable y el L.C. como la menor señal cuantificable, para lo cual el c.v. no debe ser superior al 5% en inyecciones manuales ([SAG, 1999](#)).

Linealidad de los analitos en estudio: Se definieron 6 concentraciones de trabajo para enrofloxacin y ciprofloxacina; estas fueron: 2,5; 5, 10, 20, 40, y 50, ng/ml; cada una se inyectó por triplicado. Para cada concentración se definió el promedio de las áreas cromatográficas, su desviación estándar y coeficiente de variación (c.v.).

Linealidad de las muestras fortificadas: Para analizar la respuesta de los analitos en las diferentes leches, estas se fortificaron con las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 40, 50, ng/ml de leche; cada concentración se inyectó por triplicado. Para cada concentración se calculó el promedio de las áreas cromatográficas, su desviación estándar y c.v. El promedio de los c.v. señala la variabilidad interensayo, también denominado intradía.

Además, con el promedio de las áreas cromatográficas se realizó un Análisis de Regresión Lineal determinando la pendiente, intersección del eje y, coeficiente de correlación.

Recuperación: Para cada matriz en estudio se seleccionaron tres concentraciones (10, 20, y 40, ng/ml). Estas se analizaron en triplicado y en días diferentes (variabilidad interdía).

Para el cálculo de la recuperación se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = \frac{Co}{Cr} \times 100$$

Donde:

Co : concentración en la muestra fortificada. Se obtiene al transformar el área cromatográfica de la muestra fortificada a concentración, a partir de la ecuación resultante del análisis de regresión lineal.

Cr : concentración real de fortificación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar las drogas puras, la mínima concentración detectada fue de 5 ng/ml para enrofloxacin y ciprofloxacina. El análisis de regresión lineal de las diferentes concentraciones mostró una correlación mayor a 0, 99. En la [figura 1](#) se muestra el cromatograma con los estándares puros a una concentración de 10 ng/ml, con tiempos de retención de 4,28 y 5,55 min. para ciprofloxacina y enrofloxacin, respectivamente.



Figura 1. Cromatogramas de ciprofloxacina (A) y enrofloxacina (B) a una concentración de 10 ng/ml
Chromatograms of ciprofloxacin (A) and enrofloxacin (B) at 10 ng/ml

Para definir la especificidad del método se analizaron las diferentes matrices de leche libre de antimicrobianos. Los cromatogramas se presentan en la [figura 2](#), en la cual se puede observar que no existen interferencias en los tiempos de retención de las drogas analizadas. La especificidad fue confirmada al fortificar las diferentes leches con 20 ng/ml de ciprofloxacina y enrofloxacina simultáneamente. En la [figura 3](#) se muestra el cromatograma de leche cruda fortificada con ambas drogas. Nuestros resultados coinciden con los descritos por [Kaartinen y col. \(1995\)](#) y [Roybal y col. \(1997\)](#), quienes también trabajaron con estos analitos en leche. Así también, trabajos realizados en otros tejidos o fluidos biológicos (plasma, orina, bilis, heces, miel), demostraron una especificidad similar al presente trabajo ([Weber y col., 1985](#); [García y col., 1999](#)).

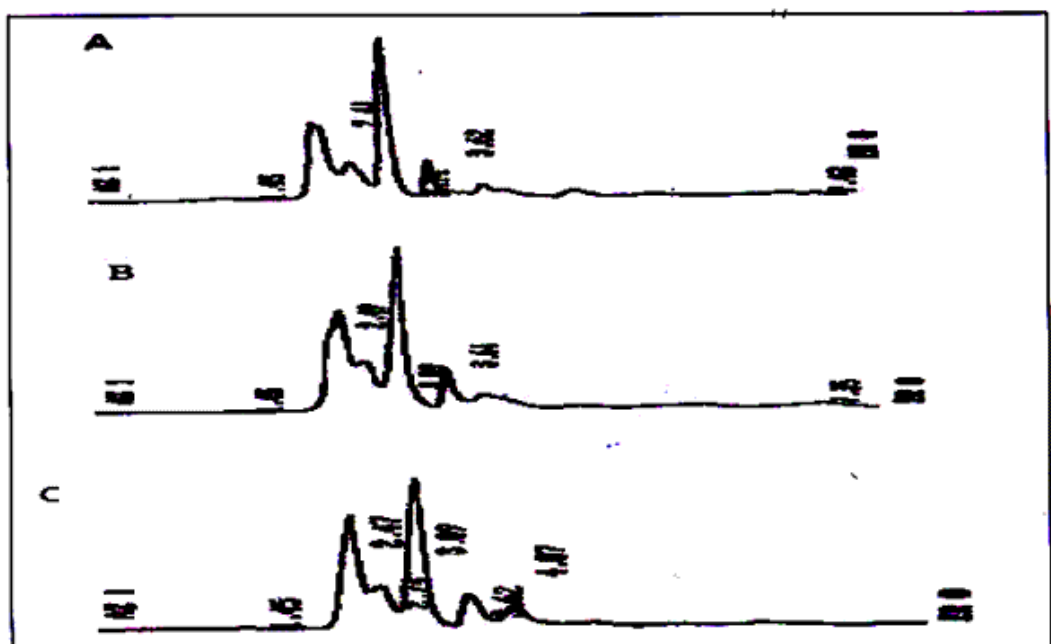


Figura 2. Cromatogramas de las diferentes matrices de leche control. A: Leche en polvo.
B: Leche pasteurizada. C: Leche cruda.
Chromatograms of different control milk matrices. A: Powder milk. B: Pasteurized milk.
C: Raw milk

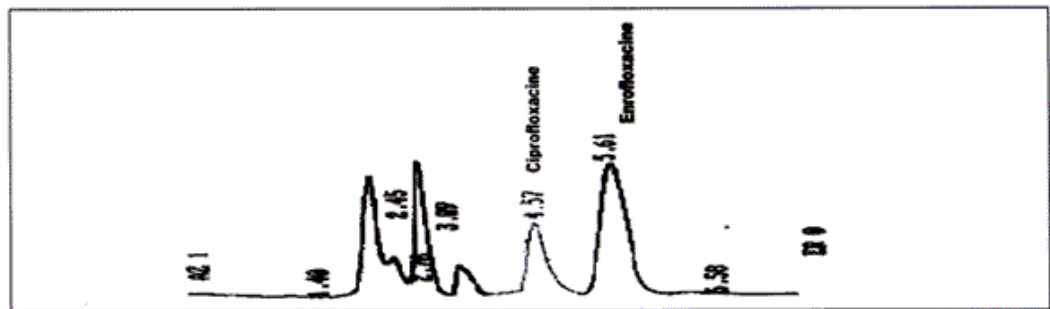


Figura 3. Cromatograma de leche cruda fortificada con 20 ng/ml de ciprofloxacina y enrofloxacina.

Chromatograms of fortified raw milk fortified with ciprofloxacin and enrofloxacin at 20ng/ml.

En relación a las metodologías analíticas para monitorear residuos de enrofloxacina y su metabolito ciprofloxacina en leche, es importante señalar que ensayos publicados ([Roybal y col., 1997](#)), aplican solventes orgánicos para la extracción de grasa y un paso de clean-up con columnas de extracción en fase sólida C-18 SPE para purificar la fase acuosa. Si bien es cierto, con estas condiciones los extractos no presentan impurezas que puedan interferir con las drogas y la sensibilidad es bastante buena (5ng/ml), los costos químicos son bastante altos, sumándose a esto la lentitud de los análisis.

En este trabajo, no utilizamos el paso por la columna, llevando la fase acuosa obtenida de los sistemas de extracción directamente a sequedad. Luego se reconstituyó, soncó y centrifugó, obteniéndose un sobrenadante que se inyectó directamente a la columna analítica, previo filtrado de esta. Con estas condiciones, tal como se señaló anteriormente, la especificidad del método fue bastante buena, ya que en las diferentes matrices estudiadas hubo una adecuada separación de los analitos en estudio, sin afectar el límite de cuantificación, ya que al igual que otros trabajos publicados este fue de 5 ng/ml para ambos analitos.

Dentro de los parámetros importantes a considerar en la validación de una metodología analítica, está el Límite de Detección (L.D.), Límite de Cuantificación (L.C.), variabilidad intradía e interdía y la linealidad de las concentraciones analizadas en las matrices fortificadas; este último, permite además definir si el método en estudio puede ser cuantitativo.

Debido a que las matrices analizadas no mostraron interferencia en los tiempos de retención de los analitos en estudio, el L.D. se definió en 5 ng/ml, ya que a esta concentración se obtuvo la menor señal visible en los cromatogramas. Además, como el c.v. de esta concentración, para ambos analitos analizados en las diferentes matrices de leche, no superó el 5% ([cuadro 1](#) y [2](#)), estando este dentro de los rangos permitidos por el [SAG \(1999\)](#), el L.C. también se definió en 5 ng/ml.

Cuadro 1. Promedio de las áreas cromatográficas (a.c.) para las diferentes concentraciones de enrofloxacina

0000000analizada en las matrices de leche

0000000High Performance Liquid Chromatography enrofloxacin concentrations in fortified powder,

0000000pasteurized and raw milk.

Concentración (ng/ml)	Leche en polvo n=3			Leche pasteurizada n=3			Leche cruda n=3		
	_(a.c.)	-	C.V.	_(a.c.)	-	C.V.	_(a.c.)	-	C.V.
5	449113	23454	4,9	502857	8542	1,7	369976	8277	2,2
10	744679	18679	2,5	728241	6578	4,3	653441	5391	4,5
20	1234839	53520	4,3	1455848	41872	2,9	1394651	1750	2,1
40	2692728	25305	4,4	2723212	79919	2,9	2744437	8495	3,1
50	3485516	22742	4,8	3342404	87515	2,6	3610645	26404	4,8
Variabilidad interensayo		Promedio 4,18 Desv.Est. 0,97		Promedio 2,88 Desv.est. 0,93			Promedio 3,34 Desv.Est. 1,26		

La variabilidad intradía para enrofloxacin y ciprofloxacina en las diferentes matrices de leche, expresada por el c.v. para cada concentración, está dentro de los rangos aceptables en la validación de una metodología analítica, como se observa en las [cuadros 1](#) y [2](#). Estos resultados eran esperables, ya que el laboratorio cuenta con un programa de aseguramiento de calidad que asegura la repetitividad de los resultados.

Cuadro 2. Promedio de las áreas cromatográficas (a.c.) para las diferentes concentraciones de ciprofloxacina
0000000analizadas en las matrices de leche.
0000000High Perfomance Liquid Chromatography ciprofloxacine concentrations in fortified powder,
0000000pasteurized and raw milk.

Concentración (ng/ml)	Leche en polvo n=3			Leche pasteurizada n=3			Leche cruda n=3		
	_(a.c.)	-	C.V.	_(a.c.)	-	C.V.	_(a.c.)	-	C.V.
5	160902	9153	4,7	289599	6193	2,1	154257	4265	2,8
10	325901	30089	5,2	333776	8265	2,5	393116	24159	4,1
20	598497	20521	3,4	647251	12112	1,9	655644	11995	1,8
40	1312897	88194	4,7	1160461	16808	1,6	1123771	53830	4,8
50	1674929	158420	4,5	1405769	25987	1,8	1479233	97205.91	4,6
Variabilidad interensayo		Promedio 4,5 Desv.Est. 0,66		Promedio 1,98 Desv.Est. 0,32			Promedio 3,62 Desv.Est. 1,28		

Al realizar el análisis de regresión lineal con las concentraciones de trabajo en las diferentes muestras de leche fortificadas, estas mostraron una correlación mayor a 0.99 con un $p < 0,05$, ([cuadro 3](#)), señalando que el método, además de identificar, permite cuantificar enrofloxacin y ciprofloxacina en muestras problemas.

Cuadro 3. Información de la regresión lineal ($y=b^*+m^{**}x$) y coeficientes de correlación (r^2) de las

00000000Lineal regresion information ($y=b^*+m^{**}x$) and coefficients of correlation (r^2) of the different
00000000concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin in the different milk matrixes.

Tipo Matriz	Enrofloxacina		Ciprofloxacina	
	Ecuación	r^2	Ecuación	r^2
Leche en polvo	$y=34671 + 67468x$	0,997	$y=-26501 + 33645x$	0,999
Leche pasteurizada	$y=20722 + 1399x$	0,997	$y=125434 + 25678x$	0,999
Leche cruda	$y=-33007 + 71505x$	0,999	$y=68249 + 27718x$	0,991

*= intersección eje y

**= pendiente

Los porcentajes de recuperación para ambos analitos se generaron a partir de tres días de análisis, con el fin de ver, además, la variabilidad interdía; en el día uno se analizaron 10 ng/ml, el día dos 20 ng/ml y el día tres 40 ng/ml; todas las concentraciones se analizaron por triplicado.

Los porcentajes de recuperación, calculados para cada concentración en las diferentes matrices se pueden observar en la [cuadro 4](#). Dependiendo de la concentración analizada estos varían entre 82,9 a 105,1% para enrofloxacin y entre 92,8 a 115,0% para ciprofloxacin. Al respecto, el [SAG \(1999\)](#), señala que los porcentajes de recuperación deben fluctuar en rangos de 60 al 115% para las concentraciones analizadas en este estudio. Por otro lado, el [Codex Alimentarius \(1995\)](#) señala que cuando el LMR de un analito es inferior a 10 ppb, la recuperación recomendada como aceptable debe estar entre el 60 y el 120 por ciento.

Cuadro 4. Porcentajes de recuperación de enrofloxacin y ciprofloxacin en las diferentes matrices de
00000000leche.

00000000Recovery percentages of enrofloxacin and ciprofloxacin according to different milk matrixes

Concentración (ng/ml)	Enrofloxacina			Ciprofloxacina		
	Matriz de leche			Matriz de leche		
	Polvo (n=3)	Pasteurizada (n=3)	Cruda (n=3)	Polvo (n=3)	Pasteurizada (n=3)	Cruda (n=3)
10	102,1	88,6	98,8	104,6	92,8	115,0
20	89,1	101,4	82,9	92,8	105,1	102,7
40	101,3	100,4	105,1	99,6	100,6	100,2
—	97,5	96,8	95,6	99,0	99,5	105,9
D.S.	7,28	7,11	11,4	5,92	6,22	7,92
C.V.(%)	7,47	7,35	11,96	5,98	6,25	7,47

Es importante señalar que el porcentaje de recuperación, además de indicar que los sistemas de extracción y limpieza utilizados en la metodología, permiten recuperar el analito dentro de rangos aceptables, es un parámetro necesario para calcular la concentración de un analito en una muestra problema.

De acuerdo a las normas del [S.A.G. de Chile \(1999\)](#), las cuales siguen los criterios del [Codex Alimentarius \(1995\)](#), un laboratorio analítico que trabaja bajo un programa de aseguramiento de calidad, *previo al análisis de las muestras problemas, siempre debe calcular la recuperación diaria de su metodología analítica*. Para esto debe definir que concentración de las utilizadas en la validación del

definido el porcentaje de recuperación del día de análisis y, considerando, además, el porcentaje de recuperación de la C.T. definida, se puede calcular la concentración de una muestra problema. Siguiendo fundamentalmente este criterio, en este trabajo, se calculó la recuperación para cada concentración analizada.

Por otro lado, la precisión del método, es decir, el grado de coincidencia de nuestros resultados al realizar los análisis en diferentes días, expresada por el c.v., está dentro de los valores recomendados. Al respecto, el [Codex Alimentarius \(1995\)](#) señala que el c.v. dentro del laboratorio debe ser menor o igual al 20 por ciento cuando se trabaja con concentraciones del analito entre 10 y 100 ppb. En el [cuadro 4](#) se puede observar que los c.v. obtenidos en las diferentes matrices de leche fueron menores al 12%.

De acuerdo a las pautas de validación recomendadas por el S.A.G. o instituciones internacionales, en los métodos analíticos multiresiduales validados por un laboratorio no es necesario utilizar un estándar interno, criterio que se adoptó en este trabajo, ya que además, este método podría ser utilizado para la detección de otro antimicrobiano del grupo de las quinolonas, como por ejemplo danofloxacin.

Dado que el método desarrollado en este trabajo demostró una buena sensibilidad, correlación, recuperación, precisión y el límite de cuantificación fue menor a 10 ppb, MRL estipulado por el [Center for Veterinary Medicinal Products de la Unión Europea \(1998\)](#) y [W. Health O. \(1995\)](#) para enrofloxacin y su metabolito (ciprofloxacina), pensamos que este podría ser una buena alternativa para el monitoreo de estos metabolitos en diferentes matrices de leche bovina.

Por otro lado, a lo anteriormente señalado, se puede agregar que este método utiliza un sistema de extracción simplificado comparado con métodos previamente publicados ([Roybal y col., 1997](#)), siendo los costos de los agentes químicos bastante reducidos, principalmente porque no se realiza un clean-up con columnas de extracción en fase sólida. Esta característica reduce el tiempo de los análisis (3 muestras por hora), siendo esto importante cuando se debe realizar un gran número de muestras en un plazo fijo o breve, ya que reduce al mínimo la posibilidad de errores analíticos, tal como la señala el [Codex Alimentarius \(1995\)](#).

CONCLUSIONES

Este estudio demostró que concentraciones de 5 ng/ml de enrofloxacin y su metabolito, ciprofloxacina, pueden ser detectadas en leche bovina en polvo, pasteurizada y cruda, después de que las muestras hayan sido sometidas a procesos de extracción muy simples y de bajo costo, obteniéndose además una buena sensibilidad, correlación, recuperación, precisión y límite de cuantificación con la metodología analítica ensayada en este trabajo.

RESUMEN

Se presenta un método rápido por cromatografía líquida de alta resolución, con detección de fluorescencia, para la detección de residuos de enrofloxacin y ciprofloxacina en leche bovina (polvo, pasteurizada y cruda). El procedimiento consistió en sucesivas extracciones de la leche con etanol acidificado, concentrando por sequedad y reconstituyendo para el análisis cromatográfico. Los análisis se desarrollaron usando una fase móvil de acetonitrilo-ácido acético al 2% en una relación de 15:85 y una columna de dimetiloctadecil silica. La detección se realizó con longitudes de onda de excitación y emisión de 278 y 450 nm, respectivamente. El límite de detección y cuantificación fue de 5 ng/ml para enrofloxacin y ciprofloxacina. Ambos analitos presentaron un comportamiento lineal al analizar las diferentes concentraciones de los estándares puros y matrices fortificadas; los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,99. Los porcentajes de recuperación para ambos analitos en las diferentes matrices fluctuaron entre 82,9 y 115%.

BIBLIOGRAFÍA

Center for Veterinary Medicinal Products. 1998. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. Enrofloxacin. EMEA/MRL/389-98 Final July 1998.

Codex Alimentarius. 1995. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Vol. 3; Segunda edición.

Food and Drug Administration. 1997. Guidelines for Industry: Validation of Analytical Procedures.

- García, M. A. C. Solans, J. J. Aramayona, S. Rueda, M.A. Bregante, A. De Jong. 1999. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin, in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.* 13: 350-353.
- Gorbach, S. 1993. Perturbation of intestinal microflora. *Vet. Hum. Toxicol.* 35 (Supplement 1): 15-23.
- Hormazabal, V., A. Rogstad, I. Steffenak, M. Yndestad. 1991. Rapid assay for monitoring residues of enrofloxacin and sarafloxacin in fish tissues by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chrom.* 15: 1605-1614.
- Hutchinson, L. J., P. M. Sears. 1994. Survey of dairy producer attitudes and practices regarding antibiotic use and residue avoidance. American Association of Bovine Practitioners Proceedings 26: 167-168.
- Jones, G. M., E. H. Seymour. 1987. Cowside antibiotic residue testing. *J. Dairy Sci.* 71: 1691-1699.
- Kaartinen, L., M. Salonen, L. Alli, S. Pyorala. 1995. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 18: 357-362.
- Kucers, A. 1980. Current position of chloramphenicol in chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 1-9.
- Manceau, J, M. Gicquel, M. Laurentie, P. Sanders. 1989. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetics studies in pig and rabbit. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 726:175-184.
- Martínez-Larrañaga, M. R, M. J. Diaz, M. A. Martinez, M. T. Frejo, P. Bringas, A. Anadon. 1997. Bioavailability of enrofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20 : 52.
- Reichmuth, J, G. Suhren, R. Beukers. 1997. Evaluation of microbial inhibitor test-the IDF approach. *Milchwissenschaft* 52:691-694.
- Roybal, J. E, A. P. Pfenning, S.B. Turnipseed, C. C. Walker, J. A. Hurlbut. 1997. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *J. AOAC. Int.* 80: 982-987.
- Servicio Agrícola Ganadero. Chile. 1999. Procedimientos para la presentación de antecedentes analíticos. Documento N° 2/99.
- Stahlmann, R, H. Lode. 1989. Consideraciones generales sobre seguridad: Toxicidad. Efectos adversos y modo de interacción de las quinolonas. En: Las Quinolonas. Academic Press Limited. Pp. 221-256.
- Van Arsdel, P. P., Jr. 1983. Adverse drug reactions. Pág. 1389 In: Allergy: principles and practice, Vol. 2, 2nd ed. E. Middleton, Jr., C.E. Reed and E.F. Ellis, ed. C.V. Mosby, St. Louis, MO.
- Webber, A., D. Chaffin, A. Smith, K. E. Opheim. 1985. Quantitation of ciprofloxacin in body fluids by high pressure liquid chromatography. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27: 531-534.
- World Health Organization. 1995. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organization Technical Report Series* 855: 1-59.

Aceptado: 03.05.2001