

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL EN LECHE BOVINA

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR THE ASSAY OF FLORFENICOL IN BOVINE MILK

John D. RUÍZ ^{1*}, Mauren ZAPATA¹ y Carlos LÓPEZ¹.

RESUMEN

Los animales de abasto público tratados con medicamentos se constituyen en un riesgo potencial de contaminación para los alimentos que originan. La hipótesis de este trabajo consiste en verificar si la metodología analítica establecida por Pfenning y colaboradores, es adecuada para la cuantificación de residuos de florfenicol en leche. Se realiza la validación de un método por cromatografía gaseosa (GC) con detector de captura de electrones, ECD, para determinar trazas de florfenicol en leche bovina. Se realiza un estudio de la cinética de la reacción de derivatización propuesto por Pfenning y colaboradores; y se optimiza la reacción. El método analítico modificado presenta selectividad para el cloranfenicol utilizado como patrón interno y el analito de interés, florfenicol. La precisión, medida como coeficiente de variación (CV), presenta resultados entre 12 y 16 % para las concentraciones bajas del rango evaluado, mientras que para las concentraciones altas, el CV es menor de 6 %. A concentraciones mayores de 0.1 ppm y menores de 3.5 ppm se obtienen porcentajes de recuperación entre 99 y 107% y CV entre 4,92 y 8,71 %; el detector ECD muestra linealidad en el rango evaluado; el límite de cuantificación se determina en 0,1 ppm en florfenicol. Los estándares derivatizados permanecen estables por un periodo máximo de 6 días almacenados a 0 °C. El método analítico analizado, es una técnica analítica confiable para la determinación de florfenicol en leche bovina.

Palabras clave: *Antibióticos, cromatografía gaseosa, florfenicol, residuos, leche bovina.*

ABSTRACT

Therapeutical drug treatment of livestock has the potential risk of food contamination by drug residues. The hypothesis of this work consists on verifying the analytical methodology for the quantification of florfenicol residues in bovine raw milk, established by Pfenning et al. The validation was carried out by gas chromatography using electron capture detection (ECD). The derivatization reaction proposed by Pfenning et al. was modified and optimized according to kinetic studies. The modified method shows higher selectivity for cloranfenicol (internal standar) and florfenicol (analyte). The precision, measured as the variation coefficient (VC), shows values between 12% and 16% at low concentrations, and lower than 6% at high concentrations. At concentrations between 0.1 ppm, the and 3.5 ppm recovery efficiency is between 99% and 107% and the VC values between 4.92% and 8.71%. The ECD shows a linear response in the evaluated analyte concentration range. The quantification limit for florfenicol is 0.1 ppm. The derivatized standards remain stable at 0°C for at least 6 days. The present analytical method is reliable to quantify florfenicol in bovine raw milk.

Key words: *Antibiotics, gas chromatography, florfenicol, residues.*

1 Grupo Interdisciplinario en Análisis de Residuos (GIAR). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Antioquia. A.A. 1226 Medellín- Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: didieruiz@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son uno de los recursos terapéuticos más utilizados actualmente en la práctica clínica de la medicina veterinaria; su uso es mucho más marcado en las explotaciones pecuarias, tales como las lecheras, las cuales están sometidas a numerosos problemas infecciosos bacterianos como la mastitis clínica bovina, la metritis, y la neumonía, entre otros. Esto ha hecho que los regímenes terapéuticos para solucionar dichos problemas se constituyan en un riesgo potencial para la salud animal y la salud humana (1). Para la salud animal, las bajas concentraciones de antibióticos en leche pueden generar resistencia hacia los antibióticos en las bacterias que colonizan la glándula mamaria (2). En cuanto a la salud humana, los residuos de antibióticos en leche y otros productos, se asocian frecuentemente con alergias, desórdenes intestinales e infecciones reemergentes por la ineficacia terapéutica de los mismos antibióticos (3).

Entre los grupos farmacológicos de los antibióticos, uno de los más importantes es aquel al cual pertenece el cloranfenicol (CAP); a partir de éste se sintetizó una nueva molécula, denominada florfenicol (FFC), nombre químico d-tri-2,2-dicloro-N-c-a-(fluorometil)-b-hidroxi-p-(fentil)acetamida (Véase figura 1), aprobado para el mercado veterinario, pero no para humanos (4,5).

La FDA (Food and Drug Administration) ha establecido un tiempo de retiro de la carne de bovinos tratados con florfenicol de 28 días después del último tratamiento; mientras que para la leche de vacas tratadas no se ha establecido el nivel seguro o de tolerancia, ni el tiempo de retiro (5).

El objetivo de esta investigación es optimizar un método de análisis por cromatografía gaseosa, para determinar el nivel de residuos de florfenicol en leche de vaca, propuesto por Pfenning y colaboradores (6), y de esta manera establecer recomendaciones de control, que impidan que estos residuos lleguen hasta el hombre, con efectos que aun no se han establecido.

Para validar el método analítico generalmente se determina la selectividad, especificidad, precisión, exactitud, linealidad, rango de respuesta, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad (7).

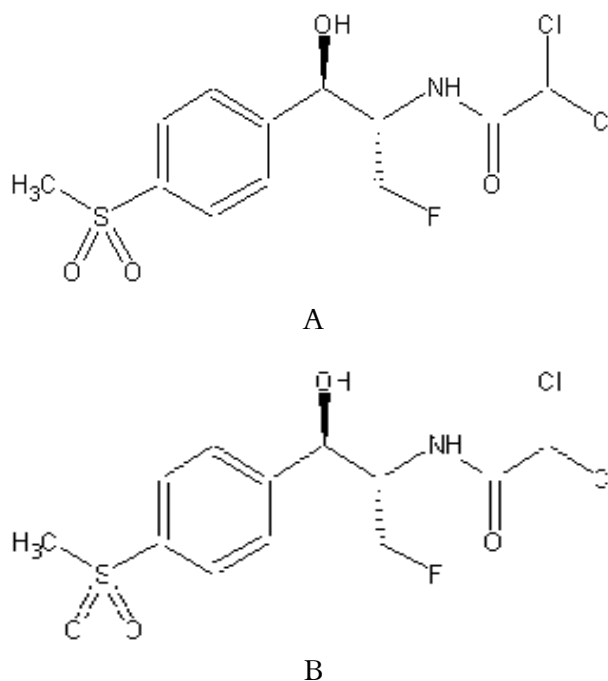


Figura 1.

A estructura del florfenicol. **B** estructura del florfenicol derivatizado con Sylon BFT (99% de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida y 1% de TMCS (trimetilclorosilano)).

La determinación de las concentraciones de florfenicol en los alimentos de origen animal, tiene a disposición diversos métodos analíticos para una amplia gama de matrices (8, 9, 10, 11), pero sólo las que se aplican en leche tienen pertinencia en los estudios de residualidad en leche bovina.

PARTE EXPERIMENTAL

EQUIPO Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis se realiza en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series IIA Plus^o, equipado con controlador electrónico de presión (EPC) y detector de captura de electrones (ECD) con fuente de Ni-63; el software de Cromatografía fue HP-3365 Analyzer 1. Se utiliza una columna capilar de sílica fundida, Rtx[®]- 1 (Crossbond[®] 100% dimetil polisiloxano), 30 m longitud, 0,53 mm diámetro interno, 1.0 mm espesor de película); gas portador helio, gas auxiliar nitrógeno;

flujo total a la salida del detector 54 mL/min; flujo por columna 3,2 mL/min; modo de inyección: split, relación de split 13.75 : 1; temperatura del detector 300⁰C; temperatura del inyector 290⁰C; temperatura inicial del horno 100⁰C durante cero (0) minutos, temperatura final 270⁰C durante 15 minutos, velocidad de incremento de la temperatura del horno 30⁰C / segundo; volumen de inyección 2 µL. Se utilizan además los siguientes equipos: rotaevaporador Heildoph WB 2000; centrífuga con control de temperatura ICE Centra GP8R; ultrasonido ULTRASONIC LC 20H, y agitador vortex FISHER BRAND. El análisis estadístico de los resultados se efectúa utilizando el programa STATGRAPHICS PLUS Versión 4.1.

REACTIVOS

El patrón de florfenicol es suministrado por Schering Plough de México y el cloranfenicol (estándar interno) de Sigma (C-0378). Las soluciones patrón se prepararan en acetonitrilo (Merck) grado pesticida. Como reactivo derivatizante se utiliza Sylon BFT (99% de BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida y 1% de TMCS (trimetilclorosilano)) ó (BSTFA + TMCS, 99:1) suministrado por SUPELCO; tolueno grado análisis, alcohol isopropílico grado análisis y metanol grado análisis, de J.T Baker y EM SCIENCE. Los cartuchos SPE C-18 de 500 mg y volumen de 3 mL de Supelco.

PROCEDIMIENTO

Optimización de la reacción de derivatización

El proceso de derivatización involucra una reacción química entre el analito y el reactivo obteniéndose un producto con propiedades físicas y químicas diferentes. La mayoría de los derivatizantes son empleados para reemplazar un átomo de hidrógeno lábil, adhiriéndolo a un heteroátomo con menor polaridad y grupo no lábil. El resultado es un derivado del analito original más volátil (muy útil para cromatografía gaseosa) que genera picos más simétricos (12) (Véase figura 1).

La derivatización del cloranfenicol y el florfenicol se considera el punto más crítico en el

método analítico, teniendo en cuenta que el rango de concentraciones en las que se aplica el mismo, difiere sustancialmente de las empleadas en el método original (6). La optimización se realiza utilizando patrones combinados de florfenicol y cloranfenicol en acetonitrilo a concentraciones de 2.9 y 1.2 ppm respectivamente.

Para los ensayos iniciales se toma como temperatura de reacción 45⁰C, volumen de derivatizante, 100 µL y tiempo de reacción 15 minutos (6). Los resultados obtenidos permiten determinar tiempos de retención del analito y el patrón interno, sin embargo ante la pobre reproducibilidad observada se inició la optimización de la reacción, variando temperatura, cantidad de reactivo derivatizante y tiempo de reacción.

Los volúmenes de derivatizante para los ensayos son de 100 y 150 µL; tiempos de reacción, desde los 20 hasta los 120 minutos y temperatura de derivatización de 50⁰C.

El análisis de los resultados se realiza teniendo en cuenta el siguiente criterio: los valores óptimos para realizar la reacción de derivatización son aquellos en que ambos compuestos (cloranfenicol y florfenicol) se derivaticen totalmente. Así, aunque uno de los compuestos se derivatice más rápido, se deberá continuar la reacción hasta alcanzar la derivatización total del otro reactivo. Para este efecto el parámetro a evaluar es la relación de áreas, ya que esta medida permite controlar apropiadamente los sesgos atribuidos a la inyección de los estándares en el cromatógrafo.

Los resultados obtenidos con 100 mL de Sylon BFT a diferentes tiempos de reacción y 50⁰C muestran que la relación de áreas FFC / CAP tiende a permanecer estable (2.5) a partir de los 100 minutos; es decir, el tiempo mínimo de reacción sería de 100 minutos cuando se utilizan 100 mL de Sylon BFT y temperatura de 50⁰C. (Véase figura 2).

Los resultados de la derivatización con 150 mL de Sylon BFT a diferentes tiempos de reacción y 50⁰C demuestran que la relación de áreas FFC / CAP tiende a la estabilidad (2.5) a partir de los 40 minutos; en este caso el tiempo mínimo de reacción será de 60 minutos. (Véase figura 3).

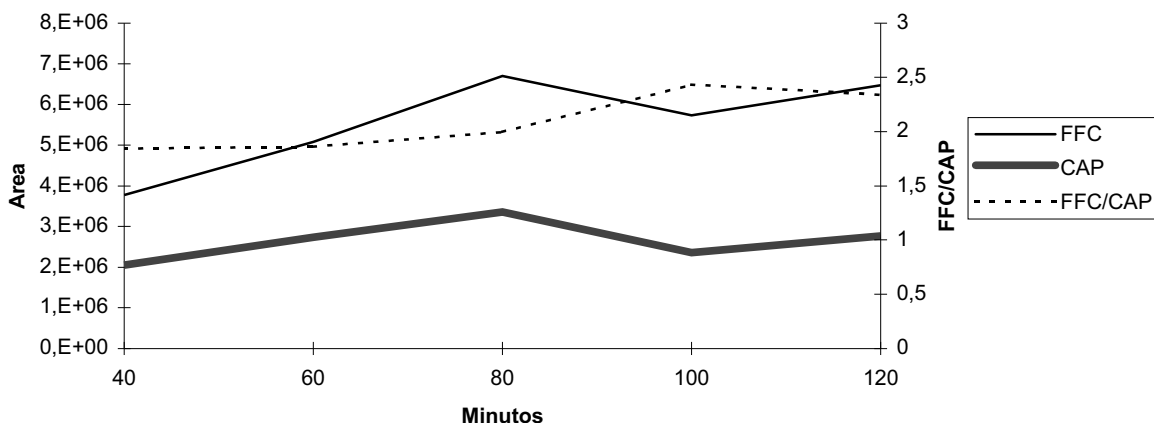


Figura 2.

Eficiencia de la reacción de derivatización según tiempo con 100 mL Sylon BFT.

CAP: Áreas de Cloranfenicol.

FFC: Áreas de Florfenicol.

FFC/CAP: Relación de áreas de Florfenicol / áreas de Cloranfenicol.

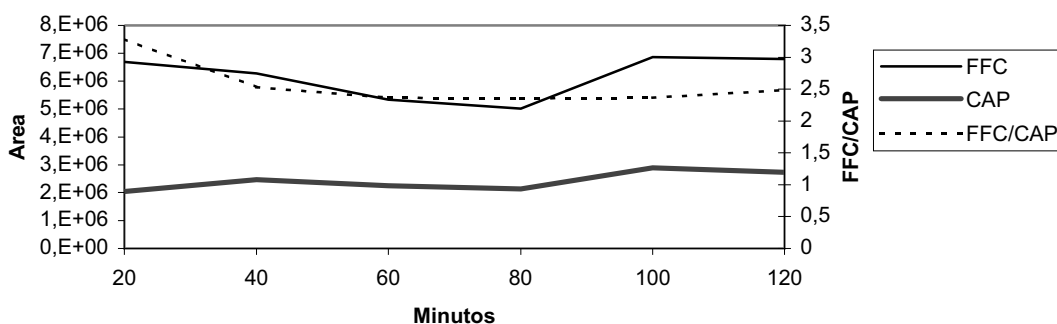


Figura 3.

Eficiencia de la reacción de derivatización según tiempo con 150 mL Sylon BFT.

CAP: Áreas de Cloranfenicol.

FFC: Áreas de Florfenicol.

FFC/CAP: Relación de áreas de Florfenicol / áreas de Cloranfenicol.

De acuerdo con estos resultados se establecen como parámetros para la reacción de derivatización, un volumen de Sylon BFT de 150 μL ; una temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$ y un tiempo de 60 minutos.

Procedimiento para el análisis de muestras de leche

Fortificación, extracción y derivatización.

Cinco mililitros (5 mL) de leche cruda se fortifican con florfenicol, se depositan en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL. Se añaden 25 mL de acetonitrilo, se mezcla por 30 segundos y se centrifuga a 0 $^{\circ}\text{C}$ durante 7 minutos a 4000

r.p.m. Se decanta el líquido sobrenadante a un balón de vidrio en forma de pera de 100 mL; se añaden 10 mL de alcohol isopropílico para impedir la formación de espuma y se evapora hasta sequedad.

Seguidamente se adicionan 4 mL de agua al balón que contiene el extracto de leche y se coloca en el ultrasonido 30 segundos. Se toma esta mezcla con una pipeta Pasteur de 9 pulgadas y se deposita en la columna SPE-C18 previamente acondicionada con 3 mL de metanol y 3 mL de agua.

Se lava el balón dos veces más con 2 mL de agua, agitando en el vortex y posteriormente en el ultrasonido durante 30 s; se pasa el contenido del balón a la columna SPE. Después de que todo

el líquido eluye por la columna se hace el vacío durante 1 minuto; el líquido que pasa a través de la columna se descarta. Luego se eluyen los compuestos retenidos en la columna con 3 mL de metanol - agua desionizada (MeOH-H₂O 60:40); se colecta en un balón de vidrio en forma de pera de 50 mL y se lleva a sequedad en rotaevaporador a 60 °C.

El residuo se lava con 1 mL de MeOH-ACN (50:50), se agita en el ultrasonido durante 30 segundos. Luego del lavado, se toma el líquido con una pipeta Pasteur y se deposita en el tubo de centrifuga de 15 mL con tapa. La operación de lavado se realiza tres veces. Se adiciona 1 mL de estándar interno, cloranfenicol, de 1ppm; la mezcla se seca con flujo de nitrógeno. El residuo o extracto obtenido, de color amarillo, está listo para la derivatización. Ésta se inicia añadiendo 150 µL del agente derivatizante (Sylon BTF[®]). La mezcla se agita sobre el vortex aproximadamente 15 s; se lleva al baño María a 50 °C durante 60 minutos; a los 30 minutos de iniciada la reacción se agita la mezcla en el vortex; la operación se repite al finalizar la reacción de derivatización. Se remueve el tubo del baño María, se añaden 500 µL de tolueno seguido rápidamente por 150 µL de agua y se detiene la derivatización; nuevamente se agita vigorosamente sobre el mezclador vortex 30 segundos y se deja en reposo durante 10 minutos aproximadamente, para permitir la separación de las fases insolubles.

Se remueve cuidadosamente la capa superior con una pipeta Pasteur y se deposita en un vial de 2 mL con tapa, para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases.

Preparación de la curva estándar

Para realizar el proceso de cuantificación se preparan estándares de florfenicol a seis niveles de concentración y un blanco de reactivos, en una matriz similar a las muestras objeto de estudio (leche). Se adiciona cloranfenicol como estándar interno. Se prepara también un blanco de reactivos constituido por acetonitrilo, alcohol isopropílico, cloranfenicol, Sylon BFT, tolueno y agua.

El método de preparación se inicia midiendo 30 mL de leche cruda (5 mL por cada estándar a preparar) en un tubo de centrifuga de polipropileno de 700 mL; se añaden 150 mL de acetonitrilo (ACN), se agita por 30-40 segundos y se centrifuga

a 0°C por 7 minutos a 4000 r.p.m. El sobrenadante se coloca en un balón de vidrio en forma de pera de 300 mL, se añaden 60 mL de alcohol isopropílico (IPA) para prevenir la formación de espuma, se evapora en un evaporador rotatorio hasta aproximadamente 1 mL de residuo aceitoso amarillo. A continuación se agregan 6 mL de agua y se agita por 30 segundos en el vortex. Se toma esta mezcla con una pipeta Pasteur de 9 pulgadas y se aplica a la columna de SPE C-18 previamente acondicionada e instalada sobre una cámara de vacío (-0,6 bar o 1 gota/s). El balón se lava 2 veces con 3 mL de agua agitando y aplicando el contenido a la columna SPE. Después de que todo el líquido ha eluido a través de la columna, se deja al vacío 1 minuto mas. Se descarta todo el líquido colectado y se eluye la columna con 3 mL de metanol - agua (MeOH-H₂O 60:40); se colecta el eluato en un balón en forma de pera de 50 mL y se lleva a sequedad en el rotaevaporador a 60 °C. Este extracto se pasa del balón a un tubo de centrifuga de 15 mL con tapa; lavando tres veces con 1 mL MeOH-ACN (50 + 50), agitando con el ultrasonido aproximadamente 30 s. Los lavados se vierten al tubo de centrifuga con la pipeta Pasteur.

El extracto obtenido se divide en seis alícuotas; a cada una se adiciona 1 mL de solución estándar de florfenicol a una concentración de 1 ppm. El rango de concentraciones de florfenicol a evaluar está entre 0,1 ppm y 3,5 ppm (Véase tabla 2). Además del blanco de reactivos mencionado anteriormente.

Estas soluciones se llevan a evaporación total con flujo de nitrógeno y finalmente se someten al proceso de derivatización (como se describe en la optimización de la reacción de derivatización).

Luego se analizan por GC a las condiciones descritas al inicio de la parte experimental.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La separación cromatográfica del analito de interés (florfenicol) y del estándar interno (cloranfenicol), se logra a las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. En la figura 4 se superponen los cromatogramas obtenidos al inyectar florfenicol y cloranfenicol individualmente; éstos se preparan en extracto de leche y se derivatizan de acuerdo al método analítico optimizado. Los tiempos de retención obtenidos son 8.7 y 9.5 minutos respectivamente.

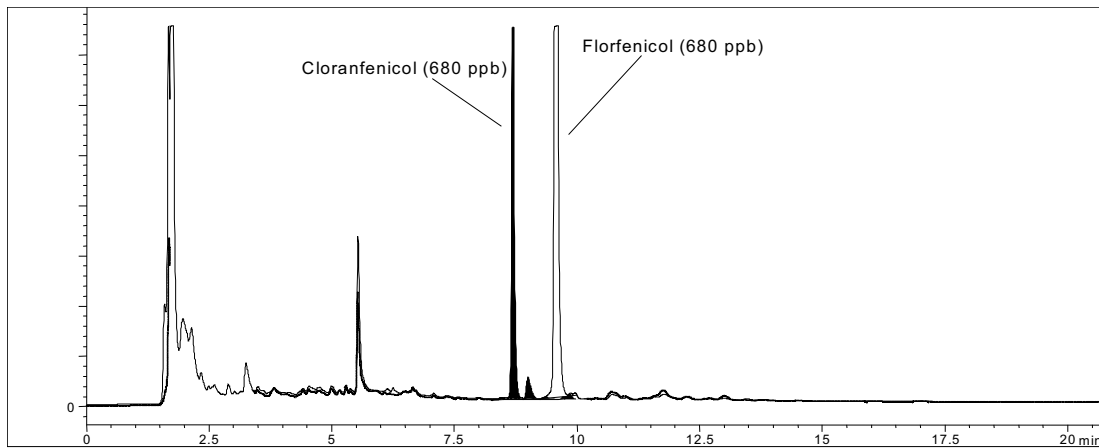


Figura 4.

Superposición de dos cromatogramas. Estándar de Cloranfenicol a 680 partes por billón (ppb) y estándar de Florfenicol a 680 ppb en leche.

Después de inyectar en el cromatógrafo a las condiciones cromatográficas descritas anteriormente; una mezcla de florfenicol y patrón interno derivatizados, además de un blanco constituido por acetonitrilo, Sylon BFT, tolueno y agua. Se observa en los cromatogramas, que los tiempos de retención permanecen constantes llevan-

do a concluir que el método de derivatización empleada y la técnica cromatográfica utilizada permiten separar los derivados del florfenicol y cloranfenicol sin presencia de interferencias que alteren su cuantificación. En este caso se verifica que la técnica es selectiva y específica (Véase figura 5).

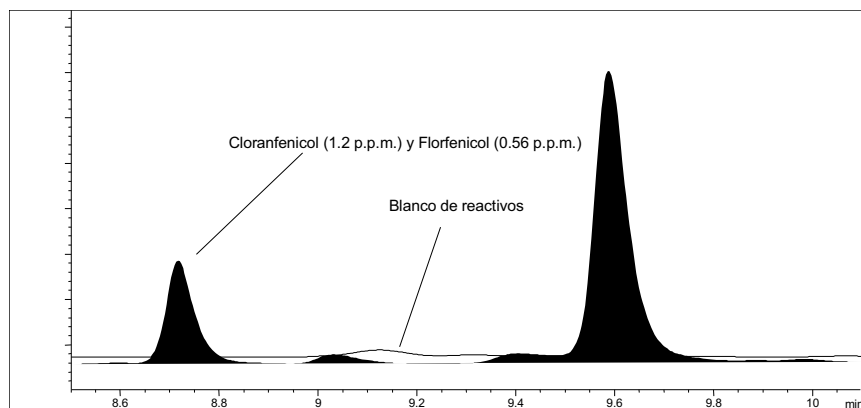


Figura 5.

Superposición de dos cromatogramas. Estándar combinado de Cloranfenicol (1.2 ppm.) y Florfenicol (0.56 ppm.) y un blanco de reactivos (acetonitrilo, Sylon BFT, Tolueno y agua).

La evaluación de la precisión del método cromatográfico se realiza a las condiciones anteriormente mencionadas, utilizando seis niveles de concentración de florfenicol; cada nivel se inyecta

cuatro veces en el cromatógrafo de gases. La respuesta se valora mediante el cociente del área de florfenicol sobre el área del cloranfenicol, de las desviaciones estándar y del coeficiente de variación, (Véase tabla 1).

Tabla 1. Relación promedio de área de florfenicol sobre área de cloranfenicol (AFFC/ACAP); desviaciones estándar y coeficientes de variación, empleando estándares de diferentes concentraciones de florfenicol. Concentración de cloranfenicol 1,32 ppm

Nivel de fortificación con florfenicol en extracto leche (estándares) y rango de concentración correspondiente en ppm.						
ppm	0.135	0.27	0.54	1.08	2.16	3.24
	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
	0.212	0.567	2.02	3.99	9.50	14.0
Mediciones	0.252	0.685	1.98	3.73	9.88	15.3
AFFC/ACAP	0.300	0.453	1.82	3.98	9.66	13.3
	0.269	0.476	2.00	4.36	10.0	13.8
\bar{X}	0.256	0.545	1.95	4.01	9.76	14.0
S	0.032	0.091	0.081	0.22	0.19	0.054
CV	12.42	16.76	4.16	5.60	2.00	5.40

AFFC/ACAP: Área del florfenicol / Área del cloranfenicol.

C.V. Coeficiente de variación ppm: partes por millón

S: Desviación estándar

Los resultados de la tabla 1, muestran, como era de esperarse, que los patrones con las concentraciones más bajas presentan el mayor coeficiente de variación; lo cual se acepta para las condiciones experimentales del trabajo, en donde la matriz (leche) es muy compleja y el analito especialmente en concentraciones bajas, se puede ver afectado por otros componentes como proteínas, grasas.

Con los resultados obtenidos en el proceso de extracción, derivatización y análisis cromatográfico de las muestras de leche, se determina la exactitud del método evaluando el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los niveles de fortificación fueron los que aparecen en la tabla 1, y cada uno se realiza por triplicado.

Los porcentajes de recuperación obtenidos, en los que al igual que en la medición de la precisión del método, las concentraciones menores son las que presentan porcentajes de recuperación mayores del 100% y coeficientes de variación supe-

riores al 10%. Estos resultados hablan acerca de la complejidad de la matriz estudiada y su influencia en la recuperación de los analitos que se encuentran en menor concentración. Los niveles de concentración superiores a 0.20 ppm presentaron porcentajes de recuperación bastante aceptables para el método analítico propuesto. (Véase tabla 2).

La linealidad del detector, se evalúa utilizando patrones preparados en la forma descrita previamente. El rango de concentraciones utilizadas fue el que se esperaba encontrar en las muestras reales. (Véase tabla 2).

Al realizar la regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados se obtiene que la ecuación ajustada en la que $Y = -0.516693 + 1.1681 X$. Donde Y representa área florfenicol sobre área Cloranfenicol y X representa la concentración florfenicol sobre concentración cloranfenicol; -0.516693 es el valor de la pendiente (valor de $P = 0.0168$) y 1.1681 es el valor del intercepto (valor de $P = 0.000$)

Tabla 2. Porcentajes de recuperación, desviación estándar y coeficientes de variación del florfenicol en leche bovina fortificada a diferentes niveles de concentración.

Niveles de concentración de florfenicol en leche						
Nivel	I	II	III	IV	V	VI
ppm.	0.10-0.15	0.20-0.30	0.50-0.60	1.00-1.50	2.00-2.50	3.00-3.50
%R	146.45	107.62	102.68	100.84	98.13	99.14
S	19.72	6.40	6.77	8.78	6.31	4.88
C.V.	13.50	6.00	6.60	8.71	6.43	4.92

ppm: Partes por millón

% R: Porcentaje de recuperación Promedio

S: Desviación estándar

C.V: coeficiente de variación

La curva de regresión lineal de las áreas de área florfenicol sobre área cloranfenicol (Y) vs concentración florfenicol sobre concentración cloranfenicol (X) dan como resultado un coeficiente de correlación: 0.997034, un R^2 : 99.4077, lo cual indica

que el 99.4% de las variaciones en el cambio de Y se deben a cambios en el cociente de X (cambios en la concentración del florfenicol en la muestra). (Véase figura 6).

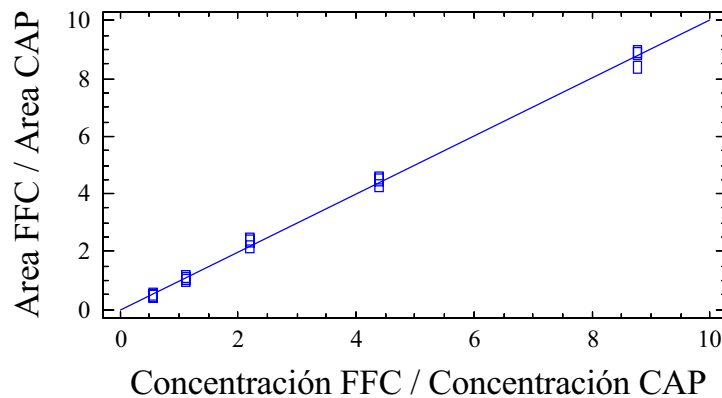


Figura 6.

Análisis de regresión lineal área de florfenicol / área de cloranfenicol (AFC/AP) vs Concentración del florfenicol / concentración del cloranfenicol
 FFC: Florfenicol, CAP: Cloranfenicol. $Y = -0,516693 + 1,1681 X$.
 X.. El coeficiente de correlación = 0.9970 y $R^2 = 99.4077$.

El límite de detección se mide a partir del nivel del ruido del detector de captura de electrones empleado. Se define como tres veces el nivel del ruido medido en el cromatograma obtenido de una muestra de leche libre de florfenicol.

Para determinar el límite de cuantificación se emplea el mismo cromatograma de leche sin fortificar y se define como diez veces el ruido. En este caso el límite de cuantificación fue de 0.10 ppm de florfenicol.

Para determinar la estabilidad de los estándares, se toma como indicador de la misma, el coeficiente de correlación entre área florfenicol / área cloranfenicol (Y) vs. concentración florfenicol / concentración cloranfenicol (X) (método para la cuantificación de florfenicol en estándares) de los 6 niveles de concentración evaluados. (Véase tabla 2). La determinación del coeficiente de correlación se realiza con todos los niveles de concentración de los estándares

durante los días 1, 2, 3, 4, 6 y 8 después de su preparación y almacenamiento a 0 °C. Se fija que los coeficientes de correlación deberían ser iguales o mayores a 0.98 para permitir un proceso de

cuantificación confiable. Los resultados permiten establecer que el tiempo máximo de almacenamiento de los estándares de seis días a 0 °C. (Véase tabla 3)

Tabla 3. Variación de los coeficientes de correlación de AFFC/ACAP de estándares de diferentes concentraciones de florfenicol. Cloranfenicol como estándar interno (1,32 ppm.) almacenados a 0 °C durante 8 días.

Día	1	2	3	4	6	8
Coefficiente Correlación	0.9979	0.9998	0.9942	0.9974	0.9898	0.6506

Nota: Los niveles de concentración de florfenicol evaluados fueron 0; 0.135; 0.27; 0.54; 1.08; 2.16; 3.24 ppm.

CONCLUSIONES

- Se logró optimizar un método de análisis por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones para la determinación de florfenicol en leche de vaca. La validación del método tiene como puntos críticos el proceso de derivatización tanto del analito de interés como del patrón interno. Para asegurar la derivatización total de las dos sustancias a las concentraciones esperadas en la leche, se recomienda utilizar 150 µL de Syton BFT, 50°C y 60 minutos para la reacción.
- El método fue sensible y selectivo para el florfenicol y el patrón interno utilizado y presentó porcentajes de recuperación aceptables para las concentraciones estudiadas.
- Se recomienda el método analítico descrito en este trabajo para la determinación de las concentraciones del florfenicol en leche bovina, en el rango de concentraciones evaluado.
- Los resultados de la aplicación de este método analítico en la cuantificación de florfenicol en leche bovina de vacas tratadas por vía intramuscular e intramamaria, se publicaran en otro artículo.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Juan Manuel Palacio de Schering Plough México por su colaboración con el suministro del patrón de florfenicol y a la Universidad de Antioquia y al CODI por la financiación del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

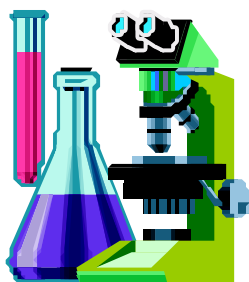
1. Scott, A; Meek, A. and Black, W. (1991). The epidemiology of antibiotic residues (inhibitors) in milk. In: Highlights of Agricultural Research in Ontario. 14(4): 8 - 11
2. Selim, S. and Cullor, J. (1997). Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. Journal American Veterinary Medical Association. 211(8):1029 - 1035.
3. Ormerod, A; Reid, M. and Main, R. (1987). Penicillin in milk - its importance in urticaria. Clinical Allergy. 17: 229 - 234.
4. Varma K; Adams P; Powers T; Powers J, and Lamendola. (1986). Pharmacokinetics of florfenicol in vael. Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics. 9: 412 - 425.
5. Smucker J. (1998). Milk Safety Branch. FDA. Center for food safety and applied nutrition. M-I- 98-4. April.
6. Pfenning, A.P; Madson, M.R; Roybal, J.E. Turnipseed, S.B; Gonzales, S.A; Hurlbut, J.A. and Salomon, G.D. 1998. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol residues in milk by chromatography with electron capture detection. Journal AOAC International. 81(4) :714-720.
7. Ludwig H. (1998). Validation of analytical methods review and strategy. LC-GC International. February 96-105.
8. Soback, S; Paape, M; Filep, R. and Varma, K. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administrations. Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics. 18(6):413 - 417.
9. Otero, P.E; Rebuelto, M; Albarrellos, G; Kreil, V; Ambros, L; Denamiel, G; Gentilin, E; Hallu, R.E. (1999) .Farmacocinética del florfenicol en bovinos en lactación. Investigaciones Veterinarias. 1(1):33-37.
10. Nagata T. and Oka H.(1996). Detection of residual chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography - mass spectrometry. Journal Agriculture Food Chemistry. 44:1280 - 1284.
11. Hormazabal, V; Steffenak, I. and Yndestad, M. (1996). Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 724:364 - 366.
12. Majors R E. Sample preparation in analytical chemistry (organic analysis). (1997). Settle F. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Prentice Hall PTR. New Jersey. p 48-52.

Fecha de Recibo: Junio 11 de 2003

Fecha de Aceptación: Julio 7 de 2003

Servicios de extensión de la Facultad de
Química Farmacéutica
LABORATORIO ESPECIALIZADO DE ANÁLISIS
-LEA-

Presta el servicio de verificación de la calidad a materias primas, medicamentos, alimentos, cosméticos y similares.



Mayores Informes

Teléfono: 2 10 54 58 Telefax: 2 10 54 56
Dirección electrónica: lea@muiscas.udea.edu.co

SERVICIOS DE EXTENSIÓN DE LA FACULTAD DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA Y ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA
LABORATORIO DE ANÁLISIS SENSORIAL

Presta servicios a: * Industrias de alimentos
* Trabajos de investigación

Cuenta con: Jueces capacitados bajo normas técnicas
Colombianas NTC 4129 y 4130

Informes: Universidad de Antioquia
Fax 2 30 50 07 Medellín –Colombia
Correo electrónico: labsensorial@pijaos.udea.edu.co