

**UNIVERSITAT JAUME I DE CASTELLÓ
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA
I CIÈNCIES EXPERIMENTALS
DEPARTAMENT DE QUÍMICA FÍSICA I ANALÍTICA**



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS
MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA
LÍQUIDA MICEL·LAR EN MOSTRES
FISIOLÒGIQUES I D'ALIMENTS**

**Tesi Doctoral
Maria Rambla Alegre
Castelló, Març 2011**



Departament de Química Física i Analítica

**Determinació d'antibiòtics mitjançant
cromatografia líquida micel·lar en mostres
fisiològiques i d'aliments**

MEMÒRIA que per assolir el
GRAU de DOCTORA en
QUÍMICA presenta la LLICENCIADA
Maria Rambla Alegre

Castelló, Març de 2011



D. JOSEP ESTEVE ROMERO i SAMUEL CARDA BROCH, Catedràtic i Professor Titular d'Universitat, respectivament, de l'àrea de química analítica, adscrits al Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I,

CERTIFIQUEN

que la present Memòria, "*Determinació d'antibiòtics mitjançant cromatografia líquida micel·lar en mostres fisiològiques i d'aliments*", constitueix la Tesi Doctoral de:

MARIA RAMBLA ALEGRE

Així mateix, certifiquen haver dirigit i supervisat les parts teòriques, metodològiques, instrumentals i aplicacions dels diferents aspectes del treball, així com també la seua redacció.

I per que conste als efectes oportuns, signem la present en Castelló a 24 de Gener de 2011.

Josep Esteve i Romero

Samuel Carda Broch

Aquest treball ha sigut realitzat gràcies a una
Beca de Formació de Professorat Universitari
del Ministerio de Educación y Ciencia.

Aquesta és una bona oportunitat per poder agrair a molta gent el seu suport. Preparar esta Tesis ha sigut un treball dur però també m'ha donat moltes alegries gràcies al recolzament, amistat i bons moments que he rebut durant aquests últims anys.

En primer lloc mostrar el meu agraïment als directors d'aquesta Tesi que m'han sabut guiar a través del difícil camí de la investigació amb bon humor i bones paraules. I per haver dipositat la seua confiança en mi per poder portar endavant aquest projecte.

Thanks to Zuzana Bosakova for allowing me to be one more of her investigation group and for all her help and advices during my stay in Praha.

Thanks to Patrick Sandra and Frederick Lynen, for giving me the chance to participate in their research group in Ghent and for supporting me during my stay.

Als meus amics i companys que han passat durant aquest temps pel laboratori: Llorenç, Marieli, Mayte, Lluís, Mei-Liang, Aida, Mónica, Juan, Beatriz, Sergio, Inma, per ajudar-me en el treball i sobretot, compartir amb mi molts bons moments. I també, moltes gràcies a tots aquells companys de la UJI que dia a dia han estat compartint cafès, hores de gimnàs, dinars i per descomptat, moments molt entretinguts durant els darrers anys.

I per últim, a la meua família i amics: als meus pares, per estar sempre al meu costat, pels seus ànims i consells; al meu germà, als meus cosins i oncles pels seus ànims. I per descomptat a Julián pel seu suport incondicional. Gràcies per la vostra paciència i recolzament.

A tots, moltíssimes gràcies.

ÍNDEX

Objectius i desenvolupament de la Tesi Doctoral	1
Comunicacions a congressos científics.....	4
Articles científics	6
Capítol 1. Conceptes bàsics de la cromatografia líquida micel·lar	9
1.1. Resum	9
1.2. Introducció	10
1.3. Cromatografia líquida de parells iònics en fase inversa i el naixement de la cromatografia líquida micel·lar	11
1.4. Naturalesa de la fase mòbil i la fase estacionaria en MLC	12
1.4.1. Fase mòbil micel·lar	13
a) Concentració micel·lar crítica.....	15
b) Punt de Krafft i punt de terbolesa	16
c) pH de la fase mòbil	17
d) Tipus i concentració de dissolvents orgànics	17
1.4.2. Fase estacionaria.....	18
a) Adsorció del tensioactiu	18
b) Addició d'un dissolvent orgànic a les fases mòbils micel·lars	22
c) Ús de fases estacionàries de porus gran	22
d) Supressió de l'activitat dels grups silanol	23
1.5. Cura de la columna cromatogràfica en MLC	24
1.5.1. Saturació de la fase mòbil	24
1.5.2. Condicionament de la columna.....	25

1.5.3. Bombeig de la fase mòbil	25
1.5.4. Regeneració de columnes en fase inversa recobertes amb un tensioactiu	26
1.6. Interaccions solut-micel·lar i solut-fase estacionaria	27
1.6.1. Naturalesa de les interaccions	29
1.6.2. Solutos enllaçants, no enllaçants i antienllaçants	29
1.7. Descripció del comportament de retenció en fases mòbils micel·lars	31
1.7.1. Models empírics	32
1.7.2. Models mecanicistes	35
1.7.3. Modelització dels perfils de pic	36
1.7.4. Estratègies per a la mesura de la resolució de pics.....	37
1.8. Cromatografia líquida submicel·lar	40
1.9. Conclusions.....	41
1.10. Referències.....	43
Capítol 2. Protocols de validació per a mètodes analítics	47
2.1. Resum	47
2.2. Objectiu de la validació	48
2.3. Bones pràctiques de laboratori.....	48
2.4. Validació de mètodes	51
2.5. Perquè és necessari validar un mètode?	55
2.5.1. Importància de la mesura analítica.....	55
2.5.2. L'obligació professional del químic analític	55
2.6. Quan s'ha de validar un mètode?.....	56
2.7. Qui realitza la validació?	57

2.8. Principis de validació	57
2.9. Estratègies de validació	60
2.10. Establiment de l'abast de la validació	61
2.11. Revalidació	65
2.12. Idoneïtat del sistema	66
2.13. Principals paràmetres de validació d'un mètode analític	67
2.13.1. Confirmació d'identificació, selectivitat i especificitat	68
2.13.2. Calibrat, rang i linealitat.....	69
2.13.3. Sensibilitat.....	71
2.13.4. Límit de detecció	72
2.13.5. Límit de quantificació.....	73
2.13.6. Exactitud	74
2.13.7. Veracitat.....	74
2.13.8. Precisió.....	75
2.13.9. Incertesa d'una mesura	76
2.13.10. Recuperació.....	77
2.13.11. Estabilitat analítica de la mostra.....	78
2.13.12. Robustesa	79
2.13.13. Límit de decisió i capacitat de detecció.....	80
2.14. Transferència de mètodes analítics de rutina validats.....	81
2.15. Protocols, normes i guies de validació existents.....	82
2.16. Referències.....	83

Part I. Anàlisi d'antibiòtics en fluids fisiològics i productes farmacèutics

Capítol 3. Desenvolupament i validació d'un mètode d'anàlisi per a la determinació d'amoxicil·lina utilitzant cromatografia líquida micel·lar	89
3.1. Resum	89
3.2. Introducció	90
3.3. Part experimental	93
3.3.1. Reactius	93
3.3.2. Instrumentació	93
3.3.3. Preparació de dissolucions estàndard, mostres i fases mòbils	94
3.3.4. Condicions cromatogràfiques	94
3.4. Resultats i discussió	95
3.4.1. Selecció del pH i de la columna	95
3.4.2. Selecció de la composició de la fase mòbil	97
3.4.3. Comportament de la matriu d'orina	100
3.4.4. Validació del mètode	102
a) Selectivitat	102
b) Linealitat	102
c) Límits de detecció i de quantificació	103
d) Precisió i exactitud	103
e) Robustesa	103
f) Estabilitat	105
g) Anàlisi en preparacions farmacèutiques	105
h) Determinació d'amoxicil·lina en mostres d'orina adicionades	106
i) Control en mostres reals d'orina	106
3.5. Conclusions	108
3.6. Referències	108

Capítol 4. Anàlisi cromatogràfic de mostres d'orina i medicaments que contenen antibiòtics del grup de les penicil·lines	111
4.1. Resum	111
4.2. Introducció	112
4.3. Part experimental	116
4.3.1. Reactius	116
4.3.2. Instrumentació i condicions cromatogràfiques	116
4.3.3. Preparació de dissolucions estàndard, mostres i fases mòbils	117
4.3.4. Determinació en preparacions farmacèutiques	117
4.4. Resultats i discussió.....	118
4.4.1. Selecció del pH de la fase mòbil	118
4.4.2. Estabilitat dels antibiòtics	119
4.4.3. Optimització cromatogràfica: selecció de la columna i la fase mòbil	120
4.4.4. Comportament de la matriu d'orina	124
4.4.5. Validació del mètode	129
a) Selectivitat	129
b) Linealitat.....	129
c) Límits de detecció i de quantificació	130
d) Precisió i exactitud.....	130
e) Robustesa.....	131
g) Recuperacions.....	132
4.4.6. Anàlisi de medicaments i mostres d'orina.....	137
a) Preparacions farmacèutiques comercials	137
b) Mostres reals d'orina.....	140
4.5. Conclusions.....	144
4.6. Referències.....	145

Capítol 5. Validació d'un mètode de cromatografia líquida micel·lar per a la determinació de quinolones en mostres de orina mitjançant injecció directa i detecció fluorimètrica	149
5.1. Resum	149
5.2. Introducció	150
5.3. Part experimental	153
5.3.1. Reactius	153
5.3.2. Instrumentació i condicions cromatogràfiques	153
5.3.3. Preparació de dissolucions estàndard, mostres i fases mòbils	154
5.4. Resultats i discussió.....	155
5.4.1. Fluorescència de las quinolones	155
5.4.2. Estratègia d'optimització i selecció de la fase mòbil	155
5.4.3. Validació del mètode	162
a) Selectivitat	162
b) Linealitat.....	163
c) Límits de detecció i de quantificació	163
d) Precisió i exactitud.....	165
e) Robustesa.....	165
f) Recuperacions	166
g) Aplicació del procediment a l'estudi de l'excreció urinària dels antibiòtics	170
5.5. Conclusions.....	173
5.6. Referències.....	174

Capítol 6. Separació i determinació simultània de quinolones en medicaments mitjançant cromatografia líquida micel·lar	177
6.1. Resum	177
6.2. Introducció	178
6.3. Part experimental	181
6.3.1. Reactius	181
6.3.2. Instrumentació	181
6.3.3. Condicions cromatogràfiques.....	181
6.3.4. Preparació de dissolucions estàndard i fases mòbils	182
6.3.5. Preparació de les mostres de medicaments.....	182
6.4. Resultats i discussió.....	183
6.4.1. Selecció de la fase mòbil.....	183
6.4.2. Estratègia d'optimització	184
6.4.3. Validació del mètode	187
a) Linealitat	187
b) Límits de detecció i de quantificació	188
c) Precisió i exactitud	188
d) Robustesa.....	188
e) Anàlisi de medicaments	191
6.5. Conclusions.....	196
6.6. Referències.....	196

Part II. Anàlisi d'antibiòtics en aliments

Capítol 7. Determinació de sulfamides en llet mitjançant cromatografia líquida micel·lar prèvia derivatització i acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall.....	201
7.1. Resum.....	201
7.2. Introducció.....	202
7.3. Reacció de derivatització.....	206
7.4. Part experimental.....	209
7.4.1. Reactius.....	209
7.4.2. Instrumentació.....	209
7.4.3. Preparació de dissolucions, mostres i fases mòbils.....	210
7.4.4. Formació dels azocolorants de les sulfamides.....	210
7.5. Resultats i discussió.....	211
7.5.1. Estratègia d'optimització i selecció de la fase mòbil.....	211
7.5.2. Comportament de la senyal de fons de la llet.....	213
7.5.3. Validació del mètode.....	213
7.5.4. Determinació en mostres de llet adicionades.....	217
7.6. Conclusions.....	218
7.7. Referències.....	218

Capítol 8. Control de quinolones en mostres de llet i ou mitjançant cromatografia líquida utilitzant fases mòbils que contenen un tensioactiu	221
8.1. Resum	221
8.2. Introducció	222
8.3. Part experimental	226
8.3.1. Reactius	226
8.3.2. Instrumentació i condicions cromatogràfiques	226
8.3.3. Preparació de dissolucions estàndard i fases mòbils	227
8.3.4. Preparació de mostres de llet i ou	228
8.3.5. Validació del mètode	228
8.4. Resultats i discussió	228
8.4.1. Fluorescència de les quinolones	228
8.4.2. Optimització de les condicions cromatogràfiques	229
a) Selecció del pH	229
b) Comportament cromatogràfic de les quinolones	230
c) Selecció de la fase mòbil	231
8.4.3. Validació del mètode	235
a) Selectivitat	235
b) Linealitat	235
c) Límits de detecció i quantificació	238
d) Límit de decisió i capacitat de detecció	238
e) Precisió i exactitud	240
f) Robustesa	242
g) Anàlisi de llet i ous	243
8.5. Conclusions	249
8.6. Referències	249

Capítol 9. Anàlisi d'antibiòtics en peix amb fases mòbils micel·lars híbrides i detecció fluorimètrica. Validació del mètode seguint la regulació 2002/657/EC	253
9.1. Resum	253
9.2. Introducció	254
9.3. Part experimental	257
9.3.1. Reactius	257
9.3.2. Instrumentació i condicions cromatogràfiques	257
9.3.3. Preparació de dissolucions estàndard i fases mòbils	258
9.3.4. Preparació de mostres de peix	258
9.3.5. Validació del mètode	259
9.4. Resultats i discussió	259
9.4.1. Estratègia d'optimització i selecció de la fase mòbil	259
9.4.2. Optimització de l'etapa de preparació de la mostra	264
9.4.3. Validació del mètode	264
a) Selectivitat	264
b) Linealitat i sensibilitat	267
c) Límit de decisió i capacitat de detecció	267
d) Precisió i exactitud	270
e) Robustesa	270
f) Anàlisi de mostres de peix	271
9.5. Conclusions	277
9.6. Referències	277

Part III. Anàlisi de compostos relacionats

Capítol 10. Anàlisi d'omeprazole i els seus principals metabolits mitjançant cromatografia líquida amb fases mòbils micel·lars híbrides.....	283
10.1. Resum	283
10.2. Introducció	284
10.3. Part experimental.....	287
10.3.1. Reactius	287
10.3.2. Instrumentació	288
10.3.3. Preparació de fases mòbils, dissolucions estàndard i mostres	288
10.3.4. Condicions cromatogràfiques	289
10.3.5. Determinació d'omeprazole en medicaments.....	289
10.4. Resultats i discussió.....	290
10.4.1. Selecció de la fase mòbil i optimització cromatogràfica.....	290
10.4.2. Comportament de las mostres de sèrum i orina	291
10.4.3. Validació del mètode	294
a) Selectivitat	294
b) Linealitat, límits de detecció i quantificació	294
c) Precisió i exactitud	296
d) Robustesa.....	296
e) Estabilitat	299
f) Anàlisi d'omeprazole en medicaments.....	299
g) Determinació d'omeprazole en mostres adicionades	300
h) Control en mostres reals.....	302
10.5. Conclusions.....	304
10.6. Referències.....	305
Conclusions.....	309

EUROPEAN DOCTORATE MENTION

Determination of antibiotics by micellar liquid chromatography in physiological and food samples

Requirements.....	325
Objectives and development of the research work.....	326
Scientific communications	329
Articles	331
Summary	334
Chapter 1. Basic principles of micellar liquid chromatography.....	334
Chapter 2. Validation protocols for analytical methods	337
 Part I. Analysis of antibiotics in physiological and pharmaceutical formulations	
Chapter 3. Development and validation of an analytical method for the determination of amoxicillin by micellar liquid chromatography.....	339
Chapter 4. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection.....	341
Chapter 5. Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection.....	343
Chapter 6. Simultaneous separation and determination of quinolones in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography	345

Part II. Analysis of antibiotics in food

Chapter 7. Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography.....	346
Chapter 8. Quinolones control in milk and eggs samples by liquid chromatography using a surfactant-mediated mobile phase	348
Chapter 9. Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC	350
 C) Analysis of related compounds	
Chapter 10. Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases.....	352
 Conclusions	 353
 Published articles	 369

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1. Entorn del solut en un sistema cromatogràfic amb una fase estacionaria octadecil (C18), i una fase mòbil que conté el tensioactiu aniònic SDS. S'han representat els equilibris entre el dissolvent, la micel·la i la fase estacionaria modificada pel tensioactiu.....	20
Figura 1.2. Entorn del solut en un sistema cromatogràfic amb una fase estacionaria cianopropil, i una fase mòbil que conté el tensioactiu aniònic SDS. S'han representat els equilibris entre el dissolvent, la micel·la i la fase estacionaria modificada pel tensioactiu.....	21
Figura 1.3. Transferència directa de soluts altament hidrofòbics entre les micel·les i la fase estacionaria modificada pel tensioactiu.....	28
Figura 2.1. Elecció, desenvolupament i avaluació de mètodes.....	59
Figura 3.1. Estructura de l'amoxicil·lina.....	90
Figura 3.2. Cromatogrames del blanc d'orina (a), orina addicionada amb amoxicil·lina (15 µg/mL) (b), i amoxicil·lina excretada (6 µg/mL) en orina després de 2 h de la ingestió de l'antibiòtic (c). Fase mòbil: 0.1 M SDS–4% butanol–pH 3.....	101
Figura 3.3. Estudi d'excreció urinària de l'amoxicil·lina després de la seua administració oral a un voluntari sa.....	107
Figura 4.1. Estructures de: (a) amoxicil·lina, (b) ampil·lina, (c) cloxacil·lina, i (d) dicloxacil·lina.....	115
Figura 4.2. Diagrames de resolució segons el criteri d'optimització de les fraccions solapades per a la separació de les quatre penicil·lines, eluïdes amb fases mòbils de SDS–propanol a pH 3 i utilitzant les columnes: (a) Kromasil, o (b) Zorbax.....	126
Figura 4.3. Cromatogrames predit (a), i experimental (b) d'una mescla d'aproximadament 10 µg/mL d'amoxicil·lina (AMO), ampil·lina (AMP), cloxacil·lina (CLO) i dicloxacil·lina (DIC), per a la fase mòbil seleccionada (0.11 M SDS–6% propanol–pH 3).....	127

Figura 4.4. Cromatogrames del blanc d'orina (a) i de les quatre penicil·lines (10 µg/mL) en una mostra d'orina addicionada (b), per a la fase mòbil seleccionada (0.11 M SDS–6% propanol–pH 3). Totes les mostres es van diluir en un factor d'1:50 amb 0.05 M SDS–pH 3.....	128
Figura 4.5. Estudi de l'excreció urinària d'algunes penicil·lines després de la seua administració oral a voluntaris sans: AMO (▲), AMP (◆) i CLO (■)	141
Figura 4.6. Cromatogrames d'una mostra d'orina recollida: 2 h després de la ingestió d'una dosi oral de 500 mg d'AMP (a), i 12 h després de la seua administració (b). Totes les mostres van ser diluïdes en un factor 1:50 amb 0.05 M SDS–pH 3. Fase mòbil: 0.11 M SDS–6% propanol–pH 3	142
Figura 4.7. Cromatogrames d'una mostra d'orina recollida: 2 h després de la ingestió d'una dosi oral de 500 mg de CLO (a), i 12 h després de la seua administració (b). Totes les mostres van ser diluïdes en un factor 1:50 amb 0.05 M SDS–pH 3. Fase mòbil: 0.11 M SDS–6% propanol–pH 3	143
Figura 5.1. Estructures de les quinolones estudiades.....	152
Figura 5.2. Equilibri àcid-base de les quinolones	156
Figura 5.3. Cromatogrames del blanc d'orina (a), i orina addicionada amb LEV i CIP (100 ng/mL) (b). Fase mòbil: 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3. Condicions de detecció: $\lambda_{exc} = 285$ nm i $\lambda_{em} = 465$ nm. Totes les mostres d'orina es van diluir en un factor 1:25 amb una dissolució 0.05 M SDS	160
Figura 5.4. Cromatogrames del blanc d'orina (a), i orina addicionada amb OFL, LOM i MOX (500 ng/mL) (b). Fase mòbil: 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3. Condicions de detecció: $\lambda_{exc} = 295$ nm i $\lambda_{em} = 485$ nm. Totes les mostres d'orina es van diluir en un factor 1:25 amb una dissolució 0.05 M SDS.....	161
Figura 5.5. Estudi d'excreció urinària de CIP (◆), LEV (▲), MOX (■), i OFL (x) després de la seua administració oral a un voluntari sa (a), i quantitat acumulada (mg) de les fluoroquinolones excretades de forma inalterada en orina (b)	171

Figura 5.6. Cromatogrames de mostres d'orina de diversos voluntaris, a qui es va administrar diferents antibiòtics. El temps transcorregut després de la seua ingestió i la composició de la fase mòbil va ser: (a) CIP i LEV (3 h, 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3), i (b) MOX i OFL (3 h, 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3)	172
Figura 6.1. Estructura bàsica de les quinolones. X = N, H; Y = N, H; Z = N, H.....	178
Figura 6.2. Estructures, coeficients de repartiment octanol-aigua (log <i>P</i>) i constants de dissociació àcid-base de les quinolones estudiades.....	180
Figura 6.3. Diagrama de resolució global	185
Figura 6.4. Cromatogrames predit (a), i experimental (b) d'una mescla de: (1) PIP (1.25 µg/mL), (2) LEV (5 µg/mL), (3) NOR (2.5 µg/mL) i (4) MOX (10 µg/mL). Fase mòbil: 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.....	186
Figura 6.5. Cromatogrames de les preparacions farmacèutiques: (a) Nuril (400 mg PIP), i (b) Stada (500 mg LEV) injectades en una concentració de 10 µg/mL. Fase mòbil: 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3	194
Figura 6.6. Cromatogrames de les preparacions farmacèutiques: (a) Norfloxacin Sandoz (400 mg NOR), i (b) Actira (400 mg MOX) injectades en una concentració de 10 µg/mL. Fase mòbil: 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.....	195
Figura 7.1. Estructures de les sulfamides	205
Figura 7.2. Reacció de diazotació de les sulfamides amb nitrit i acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall (NED).....	208
Figura 7.3. Cromatogrames de: (a) blanc de llet sense derivatitzar ($\lambda = 260$ nm), (b) blanc de llet sotmès a derivatització ($\lambda = 490$ nm), i (c) llet addicionada amb 25 ng/mL de cadascuna de les SAs i sotmesa a derivatització. Les SAs i els seus temps de retenció (t_R , min) són: (1) sulfacetamida, 4.5; (2) sulfametizole, 5.0; (3) sulfaguanidina, 7.0; (4) sulfamerazina, 9.9; (5) sulfatiazole, 11.6; i (6) sulfametoxazole, 13.2....	215
Figura 8.1. Estructures de les quatre quinolones estudiades	225
Figura 8.2. Diagrama de resolució global	233

Figura 8.3. Cromatogrames predit (a) i experimental (b) d'una mescla de DAN (0.5 µg/mL), DIF (0.05 µg/mL), FLU (1 µg/mL) i MAR (0.5 µg/mL). Fase mòbil: 0.05 M SDS-10% butanol-0.5% TEA-pH 3	234
Figura 8.4. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra de llet addicionada (1.5 × MRL) (inferior). Fase mòbil: 0.05 M SDS-10% butanol-0.5% TEA-pH 3	236
Figura 8.5. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra d'ou addicionada (MRL) (inferior). Fase mòbil: 0.05 M SDS-10% butanol-0.5% TEA-pH 3	237
Figura 9.1. Estructures de les quinolones estudiades.....	256
Figura 9.2. Diagrama de resolució global	262
Figura 9.3. Cromatogrames predit (a), i experimental (b) obtinguts. Fase mòbil: 0.065 M SDS-12.5% propanol-0.5% TEA-pH 3	263
Figura 9.4. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra de daurada addicionada (inferior). Fase mòbil: 0.065 M SDS-12.5% propanol-0.5% TEA-pH 3	265
Figura 9.5. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra de musclo addicionada (inferior). Fase mòbil: 0.065 M SDS-12.5% propanol-0.5% TEA-pH 3	266
Figura 10.1. Estructures de l'omeprazole (a) i els seus metabòlits omeprazole sulfona (b), i 5-hidroxiomeprazole (c)	285
Figura 10.2. Cromatogrames del blanc d'orina (a), omeprazole excretat en orina després de 3 h (b), i 10 h (c) de la seua ingestió. Fase mòbil: 0.08 M SDS-10% propanol-pH 7	292
Figura 10.3. Cromatogrames del blanc de sèrum (a), omeprazole en sèrum després de 2 h (b), i 6 h (c) de la seua ingestió. Fase mòbil: 0.08 M SDS-10% propanol-pH 7	293
Figura 10.4. Estudi d'excreció urinària d'HOME (▲), OME (■), i OMES (◆)	303

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1.1. Característiques dels tensioactius més comuns en MLC.....	15
Taula 1.2. Models empírics i mecanicistes utilitzats en MLC	33
Taula 1.3. Funcions de resolució global i criteris de resolució elemental utilitzats en cromatografia líquida micel·lar	39
Taula 2.1. Paràmetres de qualitat d'un mètode analític	52
Taula 2.2. Objectius de la validació segons el tipus de procediment d'assaig.....	62
Taula 2.3. Abast de la validació segons el tipus de procediment de prova.....	64
Taula 3.1. Paràmetres cromatogràfics obtinguts per a l'amoxicil·lina, eluïda en les tres columnes estudiades.....	97
Taula 3.2. Paràmetres cromatogràfics obtinguts per a l'amoxicil·lina en l'optimització del mètode	98
Taula 3.3. Avaluació de la robustesa del mètode	104
Taula 4.1. Paràmetres cromatogràfics (factor de retenció, k , eficàcia, N , i factor d'asimetria, B/A) obtinguts per a les penicil·lines, eluïdes en les columnes Kromasil i Zorbax	125
Taula 4.2. Precisió i exactitud intradia ($n = 6$) i interdia (en un període de 5 dies al llarg de tres mesos) per a mostres d'orina addicionades amb les penicil·lines	133
Taula 4.3. Avaluació de la robustesa del mètode	135
Taula 4.4. Anàlisi de preparacions farmacèutiques que contenen penicil·lines ($n = 6$) ...	138
Taula 5.1. Característiques analítiques significatives obtingudes en la determinació dels cinc antibiòtics	164
Taula 5.2. Exactitud i precisió intra i interdia per a mostres d'orina addicionades amb els antibiòtics.....	167
Taula 5.3. Avaluació de la robustesa del mètode	168
Taula 6.1. Característiques analítiques significatives obtingudes en la determinació dels antibiòtics.....	187
Taula 6.2. Exactitud i precisió (intra i interdia) dels antibiòtics.....	189
Taula 6.3. Avaluació de la robustesa del mètode	190

Taula 6.4. Anàlisi de medicaments que contenen els antibiòtics estudiats (n = 6)	192
Taula 7.1. Paràmetres cromatogràfics per als azocolorants de les sis SAs eluïts amb la fase mòbil òptima	212
Taula 7.2. Característiques analítiques significatives obtingudes en la determinació de les sis SAs	214
Taula 7.3. Precisió intra i interdia per a les sis SAs (RSD, %).....	216
Taula 7.4. Recuperació de SAs en mostres de llet adicionades (n = 10) a tres concentracions diferents	217
Taula 8.1. Dades de la regressió lineal, límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ), límits de decisió (CC_{α}) i capacitats de detecció (CC_{β}) calculats per als LOQ i MRL de les quinolones.....	239
Taula 8.2. Precisió i exactitud intra (n = 6) i interdia (en un període de cinc dies consecutius) per a la determinació de quinolones.....	240
Taula 8.3. Avaluació de la robustesa del mètode.....	244
Taula 8.4. Recuperacions (%) de diferents tipus de llets comercials i ous adicionats amb les quatre quinolones a tres concentracions diferents (n = 6)	246
Taula 9.1. Dades de la regressió lineal, límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ)	268
Taula 9.2. Valors dels errors α i β , límits de decisió (CC_{α}) i capacitats de detecció (CC_{β}) calculats al nivell de LOQ ^a (n = 20) del mètode i al d'MRL ^b (n = 20) per a les quinolones	269
Taula 9.3. Precisió i exactitud intra (n = 6) i interdia (n = 5) dels antibiòtics estudiats	272
Taula 9.4. Avaluació de la robustesa del mètode.....	273
Taula 9.5. Recuperacions (%) de diferents tipus de peixos comercials adicionats amb les cinc quinolones a tres concentracions diferents (n = 6)	275
Taula 10.1. Límits de detecció i quantificació per a l'HOME, OME, i OMES.....	295
Taula 10.2. Precisió i exactitud inter i intradia dels analits en un medi micel·lar	297
Taula 10.3. Avaluació de la robustesa del mètode.....	298
Taula 10.4. Anàlisi de medicaments que contenen omeprazole (n = 6)	300
Taula 10.5. Recuperacions (%) obtingudes en medi micel·lar	301

Acrònims i abreviatures / Acronyms and abbreviations

- AAPS: Associació Americana de Científics Farmacèutics (*American Association of Pharmaceutical Scientists*)
- AOAC: Associació Oficial de Químics Analítics (*Association of Official Analytical Chemists*)
- ASTM: Associació Americana d'Assaig de Materials (*American Society of Testing Materials*)
- BPL: Bones Pràctiques de Laboratori (*GLP, Good Laboratory Practice*)
- Brij-35: polioxietilen(23) lauril èter (*polyoxyethylene(23) lauryl ether*)
- CC_{α} : límit de decisió (*limit of decision*)
- CC_{β} : capacitat de detecció (*detection capability*)
- CE: electroforesi capil·lar (*Capillary Electrophoresis*)
- CEN: Comissió Europea de Normalització (*Comité Européen de Normalisation; European Committee for Standardization*)
- CGMP: bones pràctiques de manufactura (*Current Good Manufacturer Practice*)
- CMC: concentració micel·lar crítica (*Critical Micellar Concentration*)
- CTAB: bromur de cetiltrimetilamoni (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)
- CZE: electroforesi capil·lar zonal (*Capillary Zone Electrophoresis*)
- DIN: Institut Alemany de Normalització (*Deutsches Institut für Normung*)
- DTAB: bromur de dodeciltrimetilamoni (*Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide*)

- EPA: Agència de Protecció Ambiental (*Environmental Protection Agency*)
- ESI LC/MS-MS: cromatografia líquida acoblada a un tàndem d'espectrometria masses d'ionització per electroesprai (*Electrospray Ionization Liquid Chromatography Mass Spectrometry tandem*)
- FAO: Organització per a l'Agricultura i l'Alimentació (*Food and Agriculture Organization*)
- FDA: Administració d'Aliments i Fàrmacs (*Food and Drug Administration*)
- FIL-IDF: Federació Internacional de lleteria (*Génération Internationale de Laiterie; International Dairy Federation*)
- GC-MS: cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)
- HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució (*High Performance Liquid Chromatography*)
- HPLC-MS/MS: cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses en tàndem (*High Performance Liquid Chromatography-Coupled tandem Mass Spectrometry*)
- HPTLC: cromatografia en capa fina d'alta resolució (*High Performance Thin Layer Chromatography*)
- IAEA: Agència Internacional de l'Energia Atòmica (*International Atomic Energy Agency*)
- ICH: Conferència Internacional d'Harmonització (*International Conference on Harmonization*)
- I + D: investigació i desenvolupament (*research and development*)
- IEC: Comissió Electrotècnica Internacional (*International Electrotechnical Commission*)

- IPC: cromatografia de parells iònics (*Ion-Pair Chromatography*)
- IRAM: Institut Argentí de Racionalització de materials (Argentine Institute for the rationalization of materials)
- ISO: Organització Internacional de Normalització (*International Organization for Standardization*)
- IUPAC: Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- LC-ESI-MS: cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses per ionització d'electrosprai (*Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*)
- LLE: extracció líquid-líquid (*Liquid-Liquid Extraction*)
- LOD: límit de detecció (*Limit of Detection*)
- LOQ: límit de quantificació (*Limit of Quantitation*)
- MEKC: cromatografia micel·lar electrocinètica (*Micellar Electrokinetic Chromatography*)
- MLC: cromatografia líquida micel·lar (*Micellar Liquid Chromatography*)
- MRL: límit màxim residual (*Maximum Residue Limit*)
- OCDE: Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmics (*Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD*)
- OMS: Organització Mundial de la Salut (*World Health Organization, WHO*)
- $P_{o/w}$: coeficient de repartiment octanol-aigua (*octanol-water partition coefficient*)
- PABA: àcid *p*-aminobenzoic (*p-Amino Benzoic Acid*)
- R^2 : coeficient de determinació (*determination coefficient*)

- Rec: recuperació (*recovery*)
- RCRA: Recuperació i Conservació de Recursos (*Resource Conservation and Recovery*)
- RM: radi micel·lar (*Micellar Radius*)
- RPLC: cromatografia líquida en fase inversa (*Reversed Phase Liquid Chromatography*)
- R_s: resolució cromatogràfica (*chromatographic resolution*)
- RSD: desviació estàndard relativa (*Relative Standard Deviation*)
- SA: sulfamides (*sulfamides*)
- SD: desviació estàndard (*Standard Deviation*)
- SDS: dodecilsulfat sòdic (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- SFE: extracció amb fluids supercrítics (*Supercritical Fluid Extraction*)
- SPE: extracció en fase sòlida (*Solid-Phase Extraction*)
- TEA: trietilamina (*triethylamine*)
- TFC-LC-MS/MS: cromatografia de flux turbulent acoblada a un tàndem de espectrometria de masses (*Turbulent Flow Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry*)
- UE: Unió Europea (*European Union*)
- USP: Farmacopea dels Estats Units (*United States Pharmacopoeia*)
- UV-Vis: ultraviolat visible (*Ultraviolet-Visible*)
- V: volum molar (*molar volume*)

Compostos analitzats / Analysed compounds

- AMO: amoxicil·lina (*amoxicillin*)
- AMP: ampicil·lina (*ampicillin*)
- CIP: ciprofloxacina (*ciprofloxacin*)
- CLO: cloxacil·lina (*cloxacillin*)
- DAN: danofloxacina (*danofloxacin*)
- DIC: dicloxacil·lina (*dicloxacillin*)
- DIF: difloxacina (*difloxacin*)
- ENR: enrofloxacina (*enrofloxacin*)
- FLU: flumequina (*flumequine*)
- HOME: 5-hidroxiomeprazole (*5-hydroxyomeprazole*)
- LEV: levofloxacina (*levofloxacin*)
- LOM: lomefloxacina (*lomefloxacin*)
- MAR: marbofloxacina (*marbofloxacin*)
- MOX: moxifloxacina (*moxifloxacin*)
- NOR: norfloxacina (*norfloxacin*)
- OFL: ofloxacina (*ofloxacin*)
- OME: omeprazole (*omeprazole*)
- OMES: omeprazole sulfona (*omeprazole sulfone*)
- OXO: àcid oxolínic (*oxolinic acid*)
- PIP: àcid pipemídic (*pipemidic acid*)
- SAR: sarafloxacina (*sarafloxacin*)

Objectius i desenvolupament de la Tesi Doctoral

El treball presentat en aquesta Memòria s'emmarca en una línia d'investigació desenvolupada pel grup de "*Química Bioanalítica*" del Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I, amb codi 029 de l'Oficina per a la Cooperació en Investigació i Desenvolupament Tecnològic (OCIT). Aquesta línia, té com a finalitat el desenvolupament de nous mètodes d'anàlisi en els camps de la química clínica i l'anàlisi toxicològic i forense, fent ús de la cromatografia líquida micel·lar (MLC) i l'electroforesi capil·lar. Ha sigut finançada per diversos projectes d'investigació de diferents àmbits: estatal (Ministeri d'Educació i Ciència), autonòmic (Generalitat Valenciana) i universitari (Fundació Caixa Castelló-Bancaixa). En concret, l'estudi que ací es presenta ha rebut el finançament de la Fundació Caixa de Castelló-Bancaixa i la Universitat Jaume I, per mitjà del projecte P1-1B2006-12: "*Optimització interpretativa per a la separació i determinació d'antibiòtics per mitjà de cromatografia líquida micel·lar amb injecció directa de les mostres. Ús de detectors selectius, tècniques de gradient i d'intercanvi de columnes*".

L'MLC constitueix una alternativa real a la cromatografia líquida en fase inversa clàssica (RPLC) que utilitza fases mòbils aquo-orgàniques. Entre les seues característiques més destacables es troba la seua gran versatilitat, a causa de la varietat d'interaccions que s'estableixen entre els soluts, la fase aquosa, les micel·les i la fase estacionària. Així mateix, les seues característiques d'elució permeten l'anàlisi de soluts en un ampli interval de polaritats, a partir d'una única injecció i elució isocràtica. Atès que la retenció és altament reproducible, pot modelitzar-se amb gran exactitud per predir els canvis de retenció en variar la composició de la fase mòbil, facilitant d'aquesta forma l'optimització de les condicions de separació. Cal destacar, que la concentració de

dissolvent orgànic és molt menor a la utilitzada en RPLC clàssica. Per aquesta raó, se sol dir que les fases mòbils en MLC són menys tòxiques, inflamables i contaminants.

D'altra banda, l'MLC proporciona una solució simple al problema de la injecció directa de fluids fisiològics o mostres d'aliments. Tal vegada siga aquesta un dels seus principals avantatges, ja que això simplifica i accelera els procediments analítics.

Des que l'MLC es va proposar per primera vegada per Armstrong en 1981, s'han publicat nombrosos articles dirigits al desenvolupament de la tècnica i al coneixement dels seus mecanismes de retenció. Aquests estudis de tipus fonamental són essencials per millorar les possibilitats dels sistemes de separació, i estableixen les bases per desenvolupar mètodes d'anàlisi de compostos de diferent naturalesa. Basant-nos en aquest tipus d'estudis, l'objectiu principal de la Memòria que ací es presenta ha sigut el desenvolupament i validació de procediments per a la separació i determinació de diferents classes d'antibiòtics en diverses matrius (orina, productes farmacèutics i aliments) per mitjà d'MLC. Els grups d'antibiòtics considerats han sigut penicil·lines, quinolones i sulfamides.

Perquè les dades obtingudes a partir d'un nou mètode siguen fiables, aquest ha de ser validat seguint una sèrie de criteris ben definits. Aquest és un altre dels objectius de la present Tesi Doctoral. La majoria dels mètodes desenvolupats han sigut validats considerant els paràmetres següents: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, exactitud, precisió, recuperació i robustesa. Per a això, i segons el tipus de matriu que s'ha estudiat, s'han utilitzat tres guies de validació diferents: les regulacions de *l'Administració de Drogues i Aliments (FDA)*, normes de la *Conferència Internacional d'Harmonització (ICH)*, i la regulació de la *Decisió de la Comissió 2002/657/EC*.

Els antibiòtics o agents antibacterians són substàncies químiques de baix pes molecular, sintètiques o produïdes per microorganismes, que tenen la capacitat, en xicotetes concentracions, d'inhibir el creixement i, fins i tot de destruir a certs

microorganismes. Les seues principals aplicacions es donen en Medicina, Veterinària i Agricultura. En humans, s'usen en el tractament d'infeccions urinàries, respiratòries i altres de tipus sistèmic. La seua utilització per al tractament de malalties en el bestiar per a consum humà, així com la seua utilització com a additius en granges industrials, han donat com resultat que la seua presència potencial en aliments d'origen animal ha de considerar-se. Els residus d'antibiòtics en aliments d'origen animal poden provocar reaccions al·lèrgiques en individus hipersensibles, però sobretot, l'administració de baixos nivells d'antibiòtics pot donar lloc a bacteris resistents, que poden arribar al ser humà a través dels esmentats aliments. A més d'aquests efectes adversos immediats, existeixen també efectes a llarg termini que encara no es coneixen. Per tots aquests motius, queda més que justificat el desenvolupament i validació de mètodes d'anàlisi per a aquest tipus de compostos.

El grup dels antibiòtics inclou compostos amb estructures molt diferents, molts d'ells amb un gran interès farmacològic. Han aparegut, per això, un número molt elevat d'articles en què es mostren procediments analítics per mitjà de diverses tècniques, sent molt utilitzada la RPLC clàssica. La disponibilitat de noves ferramentes que possibiliten la millora dels procediments desenvolupats pel nostre grup d'investigació, i l'interès per investigar la determinació d'antibiòtics de nova generació, va portar a la proposta d'una nova Tesi Doctoral sobre la determinació d'aquests fàrmacs, iniciada a l'Abril del 2007, la Memòria de la qual es presenta a continuació.

El treball ací presentat ha suposat un ampli desenvolupament experimental, sobretot en l'etapa de validació, així com un extens tractament de les dades. S'ha de ressaltar també l'esforç realitzat en la revisió bibliogràfica dels temes abordats, que ha suposat la recerca, lectura i organització de molta informació. A més, el període de desenvolupament de la Tesi Doctoral (Abril del 2007–Abril del 2011) ha inclòs una estada en un altre laboratori, concretament en el Departament de Química Orgànica de la Universitat de Gant (Bèlgica), sota la direcció del Professor Patrick Sandra. En aquesta

estada s'ha abordat la mesura de l'activitat antioxidant en productes naturals per mitjà d'un sistema HPLC "online".

Aquesta Memòria consta de deu capítols, els dos primers introductoris. El seu títol "*Determinació d'antibiòtics mitjançant cromatografia líquida micel·lar en mostres fisiològiques i d'aliments*" fa referència al tema central abordat, exposat en set capítols, dividits en dos parts. En la primera, es du a terme l'anàlisi dels antibiòtics en fluids fisiològics i productes farmacèutics, i en la segona en aliments. No obstant això, s'ha inclòs un altre capítol estretament relacionat que configura la tercera part. En aquest, es desenvolupa un mètode per a l'anàlisi d'un protector estomacal i els seus metabòlits, que és comunament administrat junt amb els antibiòtics. En la majoria dels casos, els capítols mostrats són traduccions dels articles publicats (capítols 3, 5-7, 9, i 10) o en premsa (capítols 4 i 8). La Memòria finalitza amb una anàlisi global dels resultats obtinguts i els articles escrits en anglès.

Ha d'indicar-se que a causa dels tràmits legals necessaris, la Memòria de la Tesi Doctoral que ací es presenta, s'ha acabat de preparar uns quants mesos abans de l'acte de lectura. Per aquest motiu, no s'han pogut incloure alguns treballs d'investigació que existeixen actualment com a esborrany d'article o es troben en fase experimental avançada. A continuació, es detalla la llista completa d'investigacions realitzades.

Comunicacions a congressos científics

31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC 2007, Gant (Bèlgica), Juny de 2007.

1. J.S. Esteve Romero, M.A. Raviolo, M. Rambla Alegre, J. Clausell Tormos, M.E. Capella Peiró, S. Carda Broch, "*Determination of sulphonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography*"

32nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques. HPLC 2008, Baltimore (EUA), Maig de 2008.

2. M. Rambla Alegre, M.L. Chin Chen, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Development of a direct and validated method of amoxicillin detection in physiological fluids using micellar liquid chromatography*”
3. J. Esteve Romero, M. Rambla Alegre, S. Carda Broch, “*Column selection in micellar liquid chromatography determination of antibiotics*”

34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemanya), Juny–Juliol de 2009.

4. M. Rambla Alegre, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Cluster analysis for column classification and selection for the determination of norfloxacin and amoxicillin by micellar liquid chromatography*”
5. M. Rambla Alegre, M.L. Chin Chen, M.A. Collado Sánchez, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Simultaneous separation and determination of quinolones in urine by micellar liquid chromatography*”
6. M. Rambla Alegre, M.L. Chin Chen, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases*”

35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC 2010, Boston (EUA), Juny de 2010.

L'organització HPLC, Inc. va concedir a Maria Rambla una ajuda de viatge per a assistir a aquest congrés. Només dos ajudes van ser concedides a estudiants d'Europa.

7. M. Rambla Alegre, M.A. Collado Sánchez, R. Martí Centelles, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Simultaneous determination of quinolones in milk and eggs by micellar liquid chromatography with fluorescence detection*”

8. M. Rambla Alegre, J. Peris Vicente, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography and validated in accordance with regulation 2002/657/EC*”

28th International Symposium on Chromatography, ISC 2010, València, Setembre 2010.

9. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Development and validation of micellar liquid chromatographic methods for the determination of antibiotics in different matrices*”
10. M. Rambla Alegre, M.A. Collado Sánchez, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Micellar liquid chromatography determination of quinolones in food samples with fluorescence detection*”
11. M. Rambla Alegre, J. Peris Vicente, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Validation of a liquid chromatographic procedure for the determination of five quinolones in fish according with regulation 2002/657/EC*”

Articles Científics

1. M.A. Raviolo, M. Rambla Alegre, J. Clausell Tormos, M.E. Capella Peiró, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography*”
Analytica Chimica Acta 593 (2007) 152–156
2. M. Rambla Alegre, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Development of a direct and validated method of amoxicillin in physiological fluids using Micelar Liquid Chromatography*”
Journal of Separation Science 31 (2008) 2813–2819

3. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases*”.
Analytica Chimica Acta 633 (2009) 250–256
4. M. Rambla Alegre, S. Carda Broch, J. Esteve Romero, “*Column classification and selection for the determination of antibiotics by micellar liquid chromatography*”
Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 32 (2009) 1127-1140
5. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection*”
Journal of Chromatography B 877 (2009) 3975–3981
6. M.A. Collado Sánchez, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Rambla Alegre, “*Simultaneous separation and determination of quinolones in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography*”
Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 33 (2010) 513–525
7. M. Rambla Alegre, J. Peris Vicente, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC*”
Food Chemistry 123 (2010) 1294–1302
8. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Rambla Alegre, “*Micellar liquid chromatography in bioanalytical chemistry*”
Contributions to Science 6 (2010) 105–119
9. M. Rambla Alegre, M.A. Collado Sánchez, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Quinolones control in milk and eggs samples by liquid chromatography using a surfactant-mediated mobile phase*”
Analytical and Bioanalytical Chemistry (en premsa, doi: 10.1007/s00216-010-4409-x).

10. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in pharmaceutical formulations and biological fluids using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection*”
Journal of Chromatography A (en premsa, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.015).
11. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Development and validation of micellar liquid chromatographic methods for the determination of antibiotics in different matrices*”
Acceptat en Journal of AOAC International en Novembre de 2010.
12. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Micellar liquid chromatography in the determination of antibiotics: an overview*”
Enviat per a la seua publicació.
13. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, “*Development, optimization and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of several fluoroquinolones in meat samples*”
En fase experimental.
14. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, D. Bose, S. Carda Broch, “*Quantitative determination of penicillin antibiotics in food samples by micellar liquid chromatography*”
En fase experimental.
15. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, D. Bose, “*Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis*”
En fase experimental.

Capítol 1

Conceptes bàsics de la cromatografia líquida micel·lar

1.1. Resum

La cromatografia líquida micel·lar (MLC) és una alternativa eficaç enfront de la cromatografia líquida de fase inversa clàssica (RPLC) que utilitza fases mòbils aquo-orgàniques. Quasi tres dècades d'experiència han donat lloc a un augment de la producció en les aplicacions analítiques. La preocupació actual pel medi ambient també revela a l'MLC com una tècnica interessant per a la "química verda", atès que usa fases mòbils que contenen un 90% o més d'aigua. Les fases mòbils micel·lars tenen una baixa toxicitat i no originen abocaments perillosos. La fase estacionària es modifica amb una quantitat aproximadament constant de monòmers de tensioactiu, mentre que la capacitat de solubilització de la fase mòbil es veu alterada per la presència de micel·les, donant lloc a una gran varietat d'interaccions (hidrofòbiques, iòniques i estèriques) amb implicacions importants en la retenció i selectivitat dels soluts. Des del seu inici en 1980, aquesta tècnica ha evolucionat fins a convertir-se en una alternativa real en alguns casos (i un complement en altres) a l'RPLC clàssica, a causa de les seues característiques peculiars i els seus avantatges únics. No obstant, poc després del seu inici, es va suggerir l'addició d'un dissolvent orgànic a la fase mòbil amb la finalitat de millorar les baixes eficàcies i la dèbil força eluent de les fases mòbils que únicament contenien micel·les.

1.2. Introducció

La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC) és una tècnica de cromatografia líquida en fase inversa (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC) que fa ús de fases mòbils que contenen una dissolució aquosa de tensioactiu en una concentració superior a la seua concentració micel·lar crítica (CMC) [1, 2]. La idea d'utilitzar dissolucions micel·lars pures com a fases mòbils en RPLC és molt atractiva a causa del seu baix cost i toxicitat, i el seu reduït impacte ambiental. No obstant, en la pràctica és necessari afegir una xicoteta quantitat de dissolvent orgànic a la dissolució micel·lar per aconseguir una retenció adequada dels soluts en un interval de temps raonable, així com millorar l'eficàcia dels pics cromatogràfics i la seua resolució.

Les fases mòbils micel·lars s'han utilitzat amb diferents tipus de fases estacionàries (en la seua majoria C8, C18 i cianopropil). Els tensioactius més comuns són l'aniònic dodecilsulfat sòdic (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), el catiònic bromur de cetiltrimetilamoni (*cetyl trimethyl ammonium bromide*, CTAB) i el no iònic Brij-35 (*polyoxyethylene(23) lauryl ether*). També s'han utilitzat diversos dissolvents orgànics com a modificadors, sent els més adequats els alcohols de cadena curta/mitjana i l'acetonitril. La presència de micel·les contribueix a mantenir aquests dissolvents orgànics en la dissolució en concentracions molt superiors a la seua solubilitat en aigua, disminuint, a més, el risc d'evaporació.

A una concentració superior a la CMC, un augment en la concentració del tensioactiu es veu reflectit en un increment de la concentració de micel·les en la dissolució, mentre que el nombre de monòmers del tensioactiu en la fase mòbil es manté constant. També es produeix l'adsorció d'una quantitat aproximadament fixa de monòmers de tensioactiu en la fase estacionària, donant lloc a una columna modificada estable i un comportament de retenció regular dels soluts.

L'MLC s'ha desenvolupat sobre una base teòrica prou sòlida, i els seus mecanismes de retenció (p.ex., les interaccions solut-fase mòbil i solut-fase estacionària) són prou

conegudes. Aquesta tècnica és un exemple fascinant dels beneficis dels equilibris secundaris en RPLC. L'equilibri principal consisteix en el repartiment del solut entre el dissolvent (p.ex., aigua o una mescla aquo-orgànica) i la fase estacionària. Un equilibri secundari s'estableix amb les micel·les de la fase mòbil. Ambdós equilibris es veuen afectats per una àmplia varietat de factors, com ara el tipus i la concentració del tensioactiu i els additius (p.ex., sals o dissolvents orgànics), la temperatura, la força iònica i el pH. La complexitat de l'MLC és molt major que en RPLC clàssica.

Els estudis de tipus fonamental en MLC s'han centrat principalment en l'adsorció del tensioactiu, el comportament de la retenció, la mesura dels coeficients de repartiment, l'eficàcia i selectivitat dels pics cromatogràfics. La majoria d'aquests estudis es van realitzar en els anys 90, mostrant alguns d'ells evidències sobre els mecanismes de retenció. Aquest coneixement ha permès una descripció teòrica de l'MLC i una major comprensió i ús d'aquesta tècnica.

1.3. Cromatografia líquida de parells iònics en fase inversa i el naixement de la cromatografia líquida micel·lar

En 1976, Knox i Laird [3] van desenvolupar la cromatografia de parells iònics (*ion-pair chromatography*, IPC), afegint una xicoteta quantitat de tensioactiu iònic a les fases mòbils polars aquo-orgàniques utilitzades en RPLC. En aquestes condicions, el tensioactiu s'adsorbeix sobre la fase estacionària i és capaç d'associar-se amb soluts iònics de càrrega oposada. La retenció en IPC s'ha explicat basant-se en dos mecanismes: (i) el clàssic mecanisme d'intercanvi iònic, en què els soluts iònics interaccionen amb el tensioactiu iònic que es troba recobrint la fase estacionària, i (ii) un mecanisme de parells iònics, en què la part hidrofòbica dels parells iònics es reparteix entre la fase mòbil aquo-orgànica i la fase estacionària. Allò més probable és que tinga lloc un mecanisme intermedi entre l'intercanvi iònic i el repartiment hidrofòbic.

En IPC, la retenció del solut és directament proporcional a la quantitat adsorbida del contraïó en la fase estacionària. Els principals factors que afecten el comportament de retenció són el tipus de fase estacionària, la naturalesa i la concentració del tensioactiu iònic i dissolvent orgànic, la força iònica i el pH. Els dissolvents orgànics més comunament utilitzats són metanol, propanol i acetonitril. Per la seua banda, els tensioactius iònics més habituals contenen entre sis (hexil) i 16 (hexadecil) àtoms de carboni en la seua cadena alquílica. La quantitat adsorbida de tensioactiu augmenta amb la seua concentració en la fase mòbil i el nombre d'àtoms de carboni de la seua cadena alquílica. No obstant, disminueix ràpidament amb el contingut de dissolvent orgànic, pel fet que la capacitat de desorció augmenta amb la seua concentració.

En IPC, l'adsorció del tensioactiu fa que l'etapa de condicionament de la columna siga crítica, la qual cosa pot donar lloc a resultats poc reproduïbles. A més, no s'ha de treballar a concentracions superiors a la CMC, ja que el comportament de la retenció canvia dràsticament quan comencen a formar-se micel·les. Així, no és sorprenent que les persones que treballaven en IPC, no foren els que desenvoluparen l'MLC. Aquesta tècnica va ser proposada per investigadors que estudiaven l'ús de dissolucions de tensioactiu com a noves i originals fases mòbils amb propietats particulars [4]. No obstant, les relacions entre ambdós tècniques (IPC i MLC) no han de passar-se per alt.

1.4. Naturalesa la fase mòbil i la fase estacionaria en MLC

L'MLC comparteix els components bàsics de l'RPLC, és a dir, una fase estacionària no polar i una fase mòbil aquosa polar. No obstant, les fases mòbils aquo-orgàniques en RPLC són homogènies, mentre que les dissolucions micel·lars són microscòpicament heterogènies, i estan formades per dos medis distints: els agregats micel·lars anfílics (pseudofase micel·lar) i el medi aquo-orgànic que els rodeja, el qual conté monòmers del tensioactiu en una concentració aproximadament igual a la CMC. A més, la fase

estacionària es troba modificada per l'adsorció de monòmers del tensioactiu, creant una estructura semblant a una micel·la oberta.

En RPLC convencional, la composició de la superfície de la sílice enllaçada és més important en els processos cromatogràfics que la sílice pura, atès que la retenció dels soluts ve determinada per la seua interacció amb la superfície més externa de la sílice enllaçada [5]. Això pot estendre's als modes d'RPLC amb tensioactiu adsorbit en la fase estacionària. Amb tensioactius no iònics, només canvia la polaritat de la fase estacionària, mentre que amb els iònics, apareix una càrrega neta (positiva o negativa) en la seua superfície, les implicacions de la qual són importants. A més, l'adsorció de monòmers de tensioactiu en la fase estacionària disminueix les interaccions amb els grups silanol lliures.

1.4.1. Fase mòbil micel·lar

Les micel·les dels tensioactius iònics posseeixen punts tant d'interacció hidrofòbica com electrostàtica. També, es poden identificar tres zones de solubilització: el seu nucli o cor (hidrofòbica), la superfície (hidrofílica) i la palissada (regió compresa entre els grups del cap del tensioactiu i el seu nucli). Els soluts que s'associen a les micel·les es troben en un microambient diferent del dissolvent. Això es veu reflectit per perturbacions induïdes per les micel·les en les propietats fisicoquímiques dels soluts, que inclouen canvis en la solubilitat, acidesa, propietats fotofísiques, i les velocitats de reacció [6].

Encara que se solen utilitzar fases mòbils micel·lars pures (en absència de dissolvent orgànic), la majoria de les separacions en MLC es duen a terme amb fases mòbils micel·lars híbrides (en presència d'un dissolvent orgànic) en un medi tamponat, les quals contenen micel·les, monòmers de tensioactiu, molècules de dissolvent orgànic (lliure o associat al tensioactiu) i aigua. La presència del dissolvent orgànic disminueix la polaritat de la dissolució aquosa i altera l'estructura de la micel·la. Encara que el mode

de separació continua sent predominantment de naturalesa micel·lar, la micel·la es troba pertorbada pel dissolvent orgànic. Això pot originar canvis en els paràmetres micel·lars, com per exemple en la CMC i en el nombre d'agregació del tensioactiu, i fins i tot un elevat percentatge de dissolvent orgànic pot disgregar la micel·la. La concentració màxima que es pot utilitzar, depèn del tipus de dissolvent orgànic així com del tensioactiu.

Els dissolvents orgànics es reparteixen entre els agregats micel·lars i la resta de la dissolució, augmentant el grau d'associació amb la seua hidrofobicitat. Igual que els soluts, les molècules de dissolvent orgànic poden situar-se en l'exterior de la micel·la, en la palissada de la mateixa, o en el seu nucli. Els dos primers efectes podrien afavorir la formació de micel·les, mentre que l'últim pot augmentar substancialment la quantitat de dissolvent orgànic en el seu interior i donar lloc a una microemulsió [6].

Els alcohols de cadena curta afegits a una fase mòbil micel·lar constituïda per un tensioactiu iònic, mostren una interessant varietat de comportaments [7]. Metanol, amb la cadena més curta de carboni, és l'alcohol més polar i soluble. Pot solvatar els monòmers de tensioactiu amb major facilitat, la qual cosa impedeix la formació de micel·les i, en conseqüència, és necessària una major quantitat de tensioactiu per constituir els agregats micel·lars (p.ex., la CMC augmenta amb l'addició de metanol). L'efecte d'etanol i propanol és l'oposat al del metanol, atès que aquests alcohols romanen principalment en l'exterior de les micel·les, però interaccionen amb la seua superfície, la qual cosa redueix la repulsió entre els caps iònics dels monòmers del tensioactiu. Això afavoreix la formació de micel·les i disminueix la CMC. Finalment, butanol i pentanol s'insereixen en l'agregat micel·lar, a causa de la seua particular estructura que combina un grup polar amb una cadena no polar, molt semblant a les molècules del tensioactiu. Aquests alcohols s'alineen amb les molècules del tensioactiu en la palissada de la micel·la, orientant-se el grup polar hidroxil de l'alcohol cap a la capa de Stern, mentre que la cadena alquílica se situa en el nucli apolar de la micel·la. Això dóna lloc a un augment de les micel·les mixtes. Finalment, cal assenyalar que

l'efecte de l'acetonitril sobre la CMC és semblant al del metanol, malgrat que les seues polaritats i estructures són diferents [7].

a) *Concentració micel·lar crítica*

Un tensioactiu és adequat per al seu ús en MLC si té un valor menut de CMC. Una alta CMC implicaria treballar a una elevada concentració de tensioactiu, la qual cosa produiria dissolucions massa viscoses, donant lloc a pressions elevades no desitjables en el sistema cromatogràfic, incrementant també el soroll de fons en els detectors. La selecció queda sovint limitada als següents tensioactius: l'aniónic SDS, el catiónic CTAB i el no iònic Brij-35, les característiques principals dels quals es resumeixen en taula 1.1. Els valors de CMC d'aquests tensioactius en aigua pura són prou baixos per a ser utilitzats en MLC. També ha de considerar-se que la presència d'un dissolvent orgànic afecta de forma considerable a la CMC. Els canvis estan relacionats amb la modificació de l'estructura de la micel·la, la qual cosa indueix també, almenys parcialment, a una disminució de la retenció en MLC [7].

Taula 1.1. Característiques dels tensioactius més comuns en MLC^a.

Tensioactiu	Pes molecular (g/mol)	CMC (mol/L)	RM ^b (nm)	V ^c (L/mol)
SDS	288.4	8.2×10^{-3}	2.5	0.246
CTAB	364.5	9×10^{-4}	3.2	0.364
Brij-35	1198 ^d	9×10^{-5}	-	-

^a Referències [8] i [9]; ^b Radis micel·lars; ^c Volum molar; ^d Mitjana

b) Punt de Krafft i punt de terbolesa

Es defineix el punt de Krafft, per als tensioactius iònics, com la temperatura que correspon al punt on la solubilitat del tensioactiu assoleix la seua CMC [10], i depèn de qualsevol efecte susceptible d'afectar a la mateixa. Per davall de la temperatura del punt de Krafft, el tensioactiu no és prou soluble perquè estiga en concentració suficient com per formar micel·les, i l'equilibri s'estableix entre una dissolució monomolecular i el tensioactiu sòlid precipitat. Així, en MLC s'ha de treballar per damunt d'aquesta temperatura per evitar que precipite el tensioactiu, la qual cosa significa que el punt de Krafft ha de ser prou inferior a la temperatura ambient. A més, la temperatura del laboratori ha d'estar sempre per damunt d'aquest valor per evitar el deteriorament de la columna, sent especialment important en regions de clima fred, on serà obligatori disposar d'aire condicionat en els laboratoris. El punt de Krafft per a SDS i CTAB està al voltant de 15 °C i 20–25 °C, respectivament [11, 12]. No obstant, ha de tenir-se en compte que aquest es veu afectat per la presència de sals. Així, per a l'SDS, el punt de Krafft augmenta fins a 18 °C en presència d'una dissolució 0.1 M NaCl [12].

Per la seua banda, els tensioactius no iònics tenen una temperatura específica, denominada punt de terbolesa (en anglès, *cloud point*), que si se sobrepassa té lloc una separació de fases [9, 13]. El punt de terbolesa correspon a la temperatura a la qual s'inicia una transició de fase, separant-se de la solució aquosa, una fase que conté tensioactiu amb un poc d'aigua. Aquest punt és essencialment independent de la concentració de tensioactiu. A mesura que augmenta la temperatura, es van desolvatant les cadenes de poliòxid d'etilè i com a conseqüència es redueix l'hidrofilicitat del tensioactiu. La CMC del tensioactiu disminueix i el nombre d'agregació creix; les micel·les augmenten de grandària, i en arribar a cert valor (centenars d'Amstrongs) comencen a interactuar amb la llum, produint una terbolesa. Si es continua augmentant la temperatura, les micel·les arriben a un grandària suficient (micròmetre) perquè la gravetat les pugui sedimentar, produint-se una separació de fase. Qualsevol efecte susceptible d'afavorir o desfavorir la formació de micel·les i l'augment de la seua

grandària tendeix a afectar el punt de terbolesa. En aquest cas, s'ha de treballar per davall d'aquesta temperatura. Això no pareix un problema, atès que el punt de terbolesa per als tensioactius no iònics més comuns en MLC, com Brij-35, és aproximadament 100 °C en dissolucions aquoses entre 1–6%, mentre que per a Tritó X-100 és de 64 °C.

c) pH de la fase mòbil

En MLC s'utilitzen els mateixos farciments que en l'RPLC clàssica, les columnes dels quals tenen un interval de pH de treball limitat (2.5–7.5). El valor adequat de pH depèn de la naturalesa dels analits i del tensioactiu seleccionat. Per exemple, la separació d'àcids dèbils amb el tensioactiu aniònic SDS, requereix sovint treballar a un pH entre 2.5–3, on predomina l'espècie neutra protonada que és la més retinguda. En aquestes condicions, la separació dels compostos té lloc en una regió més àmplia, afavorint la seua resolució. El pH de la fase mòbil micel·lar es fixa normalment amb tampons d'àcid fosfòric o cítric [1, 2], a més, no es recomana l'ús de sals de potassi en fases mòbils que contenen SDS, ja que el dodecilsulfat potàssic presenta un elevat punt de Krafft, i precipita en dissolucions aquoses a temperatura ambient [1]. En tot cas, la columna ha de ser condicionada amb la fase mòbil fins que el pH siga el mateix, abans i després de la columna.

d) Tipus i concentració de dissolvents orgànics

La selecció del dissolvent orgànic apropiat en MLC ha de considerar la polaritat dels analits. Per a compostos polars, s'obtenen temps de retenció prou menuts (menys de 20 min) utilitzant 1-propanol, 2-propanol o acetonitril. Per a compostos no polars o amb alta afinitat pel tensioactiu adsorbit en la fase estacionària, es necessiten dissolvents amb major força d'elució com a 1-butanol o 1-pentanol [14]. No obstant, cal assenyalar que una concentració prou alta d'aquests dos últims alcohols dona lloc a la formació de microemulsions [15]. En la pràctica, la quantitat de dissolvent orgànic que es pot afegir

està limitada per la seua solubilitat. Els additius que normalment no s'utilitzarien en RPLC clàssica a causa de la seua baixa solubilitat, poden donar lloc a fases mòbils micel·lars estables. Així, per exemple, en una dissolució 0.285 M SDS a 25 °C, les concentracions molars de 2-metil-1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol i pentà, van ser 0.46, 0.92, 0.79, i 0.095, respectivament, mentre que les seues solubilitats molars en aigua aconseguixen només valors de 6.1×10^{-3} , 4.5×10^{-3} , 1.2×10^{-3} , i 9.5×10^{-6} , respectivament [16]. Ha de tenir-se sempre en compte que una elevada concentració de dissolvent orgànic produirà una disgregació de la micel·la, i en eixe cas, la fase mòbil només contindrà monòmers de tensioactiu lliure. La quantitat de dissolvent orgànic que manté la integritat de les micel·les és inferior al 15% per a propanol i acetonitril, 10% per a butanol, i 6% per a pentanol [16]. Aquestes quantitats són xicotetes en comparació amb aquelles que utilitzen en l'RPLC clàssica. El menor consum de dissolvent orgànic redueix el cost i la toxicitat en MLC, la qual cosa pot ser important dins del camp per a la "química verda". A més, l'estabilització del dissolvent orgànic en medis micel·lars disminueix el seu risc d'evaporació. Això significa que les fases mòbils micel·lars poden conservar-se en el laboratori durant un llarg període de temps sense que ocorreguen canvis significatius en la seua composició.

1.4.2. Fase estacionària

a) Adsorció del tensioactiu

Encara que el farciment C18 alquil-enllaçat és la fase estacionària més utilitzada en l'MLC, també s'empren altres columnes (p.ex., C8 i cianopropil). Les columnes amb fases alquil-enllaçades pateixen una forta modificació quan s'usen fases mòbils que contenen SDS, CTAB o Brij-35.

L'adsorció del tensioactiu sobre els farciments porosos d'RPLC afecta dràsticament la retenció dels soluts, a causa del canvi de diverses propietats de la superfície de la fase estacionària (p.ex., la polaritat, l'estructura, el volum de porus i l'àrea superficial). Les

molècules de tensioactiu recobreixen els porus de la fase estacionària, reduint sensiblement el seu volum [17].

Normalment, se solen afegir sals a les fases mòbils micel·lars per tamponar el pH, així com per ajustar la força iònica, la qual cosa pot canviar la quantitat de tensioactiu adsorbit a causa de la disminució tant de la repulsió electrostàtica com de la CMC del tensioactiu, així com l'augment de les interaccions hidrofòbiques [18].

El recobriment del tensioactiu emmascara la fase estacionària alquil-enllaçada. Això significa que un recobriment semblant faria que les fases estacionàries foren totes completament semblants. S'ha utilitzat la ressonància magnètica nuclear en estat sòlid per investigar l'estructura de la capa de tensioactiu en columnes alquil i cianoenllaçades quan s'utilitzen fases mòbils que contenen SDS o CTAB [19, 20]. En el cas de l'SDS, la seua llarga cadena hidrofòbica s'insereix en la capa orgànica enllaçada a la columna, amb el grup sulfat dirigit cap a la fase mòbil (figura 1.1). Amb això, la fase estacionària queda carregada negativament, la qual cosa afecta la profunditat amb què els soluts s'introdueixen en la fase enllaçada.

Al contrari, l'SDS s'adsorbeix en fases cianoenllaçades, amb el grup sulfat orientat cap al grup ciano de la capa orgànica enllaçada, i la cadena hidrofòbica projectada cap a la fase mòbil, creant pseudofases alquil-enllaçades (figura 1.2). La menor càrrega en la superfície de les fases cianoenllaçades modificades amb SDS, és la responsable de la funció més important de les interaccions solut-micel·la per als soluts carregats.

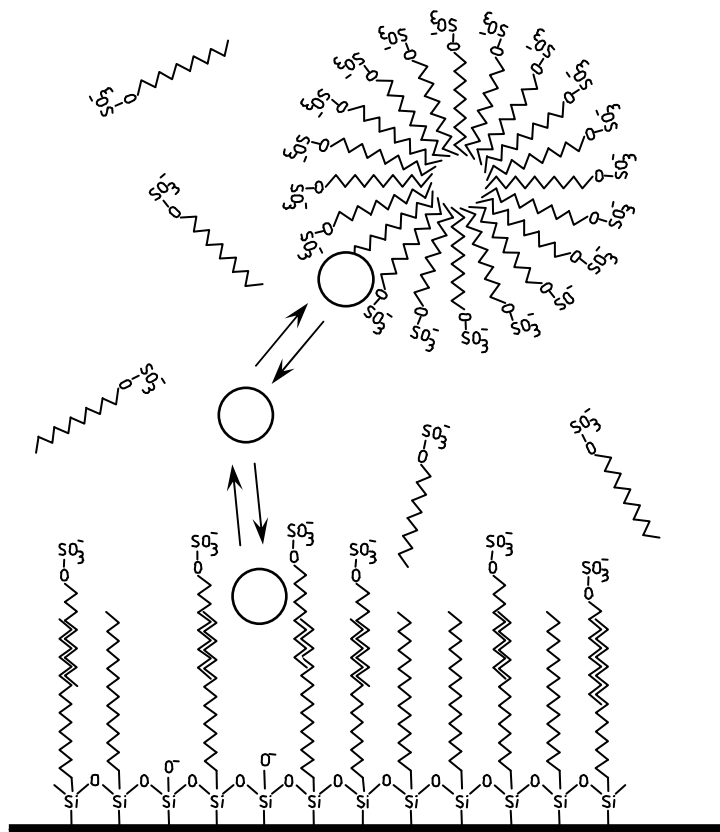


Figura 1.1. Entorn del solut en un sistema cromatogràfic amb una fase estacionaria octadecil (C18), i una fase mòbil que conté el tensioactiu aniònic SDS. S'han representat els equilibris entre el dissolvent, la micel·la i la fase estacionaria modificada pel tensioactiu. Reproduït amb permís de la referència [17].

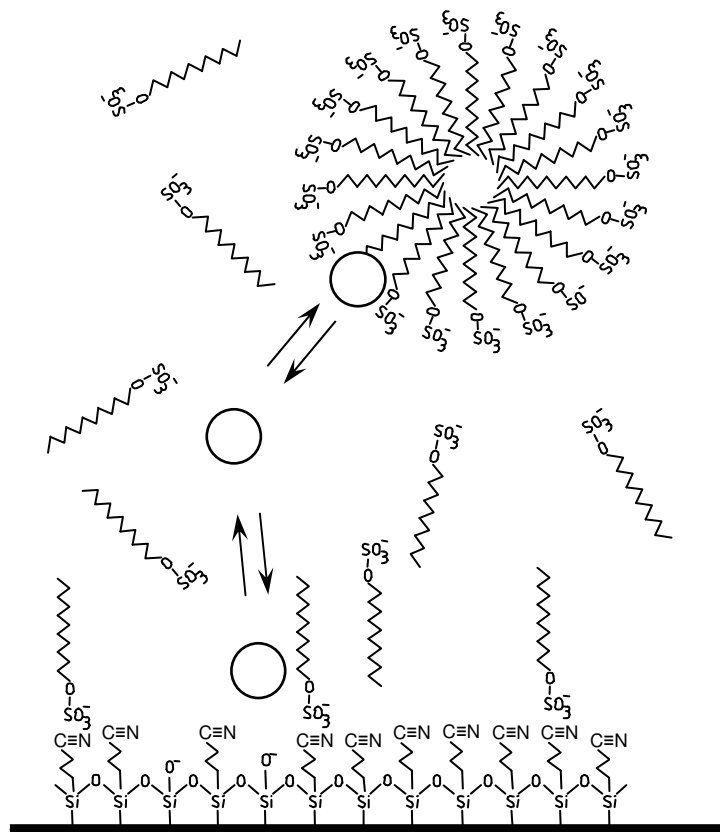


Figura 1.2. Entorn del solut en un sistema cromatogràfic amb una fase estacionària cianopropil, i una fase mòbil que conté el tensioactiu aniónic SDS. S'han representat els equilibris entre el dissolvent, la micel·la i la fase estacionària modificada pel tensioactiu. Reproduït amb permís de la referència [17].

b) Addició d'un dissolvent orgànic a les fases mòbils micel·lars

En RPLC, els dissolvents orgànics s'associen a la fase enllaçada, canviant la seua estructura i propietats. Les cadenes alquíliques d'1-propanol i les dels n-alcohols més llargues penetren de forma intermolecular en les cadenes alquíliques de la fase enllaçada per formar una monocapa simple, adoptant una estructura semblant a la dels monòmers de tensioactiu en MLC (figura 1.1), amb el grup hidroxil orientat cap a la fase aquosa [21].

Els dissolvents orgànics s'afegeixen a les fases mòbils micel·lars per millorar les eficàcies dels pics cromatogràfics i reduir els temps de retenció dels soluts, donant lloc a les denominades fases mòbils micel·lars híbrides. La competència entre els alcohols i les molècules del tensioactiu per les zones d'adsorció en la fase estacionària, explica la reducció lineal de la quantitat de tensioactiu adsorbit en augmentar la concentració d'alcohol en la fase mòbil. Les fases mòbils que contenen grans quantitats de dissolvent orgànic poden desorbir completament les molècules de tensioactiu de la fase enllaçada.

c) Ús de fases estacionàries de porus gran

La dèbil força eluent de les fases mòbils micel·lars pures és a causa de l'exclusió de les micel·les dels porus, en els quals resideix quasi tota la fase estacionària ($\geq 99\%$) [22]. Tenint en compte que les micel·les excloses no tenen accés directe als soluts associats a la fase estacionària (excepte quan aquests es difonen en l'exterior dels porus) [23], ni tan sols una elevada concentració de micel·les és suficient per eluir compostos amb moderat o elevat caràcter hidrofòbic. En el cas de tensioactius no iònics que formen micel·les més grans, els efectes estèrics són la raó més probable per a l'exclusió micel·lar en farciments de porus xicotet. Per la seua banda, en els tensioactius iònics, com SDS i CTAB, que formen micel·les carregades més xicotetes, tant els efectes electrostàtics com els estèrics són probablement els responsables de l'exclusió micel·lar: la càrrega resultant en la

superfície de la fase estacionària dins dels porus dóna lloc a un potencial semblant al de Donnan que tendeix a repel·lir a les espècies dels porus.

A fi de determinar si les fases estacionàries de porus gran poden compensar la dèbil força eluent en MLC, s'han estudiat diverses fases estacionàries C8 i C18 amb una grandària de porus compresa entre 100 i 4000 Å utilitzant fases mòbils micel·lars que contenen un tensioactiu no iònic (Brij-22), aniònic (SDS), o catiònic (bromur de dodeciltrimetilamoni, *dodecyl trimethyl ammonium bromide*, DTAB) [22]. Cal assenyalar que, a mesura que augmenta la grandària dels porus, la seua superfície específica es redueix, i com a conseqüència, el volum de la fase estacionària enllaçada també disminueix. Per tant, utilitzant la mateixa fase mòbil, la retenció d'un solut en una columna de porus gran serà necessàriament menor que en una altra columna d'ídntiques característiques però de porus xicotet. Així, per obtenir una conclusió vàlida, els autors van comparar la retenció de soluts de diversa naturalesa utilitzant fases mòbils aquo-orgàniques i fases mòbils micel·lars, i van observar que les columnes de porus gran permetien una penetració més eficaç de les micel·les en els porus, de manera que eren capaços d'associar-se millor amb els soluts en la superfície interna de la fase estacionària, i eluir-los en menor temps, tenint en compte la inevitable disminució de la retenció en augmentar la grandària de porus.

d) Supressió de l'activitat dels grups silanol

La superfície de la sílice porosa està recoberta amb grups silanol (Si-OH), que s'ionitzen a valors de $\text{pH} > 8$ ($\text{pK}_a = 9.8$) [24], els quals són els responsables de la polaritat de la sílice. Es poden obtenir farciments menys polars derivatitzant els grups silanol, encara que no tots ells es derivatitzaran. La interacció de les espècies carregades positivament amb els silanols lliures, és la principal causa de les baixes eficàcies i de l'aparició de pics asimètrics en la separació de compostos bàsics amb columnes

convencionals C8 i C18. Aquest efecte es pot evitar disminuint el pH de la fase mòbil, amb la qual cosa se suprimeix la ionització dels grups silanol.

En MLC, l'efecte dels silanols es veu reduït per l'emascament de l'SDS adsorbit, en compte de per la desactivació directa dels mateixos. Els compostos bàsics carregats positivament interaccionen amb la capa de tensioactiu carregada negativament (procés ràpid), sense penetrar massa en la capa alquil-enllaçada per interaccionar amb els silanols emmascarats (procés lent), la qual cosa dóna lloc a una millora en l'eficàcia i a l'eliminació de les cues dels pics [25]. S'han publicat diversos treballs d'MLC utilitzant columnes convencionals C18 i SDS, on s'obtenen bons resultats en l'anàlisi de diversos grups de compostos bàsics, com ara β -bloquejants [26], fenetilamines [27], tetraciclines [28], i antidepressius tricíclics [29].

No obstant això, els tensioactius catiónics, com CTAB, no serien d'utilitat en l'anàlisi de compostos bàsics, atès que una fracció significativa dels grups amoni del CTAB es trobe emmascarada per la capa C18, la fase estacionària està carregada positivament, i els compostos bàsics protonats seran repel·lits.

1.5. Cura de la columna cromatogràfica en MLC

1.5.1. Saturació de la fase mòbil

Tant les dissolucions micel·lars pures com les híbrides contenen elevades quantitats d'aigua (generalment més del 90%, v/v), i tenen la capacitat de dissoldre xicotetes quantitats de sílice, la qual cosa pot danyar greument la columna. Això és especialment crític a 30 °C i/o a pH 6. Per aquest motiu, i a fi de saturar de sílice de la columna, ha d'utilitzar-se una precolumna de curta longitud farcida de sílice (10 μ m), o bé, amb el mateix farciment que el de una columna analítica utilitzada. La precolumna se situa entre la bomba i la vàlvula d'injecció per amortir l'augment de pressió del sistema cromatogràfic.

1.5.2. *Condicionament de la columna*

Una columna per ús en l'MLC, es conserva generalment en metanol. Abans del seu condicionament, el dissolvent orgànic ha de ser substituït completament per aigua. Aquesta operació, es duu a terme al principi a un baix flux (≤ 0.5 mL/min) a causa de l'alta viscositat de la mescla entre aigua i metanol, però una vegada que la pressió disminueix, el flux pot ser augmentat. Es necessiten diversos volums d'aigua per assegurar la completa eliminació del dissolvent orgànic, i una volta realitzada aquesta operació, el sistema cromatogràfic està preparat per bombar la fase mòbil micel·lar. Diferents estudis sobre el recobriment de la columna han revelat que la majoria dels tensioactius s'adsorbeixen en menys d'una hora sobre la fase estacionària enllaçada [8, 18].

1.5.3. *Bombeig de la fase mòbil*

La fase mòbil micel·lar ha de bombar-se de manera continua en el sistema cromatogràfic. Si aquest es deté durant diverses hores, la dissolució micel·lar no ha de romandre en contacte amb la sílice de la fase estacionària per evitar la precipitació del tensioactiu. Una fase mòbil micel·lar amb el flux detingut també pot originar cristalls al voltant dels pistons de la bomba i dels seus segells. Aquests cristalls poden obstruir el sistema cromatogràfic taponant els tubs connectors i frites, produir fallades en els segells, o ratllar els pistons. Una fase mòbil micel·lar pot mantenir-se en el sistema cromatogràfic durant la nit si no es deté la bomba. Això evita la neteja diària i un nou recondicionament. Per reduir els costos, la fase mòbil es pot reciclar, baixant considerablement el flux (sovint entre 0.1–0.25 mL/min). No obstant això, ha de tenir-se en compte que en cas de fallada en la xarxa elèctrica, la columna pot danyar-se. La fase mòbil pot reciclar-se a causa del baix risc d'evaporació dels dissolvents orgànics en les fases micel·lars híbrides. Per la mateixa raó, també poden reciclar-se durant les anàlisis, sempre que es realitzen un nombre reduït d'injeccions.

1.5.4. Regeneració de columnes en fase inversa recobertes amb un tensioactiu

Hi ha una certa preocupació pel que fa a la desorció del tensioactiu de la fase estacionària. Alguns autors afirmen que no és possible eliminar la capa de tensioactiu adsorbit i utilitzar posteriorment en aquesta mateixa columna una altra fase mòbil de diferent naturalesa (p.ex., aquo-orgànica o amb un altre tensioactiu). En aquest sentit, s'ha publicat que una xicoteta quantitat d'SDS roman adsorbida en una columna Hypersil C18 després de la seua neteja [30], mentre que altres autors han constatat la completa eliminació de la capa de tensioactiu [8, 31–33]. Per aquesta raó, es recomana utilitzar una columna per al seu ús exclusiu amb un determinat tensioactiu. En general, la regeneració de la fase estacionària pot dur-se a terme satisfactòriament amb metanol, en què la majoria dels tensioactius són molt solubles [33]. El protocol de neteja consisteix en dues etapes, la duració total del qual és aproximadament de mitja hora:

- (i) En primer lloc, la fase mòbil micel·lar se substitueix per un 100% d'aigua pura, netejant el sistema cromatogràfic amb 10 a 20 volums d'aigua pura. Aquest pas és necessari per evitar la cristal·lització de sals, que tindria lloc si es canviara dràsticament la fase mòbil micel·lar tamponada per un 100% de metanol.
- (ii) A continuació, l'aigua és reemplaçada per un 100% de metanol per eliminar el tensioactiu adsorbit en la fase estacionària. Com ja es va indicar en l'apartat 1.5.2, s'ha de treballar inicialment a un flux menut per evitar canvis bruscs de pressió en el sistema cromatogràfic. Per assegurar la completa desorció del tensioactiu, s'han de passar a través de la columna almenys 10 volums de metanol.

Pot dur-se a terme una última etapa per assegurar la completa recuperació de la fase estacionària inicial. Aquesta consisteix a comprovar els temps de retenció d'una mescla de soluts (seleccionats de forma arbitrària), utilitzant una fase mòbil aquo-orgànica abans i després d'usar la fase mòbil micel·lar. Aquest pas no és necessari si es porta a terme de forma adequada el condicionament i la neteja de la columna. D'altra banda, no s'ha

observat un menor temps de vida de les columnes utilitzades en MLC respecte a les emprades en RPLC, però si que s'ha constatat una disminució de la seua eficàcia a causa del seu envelliment.

1.6. Interaccions solut-micel·lar i solut-fase estacionària

Les possibilitats úniques que ofereixen les fases mòbils micel·lars s'atribueixen a la capacitat de les micel·les de compartimentar i organitzar de forma selectiva, els soluts a nivell molecular. No obstant això, l'associació dels monòmers de tensioactiu amb la fase estacionària té importants connotacions pel que fa a la retenció i a la selectivitat. El comportament cromatogràfic en RPLC d'un solut eluït amb una fase mòbil que conté un tensioactiu en una concentració superior a la CMC, es pot explicar tenint en compte tres fases: la fase estacionària, el dissolvent i la pseudofase micel·lar. La figura 1.1 representa el model de les tres fases. Els soluts se separen basant-se en el seu diferent repartiment entre el dissolvent i les micel·les de la fase mòbil o entre el solut i el tensioactiu que recobreix la fase estacionària. Per a les espècies no solubles en aigua, el repartiment pot ocórrer també a través de transferència directa dels soluts entre la pseudofase micel·lar i la fase estacionària modificada (figura 1.3).

Els equilibris de repartiment en MLC es poden descriure mitjançant tres coeficients: P_{WS} (repartiment entre el medi aquós i la fase estacionària), P_{WM} (repartiment entre el medi aquós i les micel·les), i P_{MS} (repartiment entre les micel·les i la fase estacionària). Els coeficients P_{WS} i P_{WM} expliquen l'afinitat del solut per la fase estacionària i les micel·les, respectivament, i tenen efectes oposats sobre la retenció dels soluts: la retenció augmenta amb el valor de P_{WS} , mentre que disminueix quan P_{WM} augmenta a causa d'una associació més forta amb les micel·les.

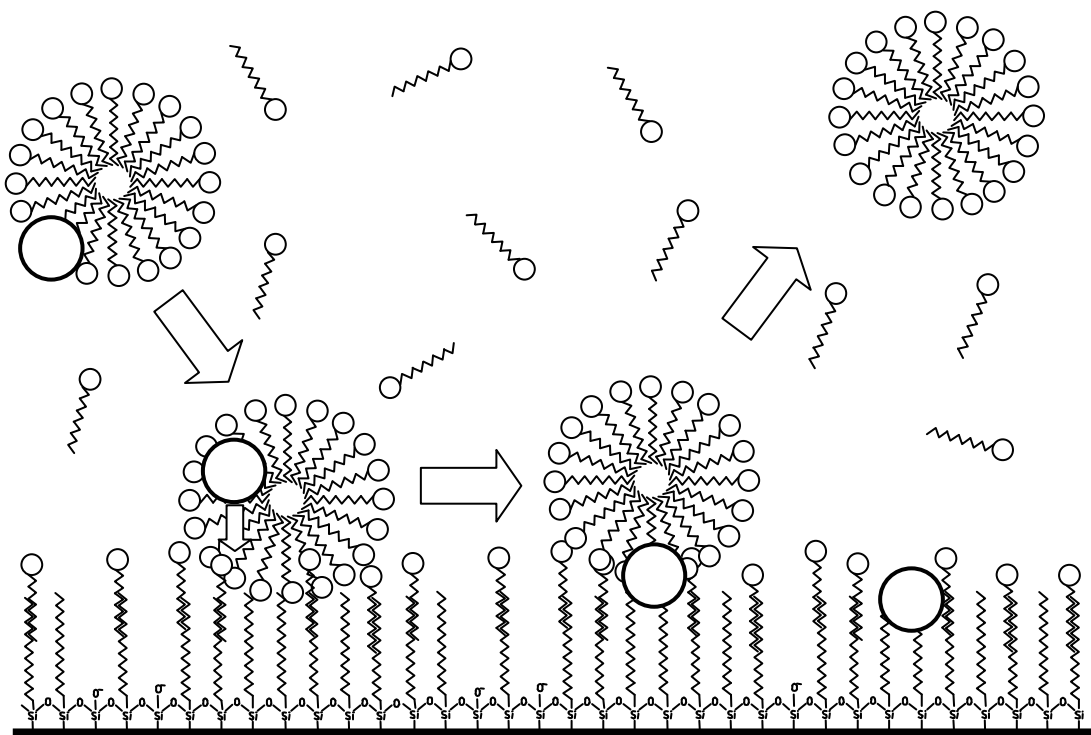


Figura 1.3. Transferència directa de soluts altament hidrofòbics entre les micel·les i la fase estacionària modificada pel tensioactiu. Reproduït amb permís de la referència [17].

1.6.1. *Naturalesa de les interaccions*

El comportament de retenció depèn de les interaccions que s'estableixen d'una banda entre el solut i la fase estacionària modificada pel tensioactiu, i d'una altra, entre el solut i les micel·les. Tant els soluts neutres que elueixen amb tensioactius no iònics i iònics, com els soluts carregats que elueixen amb tensioactius no iònics, només estan afectats per interaccions apolar, dipol-dipol i donador/acceptor de protons [34]. A més d'aquestes interaccions, els soluts carregats interaccionen electrostàticament amb els tensioactius iònics (és a dir, amb la capa carregada de tensioactiu de la fase estacionària i la capa exterior de les micel·les carregades). D'altra banda, el factor estèric també ha de tenir-se en compte.

En el cas de tensioactius iònics, es poden donar dues situacions en funció de les càrregues del solut i tensioactiu: repulsió o atracció (tant per part de la fase estacionària modificada pel tensioactiu, com de les micel·les). En el cas de la repulsió electrostàtica, els soluts carregats no són retinguts per la fase estacionària i elueixen en el temps mort, llevat que existisca una interacció hidrofòbica significativa amb la capa enllaçada modificada. Al contrari, la combinació d'atraccions electrostàtiques i interaccions hidrofòbiques amb la fase estacionària modificada pot donar lloc a elevades retencions en l'MLC. Així doncs, es poden resoldre mescles de soluts polars i no polars, sempre que es trie el tensioactiu adequat.

1.6.2. *Soluts enllaçants, no enllaçants i antienllaçants*

La funció de la pseudofase micel·lar en MLC ha sigut comparada amb la del modificador orgànic en RPLC clàssica, ja que per a la majoria dels soluts un augment en la concentració del tensioactiu en la fase mòbil produeix una disminució de la retenció. Això contrasta amb el que ocorre en IPC, on l'addició d'un tensioactiu iònic augmenta la retenció dels soluts a causa de la seua atracció electrostàtica amb la fase estacionària

modificada. Tanmateix, cal assenyalar que en MLC, la força eluent augmenta amb la concentració del tensioactiu només si el solut interacciona amb les micel·les.

Els soluts es classifiquen en tres categories, segons el seu comportament d'elució en una fase mòbil micel·lar: soluts enllaçats a les micel·les, no enllaçats i antienllaçants [35]. En el cas dels soluts que s'associen o enllacen a les micel·les, la seua retenció disminueix quan augmenta la concentració de les micel·les en la fase mòbil. Per als soluts que no s'associen a les micel·les, la retenció pot romandre inalterada quan es modifica la concentració micel·lar (no enllaçant), o augmentar en incrementar la mateixa (antienllaçant). El comportament més freqüent és l'enllaçant a les micel·les, mentre que l'antienllaçant és poc comú.

La repulsió electrostàtica és important en el comportament antienllaçant, ja que la càrrega dels soluts antienllaçants en presència de tensioactius aniònics o catiònics és negativa o positiva, respectivament. Mai s'ha observat el comportament antienllaçant entre un solut carregat i un tensioactiu de càrrega oposada. No obstant això, els compostos carregats positivament eluïts amb tensioactius catiònics, i els carregats negativament eluïts amb tensioactius aniònics, poden mostrar un comportament enllaçant a causa de les interaccions hidrofòbiques.

El comportament antienllaçant no s'ha constatat en fases estacionàries de C8 o C18 modificades per l'adsorció de tensioactius iònics, ja que la repulsió entre els soluts i la capa de tensioactiu carregada que recobreix la fase estacionària tendeix a eluir-los prop del temps mort. Al contrari, si que s'observa un comportament antienllaçant quan s'utilitzen fases estacionàries que no adsorbeixen grans quantitats de tensioactiu (p.ex., C1), o fases enllaçades ciano (on la càrrega del tensioactiu està oculta prop de la fase enllaçada, figura 1.2). Segons pareix, això es deu al fet que els compostos són fortament exclosos o repel·lits per les micel·les, la qual cosa força al solut a anar cap a la fase estacionària, on és retingut a causa de les interaccions hidrofòbiques.

El fet que la força iònica siga capaç de modificar el comportament dels soluts d'antienllaçants a enllaçants, prova la naturalesa electrostàtica de les interaccions implicades. Així, en absència de sals, el blau de bromofenol elueix amb SDS en una columna cianopropil comportant-se com un compost anti-enllaçant, mentre que en presència de tan sols 0.02 M NaCl pareix comportar-se com un compost no enllaçant, i en una concentració de sal lleugerament més alta, s'enllaça fortament a les micel·les d'SDS [36]. Tanmateix, pareix que per a la transició de solut antienllaçant a no enllaçant, i, posteriorment a enllaçant, l'hidrofobicitat del solut carregat ha de ser prou alta per associar-se amb la part no polar de la micel·la, una vegada que la repulsió electrostàtica s'haja minimitzat per addició d'una sal.

1.7. Descripció del comportament de retenció en fases mòbils micel·lars

La majoria dels procediments descrits per a la determinació de compostos en MLC fan ús de fases mòbils micel·lars que contenen un dissolvent orgànic, generalment un alcohol de cadena curta o acetonitril. Aquests modificadors augmenten la força d'elució, i moltes vegades milloren la forma dels pics cromatogràfics. Els dissolvents orgànics solvaten la fase estacionària i redueixen la quantitat de tensioactiu adsorbit, sent aquest efecte major en augmentar la concentració i l'hidrofobicitat d'aquests. La selecció del pH en la fase mòbil és també sovint molt important per a la resolució de mescles complexes, a causa de les reaccions secundàries àcid-base de molts soluts. Altres variables a considerar són la temperatura i la força iònica.

El cromatografista ha d'obtenir la fase mòbil òptima que permeti la separació d'una mescla de compostos en el menor temps possible. Aquesta tasca pot ser molt difícil quan en el procés d'optimització estan implicades dues o més variables. L'optimització de la composició de la fase mòbil pot dur-se a terme de forma seqüencial o interpretativa. En una estratègia seqüencial, es desconeix el comportament de retenció dels soluts i cada conjunt d'experiments es dissenya tenint en compte els resultats obtinguts anteriorment.

En canvi, en una estratègia interpretativa, els experiments es dissenyen abans de desenvolupar el procés d'optimització, i els resultats s'usen per ajustar equacions d'un model que permeti la predicció de la retenció de cada solut, i la condició de separació òptima, per la qual cosa aquesta estratègia pot ser molt més eficaç i fiable. No obstant això, l'ús d'una estratègia seqüencial no és adequat quan hi ha diversos òptims de resolució locals (com ocorre en cromatografia), i pot no conduir a la fase mòbil òptima verdadera.

La necessitat d'un disseny experimental adequat és especialment important en sistemes de cromatografia líquida per a l'anàlisi simultània de compostos iònics i no iònics, com l'MLC, on s'han de controlar diverses variables (p.ex., el tipus i la concentració de tensioactiu i dissolvent orgànic, pH, temperatura, i força iònica). L'estratègia de desenvolupament d'un mètode ha de proporcionar una resposta al cromatografista sobre quines variables han d'utilitzar-se i com configurar els experiments inicials per trobar d'una manera eficaç, l'espai adequat de les variables.

El procés de separació en un sistema de cromatografia líquida micel·lar requereix un enfocament estructurat en el desenvolupament d'aplicacions pràctiques. Allò ideal seria que la resolució de mescles complexes s'efectuara i optimitzara en poc de temps, i amb el menor consum de reactius.

1.7.1. Models empírics

La retenció pot ser modelitzada en una fase mòbil micel·lar híbrida fent ús d'un procediment que utilitza les dades de retenció obtingudes en només cinc fases mòbils [37]: quatre d'elles es troben situades en els vèrtexs d'un espai de variables bidimensional, definit per les concentracions de tensioactiu i modificador, i la cinquena en el seu centre. Les dades cromatogràfiques (factor de retenció, eficàcia i factor d'asimetria) s'utilitzen per ajustar algunes equacions. La taula 1.2 resumeix els models més freqüentment emprats per a la descripció del comportament de retenció.

Taula 1.2. Models empírics i mecanicistes utilitzats en MLC.

Models empírics ^a	Models mecanicistes ^b
$\log k = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi$	$(1.1) \quad k = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM}[M]} \quad (1.6)$
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M]$	$(1.2) \quad k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]} \quad (1.7)$
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi$	$(1.3) \quad k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2} [M]} \quad (1.8)$
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi$	$(1.4) \quad k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]} \quad (1.9)$
$\frac{1}{k} = c_0 + c_1[M] + c_2\varphi + c_3[M]\varphi + c_{11}\varphi^2$	$(1.5) \quad k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD1}\varphi + K_{MD2}\varphi^2}{1 + K_{AD1}\varphi + K_{AD2}\varphi^2} [M]} \quad (1.10)$

^a k és el factor de retenció per a una determinada composició de fase mòbil; $[M]$ és la concentració de tensioactiu formant micel·les (concentració total de tensioactiu menys la concentració micel·lar crítica, CMC); φ és la fracció volumètrica de dissolvent orgànic; c_0 , c_1 , c_2 , c_3 , c_{11} són els coeficients d'ajust.

^b K_{AS} és el producte del coeficient de repartiment solut (A)-fase estacionària (S) per la relació de fases, i K_{AM} la constant d'associació solut-micel·la (M); K_{AD} (K_{AD1} , K_{AD2}), K_{MD} (K_{MD1} , K_{MD2}), i K_{SD} mesuren la variació relativa de la concentració del solut en l'aigua, la micel·la, i la fase estacionària, respectivament, en presència del modificador, prenent com a referència la dissolució micel·lar pura; K_{AD2} correspon a una variació hiperbòlica quadràtica en K_{AS} i K_{AM} amb φ .

Les equacions 1.1 – 1.5 corresponen a models empírics. L'equació 1.1 estableix que la retenció dels soluts està relacionada linealment amb les variables de la fase mòbil en una regió determinada, i s'ajusta a una funció lineal logarítmica, però les prediccions obtingudes amb aquesta equació no són prou precises. S'ha demostrat en nombrosos treballs que la retenció en fases mòbils micel·lars que contenen una quantitat fixa de dissolvent orgànic, o en absència d'aquest, es descriu mitjançant una relació hiperbòlica (equació 1.2) [38]. S'utilitza l'equació 1.3 per modelitzar la retenció d'un solut a diferents concentracions de tensioactiu i modificador [39], la qual ha proporcionat resultats exactes per a xicotets intervals de concentracions de tensioactiu i modificador orgànic. Això no obstant, en dominis més amplis ha de considerar-se la interacció entre ambdós factors, $[M]$ i φ .

D'acord amb això, s'ha estudiat la capacitat d'una sèrie d'equacions empíriques per descriure el comportament de retenció utilitzant qualsevol concentració de tensioactiu i dissolvent orgànic en la fase mòbil [40–42]. Es van considerar diversos models on $\log k$ o $1/k$ se van relacionar amb la concentració micel·lar i la fracció volumètrica del modificador orgànic. Els models logarítmics van conduir generalment a pitjors resultats. L'equació 1.4 és la més senzilla que va donar lloc a bones prediccions per a compostos polars i moderadament polars, com ara aminoàcids, sulfamides, β -bloquejants i diürètics. Aquesta equació origina representacions lineals d' $1/k$ vs. φ , a concentracions fixes del tensioactiu. Tanmateix, per als compostos altament hidrofòbics, com ara els esteroides o els hidrocarburs aromàtics policíclics, les representacions no són lineals, i ha d'afegir-se un altre terme per aconseguir descripcions més exactes (equació 1.5). Els paràmetres en les equacions 1.4 i 1.5 s'obtenen ajustant les dades de retenció d'acord amb dissenys experimentals amb un mínim de quatre i cinc fases mòbils, respectivament. No obstant això, ha de realitzar-se almenys una mesura addicional per comprovar l'exactitud dels ajustos.

1.7.2. *Models mecanicistes*

Més tard, els paràmetres dels models empírics en MLC es van relacionar amb constants quimicofísiques, que descriuen les interaccions dels soluts amb els tres entorns implicats en les fases mòbils micel·lars: la fase aquosa, les micel·les, i, la fase estacionària. Aquests models han proporcionat una major comprensió del mecanisme de retenció en els sistemes micel·lars.

Els models mecanicistes es basen en l'equació clàssica proposta per a les fases mòbils micel·lars a una fracció volumètrica fixa del modificador orgànic (equació 1.2) [38]. Aquesta equació pot escriure's com l'equació 1.6, la qual relaciona la retenció d'un solut amb la concentració dels monòmers del tensioactiu en forma de micel·les.

Per a fases mòbils micel·lars híbrides, l'equació 1.4 es pot expressar com l'equació 1.7, mentre que l'equació 1.5 dóna lloc a l'equació 1.8 [43], la qual cosa indica una dependència excessiva de la retenció respecte a la concentració de dissolvent orgànic, i pot originar errors considerables quan s'extrapola a una regió amb elevada concentració d'aquest.

Així, per a soluts altament hidròfòbics es va proposar un model alternatiu (equació 1.9), on es té en compte el canvi addicional que es produeix en la concentració del solut associat amb la fase estacionària, en presència del modificador [43]. En l'equació 1.9, les constants K_{MD} i K_{AD} expliquen el desplaçament de l'equilibri entre aigua-micel·la, mentre que K_{SD} i K_{AS} descriuen la modificació de l'equilibri entre la fase estacionària-aigua. Aquests canvis són causats per la disminució de la polaritat de l'aigua, i la modificació de les interaccions del solut amb les micel·les i la fase estacionària, quan s'addiciona un modificador. Aquesta equació descriu de forma exacta la retenció dels soluts en un ampli interval de polaritats, quan s'elueixen amb fases mòbils híbrides d'SDS i alcohol (propanol, butanol o pentanol) [44], mentre que si s'utilitza acetonitril i tetrahidrofurà [44, 45], l'equació 1.10 s'adapta millor.

1.7.3. Modelització dels perfils de pic

El major inconvenient de l'MLC continuen sent els baixos valors d'eficàcia que s'obtenen, i que són causats per la resistència a la transferència de massa en els processos relacionats amb les micel·les i la fase estacionària modificada pel tensioactiu. Això és especialment important, ja que l'augment de la concentració micel·lar causa una disminució en el nombre de plats teòrics, la qual cosa dóna lloc a una eficàcia variable en l'espai de variables bidimensional definit per les concentracions de tensioactiu i modificador orgànic. Per tant, és molt important incloure la forma que s'espera obtenir dels pics cromatogràfics en les equacions del procés de modelització per garantir la seua qualitat. La complexitat del procés cromatogràfic no permet l'ús d'equacions senzilles per descriure els perfils dels pics. Les millors prediccions del perfil de pic s'obtenen utilitzant una equació gaussiana, on la desviació estàndard depèn polinomialment de la distància al temps del pic (model gaussià polinomialment modificat) [46]:

$$h(t) = H_0 e^{-0.5 \left(\frac{t-t_R}{s_0 + s_1(t-t_R) + s_2(t-t_R)^2 + \dots} \right)^2} \quad (1.11)$$

on $h(t)$ és el senyal predit al temps t , H_0 l'altura màxima del pic, t_R el temps de retenció, mentre que els coeficients s_i es relacionen amb l'amplària i asimetria del pic cromatogràfic. Per a un solut i fase mòbil donades, idealment, t_R i s_i són invariables, mentre que H_0 depèn de la concentració. S'obtenen millors descripcions dels perfils de pic si s'incrementa el grau del polinomi, encara que disminueix l'aplicació pràctica del model. En general, s'obtenen bons resultats per a pics molt asimètrics ($B/A > 2.5$), independentment que la deformació es presente en la cua o front del pic, i a més, els pics modelitzats permeten realitzar millors estimacions de les eficàcies i factors d'asimetria que els obtinguts a partir de la mesura directa dels senyals cromatogràfics.

1.7.4. Estratègies per a la mesura de la resolució de pics

La simulació de cromatogrames requereix predir la retenció dels pics cromatogràfics i el seu perfil amb la major exactitud possible. L'optimització assistida per ordinador intenta mimetitzar la metodologia seguida per un cromatografista experimentat, en un temps inferior i amb menor esforç. Existeix en el mercat un programa informàtic per ajudar al cromatografista en la selecció de la composició de la fase mòbil òptima en MLC [47]. Aquest programa realitza la predicció ràpida de cromatogrames, i possibilita l'observació dels canvis que es produeixen en simular variacions en la composició de la fase mòbil. La selecció de la composició òptima de la fase mòbil pot dur-se a terme a partir de l'observació de les superfícies de resolució o del simulador de cromatogrames.

S'han proposat diferents mesures de diversa complexitat per indicar el rendiment cromatogràfic [1]. Els criteris d'optimització basats en el càlcul d'una mesura de la resolució individual o elemental, r_i , per al pic o parell de pics pitjor resolts, són molt utilitzats en la pràctica cromatogràfica, a causa de la seua simplicitat:

$$R_s = \text{MIN}(r_i) \quad 1 \leq i \leq p \quad (1.12)$$

on p és el nombre de pics o parell de pics, i R_s resolució global.

Aquest criteri és raonable, però únicament considera la resolució d'uns pocs compostos, sent insensible a la resta. En molts casos, es pot millorar la resolució d'aquests últims, sense que a penes es modifiqui la del compost pitjor resolts.

El producte de les resolucions de pic soluciona aquest inconvenient, ja que optimitza la resolució de tots els pics en el cromatograma. Convencionalment s'aplica el producte normalitzat per la mitjana (equació 1.13). Aquest tractament normalitza la resolució, utilitzant la mitjana de les resolucions individuals (r_i) de tots els pics en el cromatograma, en compte dels valors extrems. La taula 1.3 mostra les equacions de les funcions de resolució global i les dels criteris elementals de resolució.

El producte no normalitzat (equació 1.14) pareix una alternativa millor, encara que només pot utilitzar-se amb mesures de resolució intrínsecament normalitzades. Aquest producte varia entre 0 (solapament total entre almenys dos pics) i 1 (resolució completa per a cada pic del cromatograma). La proximitat de R_S a la unitat és una mesura de la qualitat de la separació.

Després de la selecció de la funció de la resolució global, s'ha de triar el criteri adequat de resolució elemental (taula 1.3). Alguns criteris s'han basat en mesures elementals convencionals, com la selectivitat modificada (equació 1.15), les mesures de vall-pic (equació 1.16), i la mesura de les fraccions solapades (equació 1.17) [1].

En el criteri vall-pic, el vall es pot mesurar en el temps que proporciona la major distància possible, mesurada ortogonalment. Si s'observa la vall d'aquesta forma, aquest punt es pot determinar, fins i tot quan hi haja un solapament important.

El criteri de les fraccions solapades considera no sols la posició dels pics, sinó també els seus perfils. A més, aïlla les contribucions de cada component en una mescla, associant un valor a cada pic individual, que no es veu afectat per la identitat dels pics veïns, i finalment, la normalització intrínseca facilita la comprensió de la informació obtinguda en el procés d'optimització.

Taula 1.3. Funcions de resolució global i criteris de resolució elemental utilitzats en cromatografia líquida micel·lar.

Funció de resolució

$$R_S = \frac{\prod_{i=1}^p r_i}{\left[\frac{\sum_{i=1}^p r_i}{p} \right]^p} \quad (1.13)$$

$$R_S = \prod_{i=1}^p r_i \quad (1.14)$$

$$r_{i,i+1} = 1 - \frac{k_i}{k_{i+1}} \quad (1.15)$$

$$r_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2} \quad (1.16)$$

$$r_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (1.17)$$

k_i i k_{i+1} ($k_{i+1} > k_i$) són els factors de retenció de dos pics contigus, i $a_{i,i+1}$ és la selectivitat; h_1 representa l'altura del senyal a un temps específic que descriu la situació de la vall, i h_2 una altura interpolada, mesurada a aquest temps, des de la línia base a la línia obtinguda en unir els màxims dels dos pics veïns; o_i' és l'àrea davall un pic donat solapada pel cromatograma format per la resta de pics, i o_i l'àrea total d'aquest pic.

1.8. Cromatografia líquida submicel·lar

Recentment s'han descrit dos modes de cromatografia micel·lar depenent de les concentracions de tensioactiu (SDS) i dissolvent orgànic [48–50], cada un amb característiques particulars.

Cromatografia submicel·lar baixa

En aquest mode cromatogràfic, la fase estacionària es recobreix amb SDS, adquirint així una càrrega negativa. Els soluts catiónics poden interaccionar hidrofòbicaament amb la part de la capa alquil-enllaçada que no ha sigut recoberta pel tensioactiu, o mitjançant atracció electrostàtica amb els monòmers del tensioactiu adsorbit. Mentre que la quantitat adsorbida de tensioactiu no assoleix la capacitat màxima de la columna, la capa de tensioactiu en la fase estacionària augmenta amb la seua concentració en la fase mòbil. Això incrementa els temps de retenció.

En condicions submicel·lars de baixa concentració de tensioactiu, el nombre de molècules lliures d'aquest en la fase mòbil és insignificant. Això indica que predominarà un mecanisme de retenció d'intercanvi iònic, mentre que serà pràcticament inexistent la formació de parells iònics amb el tensioactiu en la fase mòbil. L'addició d'un dissolvent orgànic a la fase mòbil augmenta, d'una banda, la seua força eluent com a conseqüència de la disminució de la polaritat de fase mòbil, i d'una altra, la competència entre les molècules del dissolvent orgànic i les del tensioactiu pels punts d'adsorció. Això redueix la quantitat de tensioactiu adsorbit en la fase estacionària.

Cromatografia submicel·lar alta

En aquest cas, el tensioactiu està en una la concentració suficient perquè es formen micel·les en el medi aquós, mentre que el contingut del dissolvent orgànic és alt. No obstant això, en aquestes condicions s'evita la formació de micel·les. Per tant, en la fase

mòbil només hi ha els monòmers de tensioactiu, que es troben dissolts en el medi aquo-orgànic. El mecanisme de retenció predominant en aquesta zona depèn de la quantitat de tensioactiu que ha sigut desorbit de la fase alquil-enllaçada pel dissolvent orgànic, així com de l'existència de micel·les. Mentre que una certa quantitat de tensioactiu es mantinga adsorbida, i existisquen micel·les, el mecanisme de retenció serà el mateix que en el mode micel·lar. Quan les micel·les es disgreguen, s'aconsegueixen condicions submicel·lars on les interaccions entre els parells iònics amb els monòmers de tensioactiu en la fase mòbil, substituiran a les interaccions amb les micel·les.

1.9. Conclusions

L'addició d'un tensioactiu a la fase mòbil en RPLC, canvia el comportament cromatogràfic respecte a les fases aquo-orgàniques. En IPC, on s'utilitza una quantitat deliberadament baixa d'un tensioactiu iònic (per davall de la seua CMC), la fase estacionària està modificada per l'adsorció de monòmers de tensioactiu, la qual cosa dona lloc a un augment de la retenció dels soluts amb una càrrega oposada a la del tensioactiu. En MLC, s'utilitzen tensioactius tant neutres com carregats, en una concentració superior a la seua CMC, la qual cosa té implicacions importants tant en la fase mòbil com en l'estacionària. Aquesta última es veu modificada, però ara l'adsorció aconseguix la saturació, o mostra canvis relativament xicotets amb la composició de la fase mòbil. D'aquesta manera, s'obté una fase estacionària estable (en un procés reversible), amb característiques substancialment diferents de les de la fase enllaçada subjacent, la qual cosa té un profund impacte en les interaccions del solut. També és important el fet que a concentracions superiors a la CMC, els monòmers de tensioactiu s'agreguen per formar micel·les, mostrant propietats particulars de solubilització notablement diferents de les de les fases aquo-orgàniques. Els soluts altament hidrofòbics es desorbeixen fàcilment de la fase estacionària espentats per les micel·les. Aquesta és la raó de "l'efecte gradient" en MLC quan s'augmenta la concentració de tensioactiu en condicions isocràtiques.

Mentre es mantinga la integritat de les micel·les, l'addició d'un dissolvent orgànic no donarà lloc a un sistema aquo-orgànic, encara que en els sistemes híbrids les interaccions entre els soluts i les micel·les siguin més dèbils, i la fase estacionària siga més semblant a la d'RPLC clàssica. En tot cas, la presència d'un tensioactiu associat bé a la fase estacionària, o bé a la fase mòbil en RPLC, implica un canvi en els mecanismes de retenció, que afecta la retenció i la selectivitat.

La varietat d'interaccions que tenen lloc en MLC, no existeix en cap fase mòbil homogènia aquo-orgànica. A causa de la naturalesa anfifílica dels tensioactius, els soluts poden associar-se tant amb les micel·les com amb el tensioactiu que recobreix la fase estacionària mitjançant una combinació d'interaccions electrostàtiques, hidrofòbiques i estèriques. Per aquesta raó, les fases mòbils micel·lars són compatibles amb una àmplia varietat de soluts (des d'ionics a insolubles en aigua). El principal punt fort de l'MLC resideix precisament en la seua capacitat de desenvolupar i controlar la separació de mesclades de soluts catiónics, aniònics, i polars i no polars sense càrrega, mitjançant elució isocràtica.

Els tensioactius no iònics possibiliten canvis interessants en la polaritat de la fase estacionària. Així, s'ha constatat que les fases mòbils de Brij-35 en RPLC permeten simular *in vitro*, el procés de repartiment en biomembranes millor que l'RPLC clàssica [51]. Tanmateix, en aplicacions analítiques, es prefereixen els tensioactius iònics, en especial l'aniònic SDS [2]. Aquest tensioactiu és de fàcil disponibilitat, i té efectes interessants en soluts àcids, ja que es tornen més dèbils (p.ex., augmenta la regió de predomini de les espècies neutres), i en compostos bàsics, la retenció dels quals augmenta apreciablement a causa de l'atracció de l'espècie carregada positivament cap a la fase estacionària. A més, s'elimina la cua del pic cromatogràfic a causa de l'emascament efectiu dels grups silanol.

1.10. Referències

1. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Vol. 83, J. Cazes (Ed.), Marcel Dekker, Nova York, EUA, 2000.
2. M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *Sep. Purif. Rev.* 38 (2009) 45.
3. J.H. Knox, G.L. Laird, *J. Chromatogr.* 122 (1976) 17.
4. D.W. Armstrong, S.J. Henry, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 657.
5. U.D. Neue, Silica gel and its derivatization for Liquid Chromatography in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), Wiley, Chichester, Anglaterra, 2000, pp. 11450–11472.
6. K.L. Mittal (Ed.), *Micellization, solubilization and microemulsions*, vol. 1, Plenum Press, Nova York, EUA, 1979.
7. S. López Grío, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia* 48 (1998) 655.
8. A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1356.
9. M.F. Bogerding, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2183.
10. R.C. Murray, G.S. Hartley, *Trans. Faraday Soc.* 31 (1935) 183.
11. P. Sehgal, D.E. Otzen, *Prot. Sci.* 15 (2006) 890.
12. K. Beyer, D. Leine, A. Blume, *Coll. Surf. B: Biointerf.* 49 (2006) 31.
13. B. Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 165.
14. M.J. Ruiz Ángel, R.D. Caballero, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 31.
15. S.M. Briant, K.D. Altria, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1498.
16. S. López Grío, M.C. García Álvarez-Coque, W.L. Hinze, F.H. Quina, A. Berthod, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4826.
17. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1798.

18. A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1362.
19. B.K. Lavine, S. Hendayana, Y. He, W.T. Cooper, *J. Colloid Interf. Sci.* 179 (1996) 341.
20. B.K. Lavine, S. Hendayana, W.T. Cooper, Y. He, *ACS Symp. Ser.* 740 (2000) 290.
21. M.E. Montgomery, M.J. Wirth, *Anal. Chem.* 66 (1994) 680.
22. T.J. McCormick, J.P. Foley, C.M. Riley, D.K. Lloyd, *Anal. Chem.* 72 (2000) 294.
23. R. Baltus, B.K. Lavine, J. Ritter, *Sep. Sci. Technol.* 37 (2002) 3443.
24. J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
25. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. Sci.* 41 (2003) 350.
26. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 109.
27. M. Gil Agustí, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 35.
28. R.D. Caballero, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, *Anal. Lett.* 35 (2002) 687.
29. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 71.
30. J.H. Knox, R.A. Hartwick, *J. Chromatogr.* 204 (1981) 3.
31. A. Berthod, I. Girard, C. Gonnet. "Stationary phases in MLC surfactant adsorption and interaction with ionic solutes" en *Ordered Media in Chemical separations*, W.L. Hinze i D.W. Armstrong, Eds. (ACS Symp. Ser.), American Chemical Society, Washington D.C., EUA, 342 (1987) 130.
32. D.E. Keller, R.G. Carbonell, P.K. Kilpatrick, *J. Colloid Interface Sci.* 155 (1993) 124.
33. A. Berthod, A. Roussel, *J. Chromatogr.* 449 (1988) 349.

-
34. M.L. Marina, O. Jiménez, M.A. García, S. Vera, *Microchem. J.* 53 (1996) 215.
 35. D.W. Armstrong, G.Y. Stine, *Anal. Chem.* 55 (1983) 2317.
 36. D.W. Armstrong, G.Y. Stine, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 6220.
 37. E.D. Breyer, J.K. Strasters, A.H. Rodgers, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.* 511 (1990) 17.
 38. M. Arunyanart, L.J. Cline-Love, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1557.
 39. J.R. Torres Lapasió, M.J. Medina Hernández, R.M. Villanueva Camañas, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia* 40 (1995) 279.
 40. J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr.* 639 (1993) 87.
 41. J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr.* 677 (1994) 239.
 42. S. Torres Cartas, R.M. Villanueva Camañas, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 31.
 43. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta* 324 (1996) 163.
 44. S. López Grio, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 275.
 45. S. López Grio, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 187.
 46. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
 47. J.R. Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
 48. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, S. Carda Broch, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9706.

49. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3199.
50. M.J Ruiz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1786.
51. C. Quiñones Torrelo, Y. Martín Biosca, J.J. Martínez Pla, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, *Mini Rev. in Med. Chem.* 2 (2002) 145.

Capítol 2

Protocols de validació per a mètodes analítics

2.1. Resum

La validació és un requisit important en l'anàlisi químic. No obstant això, la conscienciació sobre la seua importància pareix de poca rellevància entre els químics analítics. Es plantegen diverses qüestions respecte d'això: per què i quan ha de fer-se?, què és el que cal fer exactament? Encara que en la bibliografia poden trobar-se prou indicacions i consells sobre validació, aquestes es refereixen a mètodes concrets, i ben sovint estan infrautilitzades. Alguns analistes consideren la validació de mètodes com quelcom que només pot fer-se en col·laboració amb altres laboratoris i per tant no la duen a terme. La comprensió de l'analista sobre la validació de mètodes es veu inhibida pel fet que molts dels termes tècnics utilitzats en els processos d'avaluació dels mètodes varien en els diferents sectors de la mesura analítica, tant pel que fa al seu significat com a la forma en què es determinen. La validació s'aplica a un protocol definit, per a la determinació d'un analit específic i en un rang de concentracions per a un determinat tipus d'assaig, i s'utilitza per a un propòsit específic. En general, la validació ha de verificar que el mètode funcione adequadament en tot el rang de concentracions de l'analit a què s'aplica. Així, aquestes característiques, junt amb una descripció d'aquells criteris necessaris per assolir l'objectiu plantejat, hauran de quedar perfectament definides abans de la validació. En aquest capítol es pretén revisar de forma global la necessitat dels processos de validació quan es desenvolupa un mètode analític, així com els criteris que han de seguir-se per aconseguir resultats de qualitat.

2.2. Objectiu de la validació

Hui en dia els laboratoris han de demostrar que els seus mètodes analítics proporcionen resultats fiables i adequats per a la finalitat i propòsit perseguits, ja que moltes de les decisions que es prenen estan basades en la informació que proporcionen aquestes dades. La validació de mètodes, junt amb altres activitats englobades en el control de la qualitat, permet demostrar la fiabilitat d'aquests resultats.

L'objectiu de la validació és comprovar l'aptitud dels mètodes, així com la capacitat del personal i del laboratori on se porten a terme, i se recolza en els paràmetres estadístics del procediment. El laboratori ha de confirmar que pot aplicar correctament, per exemple, un mètode normalitzat previ al seu ús en assajos o calibratges. Qualsevol variació en el mètode normalitzat implica la repetició d'aquesta confirmació.

En el cas de metodologies d'assaig o de calibratge desenvolupades per un laboratori, els mètodes han de ser adequats i totalment validats abans del seu ús. Els procediments i l'abast de la validació no són sempre els mateixos i han de ser establits individualment.

2.3. Bones pràctiques de laboratori

Per validar un mètode analític es requereix en primer lloc un entorn de treball que garantisca la seguretat dels resultats que es vagen a obtenir. La consecució d'aquesta garantia de qualitat requereix treballar d'acord amb unes pautes correctes.

El concepte bones pràctiques de laboratori, BPL, o també GLP (sigles del seu corresponent en anglès *good laboratory practice*), és un conjunt de regles, de procediments operacionals i pràctiques establides i promulgades per determinats organismes que es consideren de compliment obligatori per assegurar la qualitat i integritat de les dades produïdes en determinats tipus d'investigacions o estudis. En altres paraules, les normes BPL fan referència a l'organització i condicions de treball en què els laboratoris planifiquen, desenvolupen, monitoritzen i registren els seus assajos.

Els laboratoris d'I+D (investigació i desenvolupament) especialitzats en estudis no clínics destinats al registre de medicaments (de toxicologia, farmacologia, farmacocinètica, entre altres) van ser els primers a establir les BPL [1]. Aquestes normes van sorgir per evitar deficiències com ara experiments sense protocols previs, dades i resultats no supervisats o traçables, instruments i reactius en condicions inacceptables, mostres no representatives o personal no qualificat, entre altres. Enfront d'aquestes deficiències, les BPL preconitzaven un sistema unificat de treball i de gestió que permetera establir comparacions entre diferents laboratoris, intercanviar informació, l'acceptació mútua de resultats i la resolució de conflictes.

Les primeres BPL van ser les dels Estats Units en 1979, i en l'actualitat s'apliquen de forma general en tots els laboratoris d'I+D on se realitzen estudis sobre medicaments, cosmètics, additius alimentaris, plaguicides i productes químics en general quan afecten a temes de salut humana, animal o medi ambient. A Espanya, les BPL estan regulades per Reials decrets, 822/1993 del 18 de maig i el 2043/1994 del 14 d'octubre, i annexos a aquests Reials decrets.

A Europa, a mitjan dècada dels setanta, l'Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic, OCDE (*Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) i l'Organització Mundial de la Salut (OMS, *World Health Organization*, WHO) van començar a impulsar l'aplicació de les BPL nord-americanes arran de les malformacions congènites que va produir la talidomida, i en paral·lel van sorgir altres normes europees, com les ISO 9000 (Organització Internacional de Normalització, *International Organisation for Standardization*) [2].

S'ha aconseguit el consens, a escala mundial, sobre l'important paper que exerceix l'assegurament de la qualitat ja siga mitjançant l'aplicació de les BPL o de la norma ISO/IEC 17025:2005 (IEC: Comissió Electrotècnica Internacional, *International Electrotechnical Commission*) [3]. La filosofia de les BPL s'ha estès a laboratoris d'assaig dels sectors químic i agroalimentari, entre altres, i a laboratoris de control de qualitat de la indústria farmacèutica i biosanitària.

Els principis de les BPL van ser adoptats per l'OCDE en 1981 i revisats en 1997, i contenen les normes recomanades per dur a terme proves per a una àmplia varietat d'estudis realitzats amb propòsits reglamentaris i altres fins relacionats amb una avaluació.

Els principis de les BPL de l'OCDE són:

- Promoure la qualitat de les dades dels estudis.
- Comparar la qualitat d'aquestes dades com a base per a l'acceptació mútua entre països.
- Evitar en la mesura que siga possible la duplicació d'estudis, amb el consegüent estalvi de temps i recursos, si cada país pot confiar en les dades d'estudis desenvolupats en altres països.
- Contribuir a evitar que sorgisquen obstacles tècnics per al comerç, i a continuar millorant la protecció de la salut.

Les àrees de treball a què són aplicables les normes BPL són les següents:

- Organització i personal del laboratori.
- Instal·lacions.
- Atenció, allotjament i confinament dels elements utilitzats en els sistemes experimentals biològics.
- Aparells, materials, reactius i espècimens.
- Sistemes experimentals.
- Productes de referència i mostres d'assaig.
- Documentació.
- Arxius: emmagatzemament i conservació de registres.
- Verificació d'estudis.
- Realització d'inspeccions.

2.4. Validació de mètodes

El terme validació ha sigut definit en la bibliografia de diverses maneres i per nombrosos autors. Encara que els termes donats són diferents, el seu significat és sempre el mateix: a) especificar i implementar, b) aprovar, i c) documentar.

L'ISO 8402:1994 [4] defineix el terme validació com la confirmació per mitjà d'examen i l'aportació d'evidències objectives de què es compleixen els requisits particulars per a un ús específic proposat.

La validació de mètodes pot interpretar-se com el procés que defineix un requisit analític, i confirma que el mètode en qüestió presenta un potencial d'acord amb els requisits de l'aplicació. Per tant, serà necessari avaluar l'aptitud del potencial del mètode [5]. En el procés de validació queda implícit que els estudis realitzats per determinar la fiabilitat dels paràmetres del mètode s'han de dur a terme utilitzant un equip que complisca amb les especificacions establides, funcione correctament i estiga calibrat adequadament. Així mateix, l'analista que realitzi els estudis ha de ser competent en el camp de treball objecte d'estudi i tenir suficients coneixements per poder prendre decisions adequades a partir de les observacions realitzades durant els estudis.

Es considera que la validació del mètode està estretament vinculada al seu desenvolupament; de fet, normalment no és possible determinar amb exactitud en quin punt acaba el desenvolupament del mètode i comença la seua validació. Molts dels paràmetres del mètode que s'associen amb la validació solen avaluar-se, almenys de forma aproximada, durant el seu desenvolupament.

En química analítica, el terme validació també s'utilitza en el context de la instrumentació, per descriure el procés mitjançant el qual s'estableix que un instrument pot en un moment donat funcionar d'acord amb les especificacions de disseny. Aquest procés podria aconseguir-se, per exemple, per mitjà del calibratge o control del funcionament de l'instrument.

Segons la norma ISO/IEC 17025:2005 [3], els laboratoris han de validar tots els mètodes que utilitzen, tant els desenvolupats per ells mateixos com aquells procedents de fonts bibliogràfiques o desenvolupats per altres laboratoris. A més, el laboratori també ha de validar els mètodes de referència encara que, en aquest cas, no és necessari que es realitzi una validació completa. Així mateix, ha de validar-se tot procediment analític tenint en compte l'interval de concentracions i de matrius de les mostres de rutina. Els criteris de qualitat que han de ser verificats són bé de tipus estadístic o bé de tipus operatiu/econòmic (taula 2.1). Almenys ha de verificar-se l'exactitud, precisió i incertesa dels resultats obtinguts amb el mètode ja que, d'aquesta manera, s'obtenen resultats traçables i comparables.

Taula 2.1. Paràmetres de qualitat d'un mètode analític.

Tipus estadístic	Tipus operatiu/econòmic
Exactitud	Inversió
Traçabilitat	Manteniment
Precisió	Rapidesa
Incertesa	Facilitat d'ús
Reproductibilitat	Simplicitat
Especificitat	
Selectivitat	
Límit de detecció	
Límit de quantificació	
Robustesa	

El procés de validació ha rebut una atenció considerable en la bibliografia i també per part de les comissions d'indústria i organismes reguladors:

- Les Actuals Bones Pràctiques de Fabricació de l'Administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units (*Food and Drug Administration-Current Good Manufacturer Practice*, FDA-CGMP) [6] indiquen que en la validació dels mètodes analítics s'han d'establir i documentar els paràmetres següents: precisió, sensibilitat, especificitat i reproductibilitat. L'FDA també ha proposat una guia sobre procediments analítics i mètodes de validació per a la indústria [7].
- La norma ISO/IEC 17025 inclou un capítol sobre la validació de mètodes [3] amb una llista de nou paràmetres de validació. La Conferència Internacional d'Harmonització (*International Conference on Harmonization*, ICH) [8] ha desenvolupat un text de consens sobre la validació de procediments analítics. El document inclou definicions de vuit característiques de validació. La ICH ha desenvolupat també una guia amb metodologia detallada [9].
- L'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (*Environmental Protection Agency*, EPA) va preparar una guia sobre desenvolupament i validació de mètodes per a la Llei de Recuperació i Conservació de Recursos (*Resource Conservation and Recovery Act*, RCRA) [10]. L'Associació Oficial de Químics Analítics (*Association of Official Analytical Chemists*, AOAC), l'EPA i altres organitzacions científiques proporcionen mètodes que són validats a través d'estudis multilaboratori.

L'FDA també ha publicat una guia per a la validació de mètodes bioanalítics [11]. El document més complet és l'informe de la conferència de Washington de 1990: *Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies* (Mètodes analítics de validació: biodisponibilitat, bioequivalència i estudis farmacocinètics), que va ser patrocinat per l'Associació Americana de Científics Farmacèutics (*American Association of Pharmaceutical Scientists*, AAPS), l'AOAC i

l'FDA [12], entre altres. L'informe presenta els principis per als estudis de validació tant en éssers humans com en animals, i a més també s'ha utilitzat com a base per al document de la guia de validació en la indústria de l'FDA [11].

D'altra banda, alguns investigadors de la indústria química i farmacèutica han publicat estudis sobre la validació de mètodes analítics. Hokanson [13, 14] va aplicar l'enfocament de cicle de vida per a la validació i revalidació de mètodes. Green [15] va redactar una guia pràctica per a la validació de mètodes analítics amb una descripció d'un conjunt de requisits mínims per a un mètode. Renger *et al.* [16] van descriure la validació d'un procediment analític específic per a l'anàlisi de la teofil·lina en comprimits per mitjà de cromatografia en capa fina d'alta resolució (*high-performance thin layer chromatography*, HPTLC).

Wegscheider [17] ha publicat procediments per a la validació de mètodes amb un enfocament especial en calibratge, experiments de recuperació, comparació de mètodes i investigació de la robustesa. Seno *et al.* [18] han descrit com es validen els mètodes analítics en un laboratori japonès de control de qualitat. L'AOAC [19] ha desenvolupat un programa de validació de mètodes de verificació per parells amb directrius detallades sobre quins paràmetres han de ser validats exactament. Winslow i Meyer [20] recomanen la definició i aplicació d'un pla mestre per a la validació de mètodes analítics. Breaux *et al.* han publicat un estudi sobre el desenvolupament de mètodes analítics i la seua validació [21]; la clau està a desenvolupar mètodes analítics que puguin ser fàcilment validats i revalidats. Krause va publicar una guia per a la transferència, comparació, manteniment i criteris d'acceptació de mètodes analítics per als assajos de productes biofarmacèutics [22].

2.5. Perquè és necessari validar un mètode?

Un mètode ha de validar-se perquè hi ha ocasions en què la mesura analítica és important (a causa del seu cost, qüestions de salut, legals, etc.) i per l'obligació professional de l'analista.

2.5.1. Importància de la mesura analítica

Cada dia es realitzen milions de mesures analítiques en milers de laboratoris en tot el món. Aquestes mesures resulten útils en infinitat de situacions, per exemple: la valoració de béns amb fins comercials; assistència sanitària; el control de la qualitat de l'aigua potable; l'anàlisi de la composició elemental d'un aliatge per verificar la idoneïtat del seu ús en la construcció d'avions; o les anàlisis forenses dels fluids corporals en les investigacions criminals, entre altres. Pràcticament tots els aspectes de la societat estan protegits per algun tipus de mesura analítica.

El cost d'aquestes mesures és elevat i els costos addicionals augmenten en funció de les decisions preses basant-se en els resultats obtinguts. Per exemple, els assajos que indiquen que els aliments no són aptes per al consum poden originar reclamacions d'indemnitzacions; les proves que confirmen la presència de substàncies prohibides en el cos poden donar lloc a multes, presó o fins i tot, en alguns països, la pena de mort. Així, és evident que és important determinar el resultat correcte i poder demostrar-ho.

2.5.2. L'obligació professional del químic analític

Si el resultat d'un assaig no és fiable, llavors té poc valor, i això pot donar lloc a què l'assaig deixi de dur-se a terme. Quan un laboratori desenvolupa un mètode, se suposa que el seu personal té un nivell de coneixements especialitzats per dur-ho a terme. Els destinataris potencials del mètode esperen poder confiar en els seus resultats i generalment només els qüestionen quan sorgeix alguna controvèrsia, cas en el qual el laboratori i el seu personal tenen la responsabilitat de demostrar que han proporcionat la

resposta adequada pel que fa a la part analítica del problema. La validació dels mètodes químics permet demostrar que un mètode és “apte per al propòsit”.

A més, per garantir la confiança amb què els usuaris del mètode necessiten prendre decisions basant-se en els resultats analítics, ha de validar-se la fiabilitat del mètode i estimar la incertesa del resultat d'una manera que siga àmpliament reconeguda, internament coherent i fàcil d'interpretar.

Independentment de com siga de bo un mètode i com s'utilitze de bé, un problema analític pot resoldre's per mitjà de l'anàlisi de mostres només si aquestes són adequades per al problema. La presa de mostres adequades és un treball especialitzat i requereix una comprensió del problema i de la seua química.

2.6. Quan s'ha de validar un mètode?

Els mètodes analítics necessiten ser validats o revalidats:

- Abans del seu ús rutinari.
- Cada vegada que es canvien les condicions en què va ser validat originàriament el mètode (p.ex., un instrument amb característiques diferents, o mostres amb una matriu diferent).
- Quan es modifique el mètode sense que estiguera previst.

El grau de validació o revalidació requerit depèn de la naturalesa dels canvis realitzats en el mètode de cara a la seua nova utilització en altres laboratoris, amb altres instruments o per part d'altres analistes, i de les circumstàncies en què es vaja a utilitzar. Sempre és apropiat un cert grau de validació, fins i tot quan s'empren estàndards aparentment ben caracteritzats o mètodes publicats.

2.7. Qui realitza la validació?

El laboratori que utilitza un mètode és el responsable d'assegurar que es troba degudament validat, i si fóra necessari, ha de dur a terme nous assajos per complementar les dades existents. Per exemple, quan un mètode ha sigut validat fent ús d'estàndards aprovats per una organització, com l'AOAC Internacional, normalment l'analista només ha d'establir la fiabilitat de les dades per al seu propi ús del mètode.

S'ha publicat molt sobre la validació de mètodes per mitjà d'estudis col·laboratius. Si es desenvolupa un mètode que vaja a tenir un ús estès, com els procediments estàndard publicats, la millor forma de dur a terme la validació és mitjançant un estudi en col·laboració amb un grup de laboratoris. L'AOAC Internacional sempre ha defensat fermament la prova interlaboratori com a via preferida per a la validació de mètodes analítics.

L'acceptació d'un mètode amb fins reguladors, independentment que es valide o no en un únic laboratori, dependrà de les directrius que cobreixen l'àrea de mesura en qüestió. Normalment, hauria de ser possible obtenir una declaració clara de la política de l'organisme regulador.

2.8. Principis de la validació

La validació d'un procediment consisteix en tres passos:

1. Establiment de les condicions que ha de complir (p.ex., límit de detecció < 1 mg/L; interval lineal major a 2 ordres de magnitud; incertesa dels resultats < 20% en tot l'interval de treball, per al cas de la validació d'un mètode analític general. No pot establir-se com a principi de validació per a altres tipus de mètodes d'assaig).
2. Determinació dels paràmetres estadístics del procediment.

3. Valoració dels resultats de la validació per comparació dels paràmetres estadístics obtinguts en les condicions establides, i presa de decisions sobre la validesa del procediment per al propòsit establert.

Davant d'un problema analític particular, en primer lloc, el laboratori estableix un requisit analític que defineix els requisits d'aptitud que un mètode ha de complir perquè resulte adequat a l'hora de resoldre un problema analític. En funció d'aquest requisit, s'avaluen els mètodes existents per a la seua possible idoneïtat, i si és necessari es desenvolupa un nou mètode.

Aquest procés iteratiu de desenvolupament i avaluació continua fins que el mètode és capaç de respondre a la necessitat establida, de manera que és innecessari un major desenvolupament i el treball analític pot continuar. Així, la validació d'un mètode consisteix en aquest procés d'avaluació dels criteris d'aptitud i confirmació que és adequat (figura 2.1).

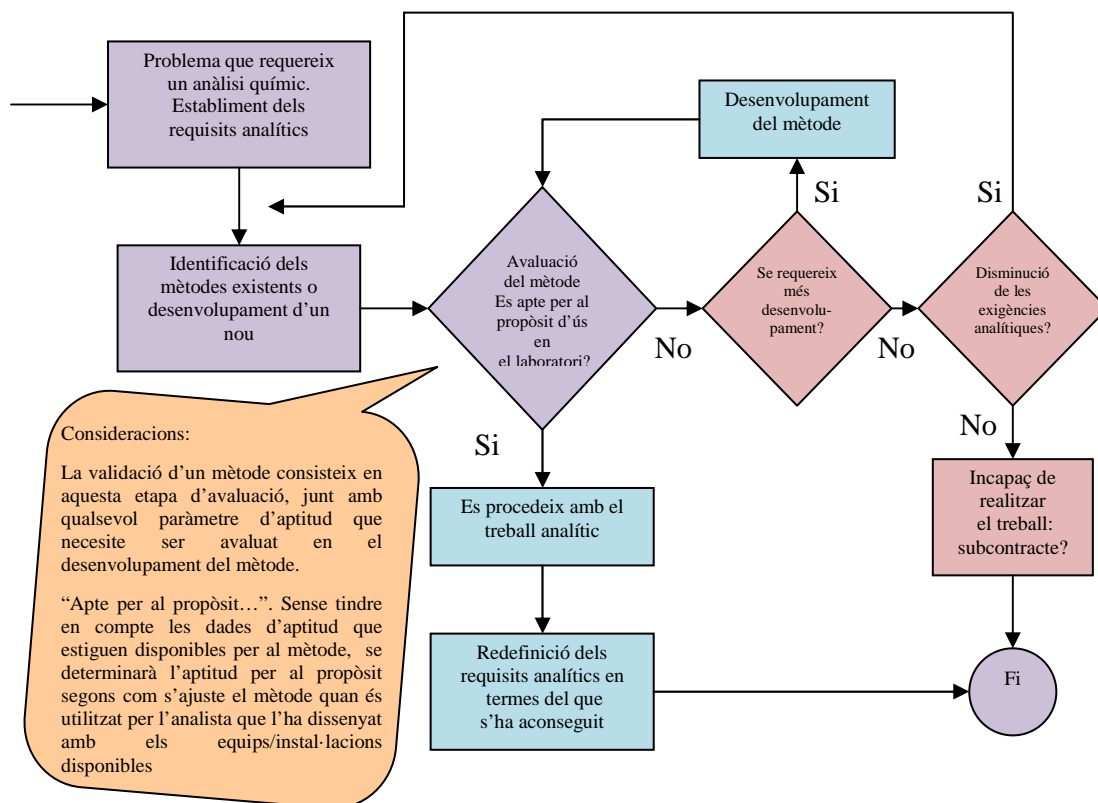


Figura 2.1. Elecció, desenvolupament i avaluació de mètodes.

2.9. Estratègies de validació

La validesa d'un mètode ha de ser demostrada per mitjà d'assajos en què s'utilitzen mostres o estàndards semblants a les mostres problema que s'analitzen de manera rutinària. La preparació i execució ha de seguir un protocol de validació, preferiblement descrit pas a pas. Els possibles passos per a una completa validació d'un mètode són:

1. Elaborar un protocol de validació, procediment d'operació o pla mestre de validació.
2. Definir els usuaris i les responsabilitats per a un projecte de validació específic.
3. Planificar el projecte de validació.
4. Definir l'aplicació, l'objecte i àmbit d'aplicació del mètode.
5. Definir els paràmetres de fiabilitat i els criteris d'acceptació.
6. Especificar els experiments de validació.
7. Comprovar les característiques rellevants d'aptitud dels equips.
8. Classificar els materials, per exemple, estàndards i reactius, per la seua puresa, quantitats exactes i estabilitat suficient.
9. Dur a terme experiments de prevalidació.
10. Ajustar els paràmetres del mètode i/o criteris d'acceptació en cas necessari.
11. Realitzar experiments de validació complets interns (i externs).
12. Desenvolupar procediments normalitzats de treball per a l'execució del mètode de rutina.
13. Definir els criteris de revalidació.
14. Definir el tipus i freqüència de les proves d'idoneïtat del sistema i/o els controls de qualitat analítics per al procediment de rutina.
15. Documentar els experiments de validació i els resultats en l'informe de validació.

El procediment proposat garanteix que s'ha seleccionat l'instrument adequat i s'ha desenvolupat el mètode. Aquest reuneix criteris com ara la facilitat d'ús, la capacitat per ser automatitzat i controlat per sistemes informàtics, els costos per anàlisi, el

processament de la mostra, el temps de resposta i els requisits mediambientals, de salut i de seguretat.

Les característiques d'aptitud del mètode han de basar-se en l'ús previst per al mateix. No sempre és necessari validar tots els paràmetres analítics que estan disponibles per a una tècnica específica. Per exemple, si es va a utilitzar el mètode per a l'anàlisi qualitativa de traces, no cal verificar i validar el seu límit de quantificació, o la linealitat, per damunt del rang dinàmic de l'equip. Els paràmetres inicials han de triar-se d'acord amb l'experiència i el criteri de l'analista, mentre que els paràmetres finals han de ser acordats entre el laboratori o el químic analític que realitza la validació i el laboratori o analista que aplica el mètode i els usuaris de les dades proporcionades pel mètode.

2.10. Establiment de l'abast de la validació

Es diferencien tres casos, en què la dificultat de la validació augmenta del primer al tercer:

1. Es tracta d'un mètode d'assaig estandarditzat i normalitzat, que s'aplica exactament com està descrit en la norma.
2. Es tracta d'una modificació d'un mètode d'assaig normalitzat, per exemple, es van fer modificacions als mètodes descrits en la norma que poden tenir una repercussió sobre la qualitat dels resultats.
3. Es tracta d'un mètode d'assaig intern, elaborat en el laboratori i que no es troba en normes o altres col·leccions de mètodes.

La validació en els casos descrits té objectius distints i, per tant, diferents punts essencials, com es mostra en la taula 2.2.

Taula 2.2. Objectius de la validació segons el tipus de procediment d'assaig.

Mètode d'assaig	Objectius de la validació
Cas 1: mètode normalitzat	Comprovació de què el laboratori domina l'assaig i l'utilitza correctament.
Cas 2: modificació d'un mètode normalitzat	Comprovació que la repetibilitat, la reproductibilitat, la precisió intermèdia, i l'exactitud del mètode original no depenen de la modificació introduïda i que el laboratori domina l'assaig i ho realitza correctament.
Cas 3: mètode intern	Comprovació que el mètode té la repetibilitat, la reproductibilitat, la precisió intermèdia i l'exactitud suficients per a l'objectiu d'aplicació i que el laboratori domina l'assaig i ho realitza correctament.

Mètode normalitzat

Un mètode normalitzat, en general, està totalment validat i per tant, per demostrar que el laboratori l'executa correctament, només haurà de verificar-ho, la qual cosa significa que haurà de demostrar que pot aconseguir la fiabilitat adequada per a certs paràmetres de validació.

Si bé no es poden establir criteris rígids respecte a quins paràmetres s'han de verificar, és habitual que es controlen la precisió i la veracitat, en particular quan aquests paràmetres estan indicats en les normes de referència. També es pot confirmar el mètode a través de la participació en assajos d'aptitud i/o l'elaboració de gràfics de control.

En el marc de l'acreditació de laboratoris, es consideren mètodes “normalitzats” els següents:

- Mètodes publicats per organismes de normalització internacionals, regionals o nacionals, per exemple: ISO, CEN (Comissió Europea de Normalització, *Comité Européen de Normalisation; European Committee for Standardization*), ASTM (Associació Americana d'Assaig de Materials; *American Society of Testing Materials*), DIN (Institut Alemany de Normalització; *Deutsches Institut für Normung*), IRAM (Institut Argentí de Racionalització de Materials), entre altres.
- Mètodes publicats per organitzacions reconegudes en diferents àmbits, com per exemple: AOAC, FIL-IDF (Federació Internacional de Lleteria, *Fédération Internationale de Laiterie, International Dairy Federation*), EPA, USP (Farmacopea dels Estats Units; *United States Pharmacopoeia*), entre altres.

Mètode normalitzat modificat

Els mètodes normalitzats que han sigut modificats han de ser validats de tal forma que s'avalua la incidència dels canvis realitzats sobre els diferents paràmetres de validació.

El laboratori ha de tenir la competència per avaluar quins paràmetres haurien de revalidar-se en funció dels canvis realitzats. Així, per exemple, els canvis en el mètode d'extracció podrien afectar la selectivitat per la possible presència d'interferències, i també podrien afectar la veracitat. La taula 2.3 mostra els paràmetres del mètode que necessiten ser caracteritzats.

Taula 2.3. Abast de la validació segons el tipus de procediment de prova.

Mètode normalitzat	Modificació d'un mètode normalitzat	Mètode intern
<p><i>Comprovar que el laboratori domina l'assaig i l'utilitza correctament.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Exactitud - Repetibilitat - Incertesa <p>Límit de detecció (si la norma ho indica)</p>	<p><i>Comprovar que el laboratori domina l'assaig i l'utilitza correctament.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Exactitud - Repetibilitat - Reproductibilitat <p>No difereixen del mètode original</p>	<p><i>Comprovar que el laboratori domina l'assaig i l'utilitza correctament.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Exactitud - Repetibilitat - Reproductibilitat <p>Són suficients per a l'objectiu d'aplicació</p>
<p><i>Determinar:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Interval de treball - Linealitat - Recuperació - Robustesa - Selectivitat - Estabilitat - Reproductibilitat 	<p><i>Determinar:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Interval de treball - Linealitat - Recuperació - Robustesa - Selectivitat - Estabilitat - Reproductibilitat 	<p><i>Determinar:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Interval de treball - Linealitat - Recuperació - Robustesa - Selectivitat - Estabilitat - Reproductibilitat - Exactitud - Repetibilitat - Límit de detecció - Límit de quantificació - Sensibilitat - Incertesa
<p><i>Realitzar carta de control amb els resultats de materials de referència.</i></p>	<p><i>Realitzar carta de control amb els resultats de materials de referència.</i></p>	<p><i>Realitzar carta de control amb els resultats de materials de referència.</i></p>
<p><i>Controls intralaboratori.</i></p>	<p><i>Controls intralaboratori.</i></p>	<p><i>Controls intralaboratori.</i></p>
<p><i>Participar en interlaboratori</i></p>	<p><i>Participar en interlaboratori</i></p>	<p><i>Participar en interlaboratori</i></p>

2.11. Revalidació

Alguns dels paràmetres del mètode probablement hauran de modificar-se o ajustar-se durant la seua utilització si els criteris d'aptitud del mètode no es corresponen amb els criteris d'acceptació. La qüestió és si aquest canvi requereix la revalidació del mètode. Per aclarir aquest punt, han de definir-se els rangs d'operació, ja siga basant-se en l'experiència amb mètodes semblants, o en la investigació duta a terme durant el seu desenvolupament. Aquests rangs han de ser comprovats en els estudis de robustesa durant la validació i han de formar part de les característiques del mètode. El fet de conèixer des d'un principi aquests rangs, facilita la decisió de quan un mètode ha de ser revalidat. La revalidació és necessària sempre que un mètode es modifica i el nou paràmetre es troba fora del rang definit. Per exemple, si el rang d'operació de la temperatura de la columna s'ha especificat entre 30 i 40 °C, el mètode ha de ser revalidat si, per qualsevol motiu, el nou paràmetre operatiu és 41 °C.

La revalidació també és necessària si l'abast del mètode ha sigut modificat o ampliat, per exemple, si la matriu de la mostra canvia o si les condicions d'operació es modifiquen. Si es va a utilitzar una instrumentació amb característiques diferents, i aquestes no han sigut especificades en la primera validació, aleshores també es requereix una revalidació. S'ha d'assenyalar que aquesta pot ser parcial o total en funció de si les proves d'idoneïtat del sistema, o els resultats de l'anàlisi de mostres de control de qualitat, es troben fora dels criteris d'acceptació predefinitos, i també quan la font d'error no es pot atribuir a la instrumentació o a qualsevol altra causa.

Sempre que hi haja una modificació que requerisca una revalidació, aquesta ha de seguir un sistema de control documentat. La modificació ha de definir-se, autoritzar-se per a l'aplicació i documentar-se. Les possibles modificacions han d'incloure:

- Noves mostres amb nous compostos o noves matrius.
- Nous analistes amb diferents habilitats.
- Nous instruments amb característiques diferents.

- Nova ubicació amb diferents condicions ambientals.
- Nous productes químics i/o estàndards de referència.
- Modificació de paràmetres analítics.

Una avaluació ha de determinar si el canvi està dins de l'abast del mètode, cas on no es requerirà revalidació, mentre que en cas contrari, han de definir-se els paràmetres per a la revalidació. Després dels assajos de validació, els paràmetres de la prova d'idoneïtat del sistema han de ser investigats i, si és necessari, redefinits.

2.12. Idoneïtat del sistema

La prova d'idoneïtat del sistema consisteix en un conjunt d'assajos que permeten comprovar en el moment d'utilització del mètode que el sistema (analista, reactius i instrumentació) és adequat per dur a terme la determinació perquè s'ha establert i validat aquest. Per tant, aquesta prova ha d'entendre's com a part integrant del procediment d'anàlisi i requisit previ a la seua realització. En la pràctica podria equiparar-se a una quantificació del procés analític o una revalidació en continu, ja que proporciona la seguretat que en el moment d'iniciar l'assaig, el conjunt del sistema continua sent "vàlid" per al propòsit perquè va ser desenvolupat.

Aquesta prova pot emprar-se en qualsevol procediment de mesura en què les condicions analítiques poden estar sotmeses a variació de les condicions operacionals. No ha de circumscriure's a l'àmbit de la determinació final sinó que pot dissenyar-se a fi de comprovar la idoneïtat de qualsevol etapa del procediment, com per exemple la preparació de la mostra.

2.13. Principals paràmetres de validació d'un mètode analític

La majoria dels paràmetres inclosos en aquest capítol es troben definits en els següents documents de la IUPAC (Unió Internacional de Química Pura i Aplicada, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) i la ISO:

- IUPAC: Compendi de Terminologia Química, 2^a ed. (the “Gold Book”), A.D. McNaught i A. Wilkinson, 1997 [23].
- ISO: Vocabulari internacional de termes fonamentals i generals de metrologia, 1993 [24].

Les característiques de fiabilitat d'un mètode analític demostren la seua capacitat per mantenir al llarg del temps els criteris fonamentals de validació (no necessàriament aplicables en tots els casos) i dels que deriven en la pràctica tots els paràmetres de validació:

- Capacitat d'un mètode per determinar l'analit sense interferències d'impureses, productes de degradació, excipients o altres substàncies presents en la mostra. Es relaciona amb el terme de selectivitat.
- La proporcionalitat entre concentració de l'analit i resposta de l'instrument. Aquest concepte es relaciona amb els termes de linealitat i rang.
- La dispersió d'una sèrie de resultats al voltant del valor mitjà o central. Es relaciona amb el terme precisió.
- La diferència entre el valor trobat en l'anàlisi i el valor verdader. Concepte relacionat amb els termes d'exactitud i veracitat.
- La quantitat mínima d'analit requerida per obtenir un resultat significatiu. Relacionat amb els termes de límit de detecció i límit de quantificació.

El fet que siga necessari avaluar uns o altres paràmetres dependrà bàsicament del tipus d'assaig.

2.13.1. Confirmació d'identificació, selectivitat i especificitat

Confirmar la identitat és establir que el senyal produït en la mesura, o que la propietat mesurada que s'atribueix a l'analit, només es deu a aquest i no a la presència de quelcom física o químicament semblant.

Els termes *selectivitat i especificitat* solen utilitzar-se indistintament. Vessmann ha publicat un detallat article sobre l'ús d'aquests termes [25].

Selectivitat

La selectivitat és la capacitat d'un mètode per quantificar exactament un analit en presència d'interferències. En altres paraules, és l'aptitud d'un mètode per determinar exactament i específicament l'analit d'interès en presència d'altres components en la matriu de la mostra en les condicions establides de l'assaig. Idealment, la selectivitat ha de ser avaluada en presència d'interferències potencials. Com a principi general, la selectivitat ha de ser prou bona perquè pugui ignorar-se qualsevol interferència.

Una interferència és aquella espècie química que causa un error sistemàtic en la determinació d'un analit. Es poden donar dos casos:

- La presència d'interferències que puguin donar una resposta analítica que no es diferència de la resposta de l'analit.
- La presència d'interferències que afecten el senyal de l'analit (efecte matriu).

La selectivitat d'un mètode s'estudia afegint de manera deliberada a una mostra les interferències que es creu que tinguen major probabilitat d'estar presents. Si no es coneix amb certesa l'existència d'interferències, es pot avaluar la selectivitat del mètode per comparació amb un altre. La selectivitat també es veu afectada per l'existència de l'analit en una mostra en més d'una forma, com a lliure o enllaçat, o en diferents estats d'oxidació.

Especificitat

L'especificitat és l'aptitud d'un mètode per mesurar només el que es pretén mesurar, és a dir, és la capacitat d'avaluar inequívocament l'analit en presència de components que es pot esperar que estiguen presents. Típicament, aquests podrien incloure impureses, productes de degradació, i la matriu, entre altres. [23].

La selectivitat i l'especificitat avaluen la confiabilitat de les mesures davant la presència d'interferències. Generalment, es considera l'especificitat com un 100% de selectivitat. Les interferències poden disminuir o augmentar el senyal atribuït a l'analit.

Aquests paràmetres no requereixen major validació quan s'utilitzen procediments normalitzats per a una matriu específica, atès que el treball ja l'han realitzat els que van desenvolupar i validar el mètode. En aquests casos s'han de tenir molt en compte les especificacions sobre possibles interferències i la manera de suprimir-les, si existeixen. No obstant això, el laboratori ha de considerar l'estudi de les interferències en la validació si les matrius de les mostres analitzades són molt variades, i si en alguna d'elles els interferents es troben en nivells tan alts que no poden ser suprimits pels processos recomanats. Aquest seria un cas d'ampliació de l'abast del mètode per a noves matrius.

2.13.2. Calibratge, rang i linealitat

Per a qualsevol mètode quantitatiu s'ha de determinar l'interval de concentracions d'analit, o valors de propietat, dins del qual es pot aplicar el mateix. Això es refereix al rang de concentracions en les dissolucions que s'estan mesurant i no a les concentracions d'analit en la mostra original. A l'extrem inferior de l'interval de concentracions, els factors limitants són els valors del límit de detecció i/o del límit de quantificació, mentre que a l'extrem superior, l'abast depèn de la resposta de l'instrument o de les condicions analítiques establides com òptimes.

La linealitat d'un mètode defineix la seua aptitud per obtenir resultats proporcionals a la concentració d'analit, és a dir, és la capacitat d'un mètode analític de produir resultats que siguen directament, o per mitjà d'una transformació matemàtica definida, proporcionals a la concentració d'analit en la mostra. Per la seua banda, el rang es defineix com l'interval entre la concentració superior i inferior d'analit per al qual s'ha demostrat la correcta precisió, exactitud i linealitat del mètode descrit. Encara que el procés lògic consisteix a avaluar quins són els límits de concentració en què el mètode analític perd la seua linealitat, normalment es pren com a punt de partida un interval de concentracions ja establert en funció de l'experiència, el coneixement analític de la tècnica utilitzada i, principalment, les especificacions. Dins de la zona de treball pot existir un interval de resposta lineal, mentre que dins de l'interval lineal de resposta ha d'haver-hi una relació lineal amb la concentració de l'analit o el valor de la propietat. Perquè el mètode siga eficaç, la resposta de l'instrument a la concentració no és necessari que siga perfectament lineal, però la corba ha de poder reproduir-se quotidianament. L'interval de treball i l'interval lineal poden ser diferents per a matrius diferents segons l'efecte de les interferències que aquestes aporten.

Per verificar la linealitat, han de tenir-se en compte les recomanacions següents:

- La quantitat de punts inclosos en el calibratge ha de ser igual o superior a sis concentracions. El rang ha de trobar-se entre 0–150% o 50–150% de la concentració de l'analit que s'espera trobar, en funció de què siga més adequat.
- Han de trobar-se igualment espaiats.
- La quantitat de rèpliques per concentració ha de ser igual o superior a tres.
- Les rèpliques han de ser independents.
- Ha d'usar-se un analit pur o un analit en la matriu objecte d'estudi.
- Els punts han de mesurar-se de forma aleatòria.

En la corba de calibratge es representa gràficament la resposta (àrea o relació d'àrees en el cas d'utilitzar patró intern) en funció de la concentració de la substància utilitzada i s'efectua el tractament estadístic de les dades, determinant l'ordenada en l'origen, el pendent (sensibilitat), i el coeficient de correlació (R).

Hi ha diferents formes d'avaluar la linealitat:

- Avaluació visual.
- Avaluació estadística (mínims quadrats).
- Gràfic dels residus.
- Coeficient de correlació. Aquest ha de ser preferentment major o igual que 0.995 (encara que pot trobar-se entre 0.980 i 0.990 segons el mètode analític).
- Ordenada en l'origen i pendent.

A partir de la informació obtinguda en l'avaluació de la linealitat, es determinarà l'estratègia que s'utilitzarà en el mètode de rutina. Pot ser només siga necessari fer el calibratge amb un punt o tal vegada amb dos, mentre que en altres casos caldrà incloure diversos punts. És important tenir en compte que els paràmetres de validació descrits en els següents subapartats, en particular la precisió i la veracitat, siguen avaluats utilitzant l'estratègia de calibratge que s'usarà en el procediment triat.

2.13.3. Sensibilitat

La sensibilitat d'un mètode és el gradient de la corba de resposta d'un instrument, o el que és el mateix, el canvi del senyal instrumental que es correspon amb el canvi de la concentració de l'analit. Per a l'interval lineal d'un mètode, la sensibilitat correspon al pendent de la recta de calibratge, i és un paràmetre objecte de seguiment quan s'efectuen calibratges rutinaris. A vegades s'usa la sensibilitat per referir-se al límit de detecció de l'equip, però això no s'aprova generalment.

2.13.4. Límit de detecció

En termes generals, el límit de detecció (*limit of detection*, LOD) és la mínima quantitat o concentració d'analit en la mostra que pot ser distingida del fons amb un cert nivell de confiança especificat ($\alpha = 5\%$), encara que no necessàriament quantificat amb precisió i exactitud [26, 27]. En una validació, normalment, és suficient donar una indicació del nivell al qual la detecció es torna problemàtica.

Per a un resultat analític que és molt pròxim al valor del blanc, es planteja el dubte de si aquest correspon a valors aleatoris del blanc o a la presència real de l'analit. El senyal de fons és produït pel blanc i exhibeix soroll. Els valors situats per damunt del LOD poden ser atribuïts a la presència de l'analit, mentre que els valors que es troben per davall del LOD són indicatius de l'absència d'analit en quantitats detectables.

Alguns dels possibles procediments de determinació són:

- Mètode basat en l'examen visual.
Preparació de mostres de concentració coneguda que es van diluint. S'estableix la concentració mínima a la qual l'analit pot ser detectat.
- Mètode basat en la relació senyal/soroll.
En cromatografia es comparen mostres de concentracions conegudes molt menudes amb els senyals de mostres del blanc (p.ex., de 2.5 a 5 vegades la relació senyal/soroll de l'equip de mesura que s'utilitza).
- Mètode basat en la desviació estàndard de la resposta del blanc i el pendent de la recta de calibratge (p.ex., 3 vegades la dispersió, expressada com a desviació estàndard, a partir de mesures repetides del blanc, o de dissolucions de l'analit en aigua pura).
- Mètode basat en l'extrapolació de la recta de calibratge a concentració zero.

Quan siga necessari establir la possible presència o absència d'un component en una mostra, el resultat de l'assaig mai haurà de contrastar-se amb el LOD. En aquest cas, el paràmetre indicat és l'anomenat límit o nivell crític (mínima resposta de l'instrument

distingible del fons, és a dir, es pot assegurar que la resposta neta procedeix de l'analít mesurat). A més, es recomana indicar “no detectat” i evitar fer declaracions com “absent”, “absència”, o “no conté”.

2.13.5. Límit de quantificació

El límit de quantificació (*limit of quantitation*, LOQ) és la mínima concentració d'analít que es pot determinar amb un nivell acceptable de precisió (repetibilitat) i exactitud ($< 10\%$). Diverses convencions ho defineixen com la concentració d'analít corresponent al valor del blanc més 5, 6 o 10 vegades la desviació estàndard de la mitjana de blancs. També és conegut com “límit de determinació”. El LOQ és un valor indicatiu i no haurà de ser utilitzat en la presa de decisions. Per a l'anàlisi quantitativa ha de quedar absolutament clar que només s'empren valors atribuïbles a l'analít. El límit de quantificació és entre 3 i 10 vegades el límit de detecció, segons cada cas.

Cap dels dos límits (LOD i LOQ) representen nivells en què la quantificació és impossible; és simplement una regió en què la magnitud de les incerteses associades té un valor pròxim al resultat real. El LOQ no ha de determinar-se per extrapolació per davall del menor estàndard analitzat.

Els procediments per determinar el LOQ són pràcticament els mateixos que els exposats per al LOD. El LOQ varia segons el cas, però és com a mínim tres vegades el límit de detecció. Quan no hi ha la possibilitat de tenir una mostra placebo o quan s'especifica un criteri concret de precisió i exactitud, un mètode experimental senzill i eficaç per al càlcul del LOQ és el mètode EURACHEM [28]. Consisteix a preparar una sèrie de mostres amb quantitats decreixents d'analít i analitzar cadascuna d'elles 6 vegades consecutivament, representant el coeficient de variació (CV, %) de la precisió enfront de la concentració de cada mostra. Normalment es fixa un criteri de precisió d'un $CV = 10\%$ en el LOQ, encara que es pot arribar a acceptar fins un 20% , en funció de les característiques del mètode.

2.13.6. *Exactitud*

L'exactitud expressa la proximitat entre el valor acceptat convencionalment com a verdader o valor de referència i el valor experimental trobat. La validació d'un mètode persegueix la quantificació de l'exactitud probable dels resultats avaluant els efectes sistemàtics i aleatoris sobre els resultats.

L'exactitud s'obté determinant la veracitat i la precisió, i s'avalua per comparació amb els valors de referència d'un material caracteritzat, o amb valors presos d'un altre mètode caracteritzat. Els valors de referència haurien de ser traçables a les normes internacionals; els materials de referència certificats s'accepten generalment com traçables, i haurien de tenir una matriu d'allò més semblant a les mostres d'interès.

2.13.7. *Veracitat*

La veracitat és el grau de concordança entre el valor mitjà obtingut d'una sèrie de mesures i el valor de referència. S'expressa com a biaix (diferència entre el valor esperat, teòricament igual a la mitjana d'un número infinit de valors individuals independents, i el valor verdader, correcte o assumit), de manera que un biaix xicotet indica una major veracitat. Normalment l'aplicació d'un mètode implica un biaix combinat: el biaix del mètode que sorgeix d'errors sistemàtics inherents a ell (sense importar el laboratori que aplica el mètode), i el caire del laboratori que sorgeix d'errors sistemàtics atribuïbles al laboratori. El biaix obtingut en una validació ha de comparar-se amb el biaix descrit per al mètode i l'obtingut per uns quants laboratoris que utilitzen el mateix mètode.

Per a l'avaluació d'aquest paràmetre es realitza l'anàlisi d'un material de referència certificat o una mostra/matriu fortificada dins del rang del mètode. També pot avaluar-se la veracitat comparant el mètode amb un altre prèviament validat o amb un mètode primari. En qualsevol cas convé dur a terme alguna prova estadística per avaluar si hi ha diferències estadísticament significatives.

2.13.8. Precisió

La precisió expressa la proximitat de coincidència (grau de dispersió) entre una sèrie de mesures obtingudes de múltiples mostratges d'una mateixa mostra homogènia en unes condicions establides.

Les dos mesures més comunes de la precisió, que generalment es defineix en termes de desviació estàndard (*standard deviation*, SD) o desviació estàndard relativa (*relative standard deviation*, RSD) són la repetibilitat i la reproductibilitat. La repetibilitat, que és la precisió més xicoteta esperada, dóna una idea de la variabilitat que s'espera quan en un mètode s'efectuen una sèrie d'anàlisi sobre la mateixa mostra en les mateixes condicions operatives (per un mateix analista, amb els mateixos equips i reactius, etc.), en un mateix laboratori i en un període curt de temps. En l'altre extrem, la reproductibilitat, que representa la variabilitat que s'obté quan una mostra és analitzada per uns quants laboratoris i en condicions operatives diferents, té un valor més ampli. La precisió intermèdia, i més útil en casos específics, s'obté quan s'avalua la reproductibilitat entre analistes en un mateix laboratori.

La repetibilitat i la reproductibilitat depenen generalment de la concentració de l'analit i per tant s'han de determinar per a diferents concentracions, establint, quan siga rellevant, la relació entre la concentració i el coeficient de variació. A partir de les desviacions estàndard de repetibilitat i reproductibilitat poden calcular-se els límits de repetibilitat i de reproductibilitat, que permeten a l'analista saber si la diferència entre les anàlisis replicades són significatives, en les condicions corresponents.

2.13.9. Incertesa d'una mesura

La incertesa de mesura és un paràmetre associat al resultat d'una mesura, que caracteritza la dispersió dels valors que podrien atribuir-se raonablement al mesurant (magnitud mesurada). En altres paraules, la incertesa és una informació numèrica que complementa un resultat de mesura, indicant la quantia del dubte sobre aquest resultat. Generalment s'expressa com una desviació típica o un interval de confiança, i la seua estimació ha de tenir en compte tots els efectes reconeguts que influeixen en el resultat (p.ex., la precisió general de llarg termini, el biaix, la incertesa del material de referència, la incertesa de calibratge, etc.).

Els laboratoris han de tenir i aplicar procediments per estimar la incertesa de mesura. Per a això, primer han d'identificar tots els components de la incertesa, entre els que poden trobar-se:

- Definició incompleta i/o imperfecta del mesurant.
- Mostratge.
- Preparació de mostres.
- Condicions ambientals.
- Desviacions personals en la lectura d'instruments analògics.
- Límits en la discriminació o resolució de l'instrument.
- Valors inexactes dels patrons i materials de referència utilitzats.

Per a la seua determinació i especificació hi ha diverses possibilitats:

- Indicació sobre la repetibilitat.
- Resultats de les cartes de control.
- Resultat d'intercomparacions.
- Avaluació per membres del personal experimentats, competents i, per tant, autoritzats.

2.13.10. Recuperació

És l'eficàcia en el rescat de l'analit de la matriu de la mostra. La recuperació ideal és del 100%. Les recuperacions majors indiquen interferències a causa de la matriu o errors determinats que han d'eliminar-se. Les recuperacions que se situen per davall del 100% indiquen pèrdues de l'analit durant les fases de preparació de la mostra.

Quan una recuperació no és satisfactòria però és reproducible existeix la possibilitat d'utilitzar el mètode analític emprant un factor de correcció que compense les pèrdues d'analit, i d'aquesta manera no es veu afectada l'exactitud. El més habitual, no obstant això, és que el propi mètode analític incorpore mecanismes que eliminen l'error de recuperació, per exemple, rectes de calibratge realitzades amb la matriu, mètodes d'addició estàndard o mètodes amb estàndard intern.

El percentatge de recuperació (% Rec) es calcula de la manera següent:

$$\% \text{ Rec} = \frac{(C_F - C_U)}{C_A} \times 100 \quad (2.1)$$

on C_F és la concentració d'analit mesurada en la mostra addicionada, C_U la concentració d'analit mesurada en la mostra sense addicionar, i C_A la concentració d'analit afegida (valor mesurat, no determinat pel mètode) en la mostra addicionada.

Atès que generalment no es coneix la quantitat d'un analit que està present en una mostra, és difícil estar segur de l'èxit del mètode en l'extracció. Una forma de determinar l'eficàcia d'extracció és addicionar alíquotes de la mostra amb l'analit a diferents concentracions, i a continuació, extraure les fraccions d'assaig addicionades i mesurar la concentració de l'analit. El problema inherent a aquest procediment és que l'analit introduït d'aquesta manera probablement no estarà unit amb tanta força com els que es troben presents de forma natural en la matriu i per tant, la tècnica donarà una impressió poc realista de l'eficàcia d'extracció. Tanmateix, és la forma més comuna per determinar l'eficàcia de recuperació i es reconeix com una forma acceptable de fer-ho.

2.13.11. Estabilitat analítica de la mostra

L'estabilitat analítica és la propietat d'una mostra, preparada per a la seua quantificació, de conservar la seua integritat fisicoquímica i la concentració de l'analit, després d'emmagatzemar-se durant un temps determinat en unes condicions específiques.

La demostració de l'estabilitat de la mostra i dels patrons durant el temps comprés entre la seua preparació i la finalització de l'anàlisi, és un requeriment bàsic, especialment quan s'utilitzen equips automàtics on les mostres poden romandre hores abans de ser analitzades. En l'àmbit bioanalític l'estabilitat és un paràmetre fonamental.

L'efecte de l'emmagatzemament a llarg termini i els cicles de congelació-descongelació poden investigar-se per mitjà de l'anàlisi d'una mostra addicionada immediatament després de la seua preparació i en els dies posteriors del període d'emmagatzemament previst. Ha d'estudiar-se un mínim de dos cicles a dos concentracions distintes. Si la integritat del compost es veu afectada per la congelació i descongelació, les mostres addicionades hauran d'emmagatzemar-se en recipients individuals, i caldrà prendre les precaucions apropiades durant el seu estudi.

Altres proves que poden realitzar-se per a la determinació de l'estabilitat tant d'estàndards com reactius, són:

- Sensibilitat a la temperatura.
- Sensibilitat a la llum.
- Hidròlisi (p.ex., per la humitat de l'aire).
- Facilitat d'oxidació.
- Descomposició química.
- Efectes catalítics (p.ex., per les parets del contenidor).
- Adsorció (p.ex., durant la filtració de dissolucions amb traces).
- Precipitació (p.ex., en deixar molt de temps una dissolució).

2.13.12. *Robustesa*

Es defineix la robustesa d'un mètode analític com la mesura de la seua capacitat per romandre inalterada davant de xicotetes però deliberades variacions en certs paràmetres, proporcionant una idea de la seua fiabilitat o "estabilitat" durant el seu ús rutinari. És, per tant, la capacitat que demostra el procediment d'anàlisi per proporcionar resultats vàlids en presència de xicotets canvis respecte de les condicions descrites en el mètode, susceptibles de produir-se durant la seua utilització.

Es recomana incloure la robustesa en una fase apropiada del desenvolupament del mètode i no en la validació pròpiament dita, atès que si la robustesa del mètode no es comprova amb anterioritat a l'inici de la validació, pot succeir que s'intente validar un mètode poc robust, amb els consegüents roïns resultats i pèrdua de temps i diners. Per tant, és recomanable fer un estudi de robustesa abans de fixar els paràmetres analítics, de manera que una vegada fixats els marges entre els que el mètode és robust, es puguen incloure aquests com a part del mètode final, dotant-lo així d'una certa flexibilitat. És a dir, es tindria una justificació vàlida que recolzaria la modificació de certs paràmetres en el cas que fóra necessari.

Tots els mètodes, siga quina siga la tècnica utilitzada, són susceptibles de ser sotmesos a un estudi de robustesa. Alguns poden tenir molts paràmetres sobre els quals actuar i altres menys. A més, aquests no tenen per què ser només factors relacionats amb la mesura final, sinó que poden ser de qualsevol etapa del procediment analític, com per exemple, la preparació de la mostra. Per això, la primera etapa de l'estudi és precisament analitzar tot el mètode i definir quins factors són els que s'espera que influïsquen més en el resultat final. Aquests factors poden ser tant quantitius (p.ex., influència del valor de pH, del valor de la temperatura, percentatge de component orgànic en una fase mòbil en HPLC, etc.), com qualitius (p.ex., fabricant de la columna cromatogràfica, fabricant d'un determinat reactiu, etc.).

Una vegada definits els factors, ha de fixar-se entre quins límits de variació es vol avaluar. Normalment, els límits de fluctuació de cada factor quantitatiu es distribueixen simètricament respecte al valor normal descrit en el mètode d'anàlisi (p.ex., $\text{pH} \pm 0.1$ unitats), encara que no sempre ha de ser així, ja que el que interessa és fixar uns intervals que es corresponguen amb la fluctuació esperada del mètode en el procés de, per exemple, una transferència interlaboratori.

Aparentment la forma més senzilla de comprovar la influència de cadascun dels factors sobre el mètode seria comparar els resultats obtinguts modificant aquest factor, però mantenint constants els altres. Tanmateix, això comporta dos problemes:

- L'efecte de modificar més d'un factor al mateix temps pot ser diferent del que observa al modificar-los d'un en un.
- Quan hi ha prou factors, això representa molt de treball, temps i diners.

La forma més eficaç d'estudiar la robustesa és efectuar un disseny factorial [29, 30]. D'aquesta manera, sovint, es pot concloure amb un número assequible i raonable d'experiments quines variables són les que més influeixen en el resultat i en quina magnitud sense realitzar totes les combinacions possibles.

2.13.13. Límit de decisió i capacitat de detecció

La Unió Europea (UE), en la Decisió de la Comissió 2002/657/EC [31], ha establert els criteris CC_α (límit de decisió) i CC_β (capacitat de detecció) que han de ser avaluats en la validació de residus en productes d'origen animal.

Es defineix CC_α com el límit en el qual i a partir del qual es pot concloure amb una probabilitat d'error α que una mostra no és conforme. CC_β es defineix com el contingut mínim de la substància que pot ser detectat, identificat o quantificat en una mostra, amb una probabilitat d'error β .

En el cas de substàncies per a les quals no s'ha establert un límit permès, CC_{β} és la concentració mínima a què un mètode pot detectar mostres realment contaminades amb una certesa estadística de $1 - \beta$. En el cas de substàncies per a les quals s'ha establert un límit permès, CC_{β} és la concentració a què un mètode pot detectar límits de concentració permesos amb una certesa estadística de $1 - \beta$.

2.14. Transferència de mètodes analítics de rutina validats

Després d'haver validat un mètode analític de rutina en un laboratori, pot sorgir la necessitat de transferir-ho a un altre centre. La transferència d'un mètode consisteix a demostrar que el laboratori receptor pot obtenir resultats analítics comparables als del laboratori emissor. Dit d'una altra forma, és el procés de verificar, dins d'un laboratori, que un mètode prèviament validat en un altre àmbit condueix a resultats fiables [32] a través de determinats assajos, per exemple, repetir els experiments crítics del mètode de validació i executar injeccions de les mostres en paral·lel en el laboratori emissor i en el receptor.

La transferència ha de ser controlada per un procediment. Els passos recomanats són:

- Designar un responsable del projecte.
- Desenvolupar un pla de transferència.
- Definir les proves de transferència i els criteris d'acceptació (experiments de validació, anàlisi de mostres: tipus de mostra, repeticions).
- Descripció racional de les proves.
- Capacitar als analistes del laboratori que reben el mètode en tasques relacionades amb l'equip, el mètode, els paràmetres crítics i la resolució de problemes.
- Han de repetir-se dos assajos crítics de la validació del mètode en el laboratori de rutina.
- Analitzar almenys tres mostres en el laboratori de transferència i el receptor.
- Documentar la transferència dels resultats.

És important remarcar que el laboratori receptor que desitja utilitzar un mètode analític prèviament validat per a l'anàlisi de rutina és el responsable d'assegurar que aquest mètode és vàlid per a l'ús proposat, la qual cosa no exclou un compromís per part del laboratori emissor de col·laborar en tot moment durant la transferència.

2.15. Protocols, normes i guies de validació existents

S'han proposat una sèrie de protocols i guies [7–11, 33–43] sobre la validació de mètodes analítics, així com la determinació de la incertesa per part de diverses organitzacions, com AOAC Internacional, ICH, FDA, i els documents EURACHEM, entre altres:

- El manual d'estadística de l'AOAC, que inclou indicacions sobre l'estudi en un únic laboratori abans de realitzar les proves d'anàlisi en col·laboració [37].
- El text de l'ICH [39] i la metodologia [40], que estableixen els requisits mínims en els estudis de validació per a les proves utilitzades per a l'aprovació de fàrmacs.
- “L'aptitud per a l'ús de mètodes analítics: una guia de laboratori per a la validació de mètodes i temes relacionats” [36].
- “Quantificació de la incertesa en la mesura analítica” [34].

La validació d'un mètode analític també ha sigut àmpliament debatuda en la reunió de consultors de la FAO/IAEA (FAO: Organització per a l'Agricultura i l'Alimentació, *Food and Agriculture Organization*; IAEA: Agència Internacional de l'Energia Atòmica, *International Atomic Energy Agency*), al desembre de 1997, on es va tractar el tema de la validació dels mètodes analítics per al control d'aliments, l'informe del qual es troba disponible per a la seua consulta [43].

L'ús generalitzat dels antibiòtics en medicina veterinària i humana ha donat lloc a un augment significatiu de la resistència als agents antibacterians, la qual cosa pot ocasionar

importants conseqüències en la salut pública. Per minimitzar els riscos en la salut humana a causa del consum de residus d'antibiòtics en els aliments, la UE, a través del Reglament núm. 2377/90, ha establert els límits màxims residuals (MRL, *maximum residue limit*) dels medicaments veterinaris en aliments d'origen animal, i entre ells es troben alguns antibiòtics [44].

Per tant, es requereixen mètodes analítics molt sensibles per a l'anàlisi de mostres d'aliments abans de la seua venda en els mercats per al consum humà. Recentment la UE ha emès la decisió 2002/657/EC en què es refereix al funcionament dels mètodes analítics i la interpretació dels resultats en el control oficial dels residus en productes d'origen animal [31].

Les guies de validació que s'han utilitzat en la present tesi han sigut: FDA (capítols 3–5 i 10), ICH (capítol 6 i 7) i la Decisió de la Comissió 2002/657/EC (capítols 8 i 9).

2.16. Referències

1. J.A. Pérez Quadrat, M. Pujol Forn, Validación de métodos analíticos, AEFI, Barcelona, 2001.
2. ISO 9000 (2000) Quality management systems – Requirements.
3. ISO/IEC 17025 (2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
4. ISO 8402 (1994) Quality - Vocabulary.
5. J.S. Morkowski, Characterisation and validation of test methods, EUROLAB Symposium, Berlín, Alemanya, 5–7 juny, 1996.
6. U.S. FDA, Title 21 of the U.S. Code of Federal Regulations: 21 CFR 211-Current good manufacturing practice for finished pharmaceuticals.
7. U.S. FDA - Guidance for Industry (draft) Analytical procedures and methods validation: chemistry, manufacturing, and controls and documentation, 2000.

8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: definitions and terminology, Ginebra, Suïssa, 1996.
9. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, Ginebra, Suïssa, 1996.
10. U.S. EPA, Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program, Washington, EUA, 1995. <http://www.Au.Gov/so-846/pdfs/methdev.pdf>.
11. U.S. FDA - Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.
12. General Chapter 1225, Validation of compendial methods, United States Pharmacopeia 30, National Formulary 25, Rockville, MD., EUA, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2007.
13. G.C. Hokanson, *Pharm. Tech.* 18 (1994) 118.
14. G.C. Hokanson, *Pharm. Tech.* 18 (1994) 92.
15. J.M. Green, *Anal. Chem.* 68 (1996) 305.
16. B. Renger, H. Jehle, M. Fischer, W. Funk, *J. Planar Chromatogr.* 8 (1995) 269.
17. W. Wegscheider, Validation of analytical methods, in: Accreditation and quality assurance in analytical chemistry, H. Guenzler (Ed.), Springer Verlag, Berlín, Alemanya, 1996.
18. S. Si, S. Ohtake, H. Kohno, *Accred. Qual. Assur.* 2 (1997) 140.
19. AOAC Peer-Verified methods program, manual on policies and procedures, Arlington, EUA, 1998. <http://www.aoac.Org/vmeth/PVM.pdf>.
20. P.A. Winslow, R.F. Meyer, *J. Valid. Tech.* 14 (1997) 361.
21. J. Breaux, K. Jones, P. Boulas, Analytical Method development and validation, Pharmaceutical technology, AAI Development Services, 2003.
22. S.O. Krause, *Pharm. Tech. Europe* 18 (2006) 29.

23. IUPAC: Compendium of Chemical Terminology, 2a ed. (the “Gold Book”), A. D. McNaught, A. Wilkinson, 1997.
24. International vocabulary of basic and general terms in metrology, ISO, Ginebra, Suïssa, 1993.
25. J. Vessman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 867.
26. L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods, including quantification and detection capabilities, IUPAC Recommendation, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1699.
27. ISO 11843. Capability of detection, International Standards Organisation, Ginebra, Suïssa.
28. EURACHEM Guidance Document N°WGD 2, “Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EN45000 series standards and ISO/IEC”, Guide 25, 1993.
29. R.L. Plackett, J.P. Burnan, *Biometrika* 33 (1946) 305.
30. W.J. Youden, E.H Steiner, Statistical Manual of the AOAC, AOAC ed., 1975.
31. Commission Decision 2002/657/EC (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm
32. F.X. Rius, A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, *Técnicas de laboratorio* 252 (2000) 382.
33. Guide to the expression of uncertainty in measurement, ISO, Ginebra, Suïssa, 1993.
34. A. Williams, S. L. R. Ellison, M. Roesslein (Eds.). Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2a ed., 2000. Disponible en LCC Limited, Teddington, Londres, o en Eurachem Secretariat. <http://www.eurachem.org/>.
35. Validation of chemical analytical methods, NMKL Secretariat, Finlàndia, NMKL Procedure No. 4, 1996.

36. EURACHEM Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to method validation and related topics, LGC, Londres, 1996. També disponible en EURACHEM Secretariat i en la pàgina Web.
37. Statistics Manual of the AOAC, AOAC International, Gaithersburg, EUA, 1975.
38. An interlaboratory analytical method validation short course developed by the AOAC INTERNATIONAL, AOAC International, Gaithersburg, EUA, 1996.
39. Text on validation of analytical procedures, International Conference on Harmonisation. Federal Register, Vol. 60, p. 11260, 1995.
40. Validation of analytical procedures: Methodology, International Conference on Harmonisation, Federal Register, Vol. 62, No. 96, p. 27463, 1997.
41. Validation of methods, Inspectorate for Health Protection, Rijswijk, Holanda, informe 95-001.
42. A protocol for analytical quality assurance in public analysts' laboratories, Association of Public Analysts, Sheffield, Regne Unit, 1986.
43. Validation of analytical methods for food control, Report of a Joint FAO/IAEA ExPERT Consultation, desembre de 1997, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, FAO, Roma, Itàlia, 1998.
44. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L224 (1990) 1.

Part I

Anàlisi d'antibiòtics en fluids fisiològics i productes farmacèutics

No existeixen més que dos regles per escriure: tenir alguna cosa que dir i dir-ho
O. Wilde

Capítol 3

Desenvolupament i validació d'un mètode d'anàlisi per a la determinació d'amoxicil·lina utilitzant cromatografia líquida micel·lar

3.1. Resum

En aquest capítol, es descriu un mètode simple i robust per a la identificació i quantificació d'amoxicil·lina en orina fent ús de la cromatografia líquida micel·lar. L'amoxicil·lina és un dels antibiòtics més comunament prescrits en el tractament d'infeccions d'orina i pell. La seua determinació es va dur a terme en una columna fenil fent ús d'una fase mòbil micel·lar de 0.10 M dodecilsulfat sòdic i 4% butanol tamponada a pH 3. La detecció es va realitzar en la regió UV a 210 nm. En aquestes condicions, l'amoxicil·lina elueix a 5.1 min sense observar-se cap interferència de la banda proteica o dels compostos endògens de l'orina. El mètode desenvolupat va ser validat seguint la guia *Food and Drug Administration* considerant els paràmetres de linealitat ($R^2 > 0.9998$), precisió intra i interdia (RSD, 0.4–2.7% i 0.3–5%, respectivament, en medi micel·lar, i 0.14–2.6% i 0.13–6%, respectivament, en orina), i robustesa. Els límits de detecció i de quantificació són 0.04 i 0.1 µg/mL al medi micel·lar i 0.14 i 0.34 µg/mL en orina, respectivament. També es van addicionar mostres d'orina amb diferents concentracions d'amoxicil·lina, obtenint-se recuperacions en l'interval 95–110%. Els resultats mostren que el procediment és adequat per al control rutinari del fàrmac en mostres d'orina.

3.2. Introducció

L'amoxicil·lina (α -amino-*p*-hidroxibenzil-penicil·lina) és una aminopenicil·lina i actualment és un dels antibiòtics més utilitzats. Estructuralment difereix de l'ampicil·lina només en l'addició d'un grup hidroxil en l'anell aromàtic, la qual cosa la fa més susceptible a una varietat de processos de degradació. L'amoxicil·lina es troba disponible comercialment en medicaments en combinació amb el clavulanat potàssic. Encara que l'àcid clavulànic pràcticament no té activitat antibacteriana quan s'usa a soles, la seua combinació amb certes penicil·lines dóna lloc a uns efectes sinèrgics que estenen l'activitat de les penicil·lines contra molts ceps bacterians produïts per la β -lactamasa [1]. Químicament, l'amoxicil·lina és un compost hidrofílic (amb un valor del coeficient de repartiment octanol-aigua, $\log P_{o/w}$, de 0.87), les constants de dissociació del qual (pK_a) són 2.4, 7.4, i 9.6 [2]. L'estructura de l'amoxicil·lina es mostra en la figura 3.1.

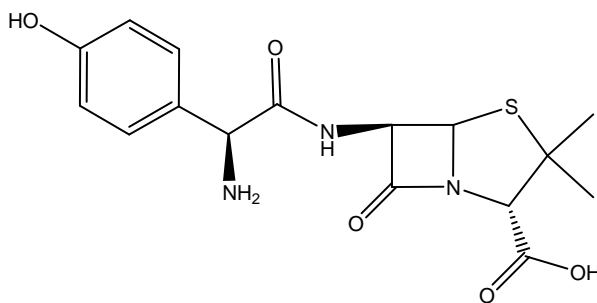


Figura 3.1. Estructura de l'amoxicil·lina.

L'amoxicil·lina s'administra oralment per a tractar infeccions respiratòries, otitis, sinusitis, infeccions de la pell i de la seua estructura, i infeccions d'orina. A més, també s'administra per al tractament de cancroide o xancre bla i gonorrea. En la pràctica

mèdica, l'amoxicil·lina s'administra en forma de comprimits amb una dosi mínima de 250 mg i una màxima de 875 mg [1]. L'amoxicil·lina s'absorbeix ràpidament després de la seua administració oral, donant lloc a uns nivells màxims en sèrum que apareixen 1–2 h després de la seua ingestió. Aproximadament el 60% de la dosi oral s'excreta en orina de forma inalterada al cap de 6 hores i un 20% com els seus metabòlits inactius (àcid peniciloic i àcid penamaldic) [2].

Entre els mètodes analítics desenvolupats per a la determinació d'amoxicil·lina, s'inclouen assajos microbiològics [3] o enzimàtics [4], i la polarografia [5]. La majoria de les publicacions descriuen mètodes que utilitzen la cromatografia líquida d'alta resolució (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) i la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS), les quals requereixen grans volums de dissolvents, extracció o tractaments de derivatització. A més, la GC-MS també suposa un cost elevat, la qual cosa limita la seua accessibilitat, mentre que els mètodes d'HPLC s'han desenvolupat per a assajos més específics. Els primers mètodes de cromatografia líquida realitzaven un pretractament amb imidazol [6], derivatització precolumna [7], o postcolumna [8]. Altres mètodes d'HPLC desenvolupats posteriorment utilitzen columnes de fase inversa alquilenllaçades i detecció ultraviolada, intercanvi de columnes o detecció amperomètrica [9–15]. Per a alguns d'aquests mètodes és possible utilitzar detecció fluorescent i derivatització postcolumna [16–17] o precolumna [18], la qual cosa proporciona al mètode una major selectivitat i sensibilitat. També s'ha utilitzat l'electroforesi capil·lar zonal (*capillary zone electrophoresis*, CZE) [19, 20], la cromatografia micel·lar electrocinètica (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) [21, 22], així com tècniques acoblades a procediments de flux continu [23]. El mètode més utilitzat en l'actualitat és la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses (HPLC-MS) [24–27]. Encara que aquests mètodes siguen selectius, ràpids i sensibles, no són adequats per a l'anàlisi clínica rutinària per les necessitats que aquesta instrumentació requereix i pel seu elevat cost.

Els mètodes de cromatografia líquida convencional que usen fases mòbils aquo-orgàniques per a la determinació de compostos en fluids fisiològics amb injecció directa presenten diversos inconvenients. Els fàrmacs s'uneixen fortament a les proteïnes de la matriu, i a més apareixen interferències dels nombrosos compostos endògens. Aquesta tècnica requereix normalment un pretractament de la mostra a causa de la tendència de les proteïnes a desnaturalitzar-se i precipitar en la vàlvula d'injecció o dins de la columna, i per tant, produint l'obstrucció o embossament el sistema.

La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC) proporciona una solució interessant a la injecció directa de mostres fisiològiques, en solubilitzar les proteïnes i protegir la columna analítica amb una capa de monòmers de tensioactiu. A més, les molècules de tensioactiu aparentment desplacen el fàrmac unit a la proteïna, alliberant-lo per participar en l'equilibri de repartiment amb la fase estacionària. És particularment atractiva la compatibilitat amb les columnes de fase inversa convencionals. Un altre avantatge de l'ús de les fases mòbils micel·lars és que són menys tòxiques, no inflamables, biodegradables i relativament econòmiques en comparació amb els dissolvents utilitzats en la cromatografia convencional aquo-orgànica [28]. L'MLC ha demostrat ser una tècnica útil en l'anàlisi de diferents fàrmacs en fluids fisiològics, com ara estimulants [29], barbitúrics [30] i altres compostos [31].

En aquest capítol es proposa un nou mètode de cromatografia líquida ràpid i quantitatiu per a la determinació d'amoxicil·lina en orina que fa ús de fases mòbils micel·lars. El procediment desenvolupat pot ser d'utilitat en l'àrea de control de qualitat, anàlisi de rutina i estudis farmacocinètics.

3.3. Part experimental

3.3.1. *Reactius*

S'ha fet ús dels següents reactius: amoxicil·lina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), dodecilsulfat sòdic (SDS, 99% puresa), hidròxid sòdic (Merck, Darmstadt, Alemanya), dihidrogenfosfat sòdic, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol (Scharlab, Barcelona), àcid clorhídric, etanol (J.T. Baker, Deventer, Països Baixos). En la preparació de totes les dissolucions es va utilitzar aigua destil·lada desionitzada (Millipore S.A.S., Molsheim, França). Els medicaments Normon (Madrid) i Alter (Madrid) es van adquirir en una farmàcia, un dels quals va ser administrat a un voluntari sa per realitzar un estudi farmacocinètic.

3.3.2. *Instrumentació*

Es va utilitzar un sistema cromatogràfic (Agilent Technologies, sèrie 1100, Palo Alto, CA, EUA), equipat amb una bomba quaternària, un mostrejador automàtic, un compartiment termostatitzat a 25 °C, i un detector de fila de díodes UV-visible (rang 190–700 nm). Les dissolucions es van injectar en el cromatògraf a través d'una vàlvula Rheodyne (Cotati, CA, EUA), proveïda d'un capil·lar estàndard amb un volum màxim d'injecció de 100 µL. El volum d'injecció va ser de 20 µL i el flux de la fase mòbil d'1 mL/min. Es van estudiar tres columnes (Scharlab) de distinta naturalesa: amino, fenil, i Kromasil C18, sent les dimensions de totes elles de 150 mm × 4.6 mm de diàmetre intern i 5 µm de grandària de partícula.

Les mesures de pH es van realitzar per mitjà d'un potenciòmetre GLP 22 (Crison, Barcelona) equipat amb un elèctrode combinat d'Ag/AgCl/vidre. També es va utilitzar una balança analítica (Mettler-Toledo, AX105 delta-range, Greifensee, Suïssa), un agitador vòrtex i una unitat d'ultrasons (Selecta, Barcelona).

3.3.3. Preparació de dissolucions estàndard, mostres i fases mòbils

Les fases mòbils micel·lars es van preparar dissolent SDS en aigua, que posteriorment va ser tamponada a pH 3 amb dihidrogenfosfat 0.01 M. A continuació, es va afegir butanol fins a aconseguir la seua concentració desitjada i finalment es va aforar amb aigua.

També es van preparar dissolucions patró de 100 µg/mL d'amoxicil·lina dissolent el patró en uns pocs mil·lilitres d'etanol amb ajuda d'un bany d'ultrasons i finalment, es va aforar amb una dissolució 0.05 M SDS–pH 3. Les mostres d'orina es van recollir en dispositius de recollida d'orina (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Regne Unit). Les dissolucions patró en orina, que també contenien 100 µg/mL d'amoxicil·lina, van ser preparades diàriament a partir d'1 mL d'orina, que es va diluir en un factor d'1:100 amb 0.05 M SDS–pH 3. Les mostres d'orina per a l'estudi farmacocinètic van ser preparades de la mateixa forma. Totes les dissolucions es van filtrar amb filtres de niló de 0.45 µm (Micron Separations, Westboro, MA, EUA).

3.3.4. Condicions cromatogràfiques

La separació es va dur a terme en una columna Hypersil Phenyl (150 mm × 4.6 mm, 5 µm de grandària de partícula) termostatitzada a 25 °C amb la fase mòbil 0.10 M SDS–4% (v/v) butanol–0.01 M NaH₂PO₄–pH 3. En aquestes condicions el temps de retenció de l'amoxicil·lina va ser de 5.1 min. Els senyals analítics es van monitoritzar amb un detector UV-visible de fila de díodes a una longitud d'ona de 210 nm, i es van adquirir mitjançant un PC connectat al cromatògraf a través d'una estació de dades (Agilent Chemstation). Les dades cromatogràfiques es van tractar amb el programari *Michrom* [32, 33]. El temps mort, que va ser d'1.9 min, es va determinar com la primera desviació significativa de la línia base obtinguda en cada cromatograma.

3.4. Resultats i discussió

3.4.1. Selecció del pH i de la columna

Amb l'objectiu d'obtenir les millors condicions d'anàlisi, es van realitzar estudis a dos valors de pH (3 i 7) i es van provar tres columnes (amino, C18, i fenil). La retenció dels compostos catiónics augmenta quan disminueix el pH en un sistema cromatogràfic micel·lar en presència d'un tensioactiu aniònic com l'SDS, pel fet que l'atracció d'aquests compostos amb el tensioactiu adsorbit sobre la fase estacionària és molt major que la seua atracció amb les micel·les de la fase mòbil. Es va estudiar la influència del pH sobre la retenció de l'amoxicil·lina utilitzant les següents fases mòbils micel·lars que sols contenen SDS (M): 0.05, 0.10, 0.15 i 0.20, tamponades amb 0.01M NaH₂PO₄. Els factors de retenció (*k*), eficàcies (*N*) i asimetries (*B/A*) obtingudes es mostren en la taula 3.1. Les eficàcies, expressades com a plats teòrics, es van determinar a un 10% de l'alçada de pic utilitzant l'equació de Foley i Dorsey [34].

$$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_R}{A + B} \right)^2}{(B/A) + 1.25} \quad (3.1)$$

Els factors d'asimetria es van calcular com la relació de les distàncies entre el màxim del pic i l'extrem posterior (*B*), i entre el màxim del pic i l'extrem anterior (*A*), mesurats també al 10% de l'alçada del pic. Malgrat que les eficàcies (1500–3300) i asimetries (0.7–1.6) són semblants per a ambdós valors de pH, la major diferència resideix en que l'amoxicil·lina elueix prop o en el temps mort en totes les columnes a pH 7. Per aquesta raó, les següents experiències es van dur a terme a pH 3.

La modificació de la fase estacionària per l'adsorció del tensioactiu pot comportar profundes implicacions respecte a la retenció, selectivitat i asimetria en MLC. En primer lloc, la formació d'una capa hidrofílica aniònica entre els compostos hidrofílics i el grup

sulfat en una columna C18 [35], explicaria l'alta resolució. D'altra banda, l'escassa retenció dels compostos hidrofílics es deu a l'increment de la polaritat en la fase estacionària com a resultat de l'adsorció del tensioactiu.

En alguns casos, una pobra retenció, selectivitat i reproductibilitat obtinguda amb les columnes C18, pot millorar-se utilitzant una fase estacionària amino [36], on la retenció dels compostos polars és major que la dels apolars quan la fase mòbil és polar. Finalment, els compostos hidrofílics poden presentar una elevada retenció en les columnes fenil a causa de la seua naturalesa aromàtica (interaccions π - π i hidrofobicitat), i també a circumstàncies espacials (p. ex., molècules planes).

Es va injectar amoxicil·lina en una columna amino, una C18, i una fenil, utilitzant les següents fases mòbils pures d' SDS (M): 0.05, 0.10, 0.15 i 0.20, o SDS (M)-propanol (% , v/v): 0.05-2, 0.05-6, 0.10-4, 0.15-2 i 0.15-6. Els resultats es mostren en la taula 3.1. El propanol és el dissolvent orgànic que s'addiciona amb més freqüència en les fases mòbils micel·lars per incrementar l'eficàcia dels pics cromatogràfics, i disminuir i controlar la retenció. Es va observar el comportament habitual en MLC amb SDS en totes les columnes i fases mòbils: un augment en les concentracions d' SDS i alcohol origina una disminució en la retenció de l'antibiòtic. D'altra banda, les eficàcies generalment disminueixen quan la concentració de tensioactiu augmenta, però en canvi, aquestes augmenten a majors concentracions de dissolvent orgànic. Les tres columnes (amino, C18, i fenil) mostren una retenció adequada, bones eficàcies i asimetries. Cal ressenyar que la columna C18 presenta una baixa retenció, mentre que la fenil dona lloc a millors eficàcies. A més, el pic cromatogràfic de l'amoxicil·lina solapa amb compostos endògens de l'orina en les columnes amino i C18. Per tant, es va seleccionar la columna fenil per a les següents anàlisis.

Taula 3.1. Paràmetres cromatogràfics obtinguts per a l'amoxicil·lina, eluïda en les tres columnes estudiades.

	Fenil			Amino			C18		
	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>
pH 3									
0.05 M	15.9	3140	1.1	16.2	2180	0.9	17.7	820	0.7
0.10 M	7.2	2350	1.1	8.1	1500	0.9	7.9	750	0.8
0.15 M	4.0	1920	1.1	5.2	1400	1.0	5.1	750	0.9
0.20 M	3.1	1530	1.1	3.9	1460	1.0	3.9	750	0.9
pH 7									
0.05 M	0.3	1590	1.6	1.8	3260	1.8	0.5	770	1.0
0.10 M	0.3	1570	1.6	1.4	2620	1.4	0.4	770	1.1
0.15 M	0.3	1520	1.2	1.2	2130	1.2	0.4	740	1.0
0.20 M	0.3	1430	1.2	1.2	2100	1.2	0.4	910	1.2
pH 3									
0.05 M – 2% ^a	9.1	3270	1.1	10.3	2010	0.99	9.9	2920	1.1
0.05 M – 6% ^a	7.4	3660	1.2	7.3	2400	0.80	8.2	3510	1.0
0.10 M – 4% ^a	4.5	2550	1.1	4.7	1800	0.90	4.6	1790	1.1
0.15 M – 2% ^a	3.5	1900	1.1	4.8	1870	0.93	3.2	1350	1.1
0.15 M – 6% ^a	3.2	3100	1.2	3.0	1900	0.94	2.9	1870	1.1

^a propanol

3.4.2. Selecció de la composició fase mòbil

La fase mòbil òptima per a la separació de l'amoxicil·lina es va obtenir aplicant un procediment interpretatiu, que fa ús dels temps de retenció i dels paràmetres de forma dels pics cromatogràfics obtinguts en diverses fases mòbils, a concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic adequadament distribuïdes en l'espai dels factors (constituït per les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic). En aquest estudi es va injectar l'antibiòtic en les següents fases mòbils d'SDS (M)/propanol (%/ v/v): 0.05/2, 0.05/6, 0.1/4, 0.15/2, 0.15/6; SDS (M)/butanol (%/ v/v): 0.05/2, 0.05/6, 0.75/5, 0.10/4,

0,125/3, 0.125/5, 0.15/2, 0.15/6; i SDS (M)/pentanol (%/ v/v): 0.05/2, 0.10/4. Els factors de retenció, eficàcies i factors d'asimetria obtinguts es resumeixen en la taula 3.2.

Taula 3.2. Paràmetres cromatogràfics obtinguts per a l'amoxicil·lina en l'optimització del mètode.

SDS (M) – alcohol (%)	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>
0.05 – 2 ^a	9.1	3270	1.1
0.05 – 6 ^a	7.4	3660	1.2
0.10 – 4 ^a	4.5	2550	1.1
0.15 – 2 ^a	3.5	1900	1.1
0.15 – 6 ^a	3.2	3100	1.2
0.05 – 2 ^b	7.5	2940	1.2
0.05 – 6 ^b	3.8	3490	1.3
0.075 – 5 ^b	3.5	3310	1.3
0.10 – 4 ^b	2.4	2940	1.1
0.125 – 3 ^b	2.9	2690	1.1
0.125 – 5 ^b	2.2	3190	1.1
0.15 – 2 ^b	2.6	1815	1.2
0.15 – 6 ^b	2.0	2780	1.2
0.05 – 2 ^c	4.6	3450	1.1
0.10 – 4 ^c	2.2	2390	1.4

^apropanol, ^bbutanol, ^cpentanol

Les dades cromatogràfiques obtingudes es modelitzaren amb el programari *Michrom* [33] per a la selecció de la composició òptima de la fase mòbil. Aquesta pot dur-se a terme a partir de l'observació de les superfícies de resolució o de la simulació de cromatogrames. Han de tenir-se en compte diversos factors en aquesta selecció. La primera és òbviament la màxima separació, però eventualment ha de sacrificar-se un poc

de resolució a favor d'altres factors, com ara el temps d'anàlisi i la robustesa. Això pot obligar a descartar les condicions seleccionades inicialment, i buscar altres fases mòbils que originen una resolució inferior. La predicció del comportament de retenció, basat en un model contrastat [37], facilita la selecció de la composició òptima de la fase mòbil. Es va utilitzar el següent model per descriure la retenció de l'amoxicil·lina en l'MLC amb fases mòbils híbrides:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} \quad (3.2)$$

on $[M]$ i φ són la concentració molar del tensioactiu que es troba en forma de micel·les i la fracció volumètrica del dissolvent orgànic, respectivament; K_{AS} i K_{AM} descriuen el repartiment del solut entre la fase aquosa i la fase estacionària o la micel·la, respectivament, K_{AD} i K_{MD} , mesuren la variació relativa de la concentració del solut en l'aigua i en la micel·la, respectivament, en presència del modificador, considerant com a referència la dissolució micel·lar pura. Els errors predits amb l'equació 3.2 van estar entre un 2–4%.

El perfil dels pics cromatogràfics es va obtenir per mitjà del model gaussià polinomialment modificat [38], que és una funció de la distància a la coordenada del màxim del pic, t_R (temps de retenció):

$$h(t) = H e^{(-1/2)(|t-t_R|/s_0 + s_1(t-t_R))^2} \quad (3.3)$$

on H és l'alçada del pic cromatogràfic, s_0 és la desviació estàndard d'un pic simètric gaussià que descriu la regió central del pic experimental, i, s_1 un coeficient que quantifica la seua distorsió. Els coeficients s_0 i s_1 es relacionen amb l'eficàcia i el factor d'asimetria.

Es va descartar l'ús de propanol ja que el temps de retenció de l'amoxicil·lina no era prou xicotet, mentre que el pentanol va originar un solapament entre els pics de l'amoxicil·lina i els dels compostos endògens de l'orina en la majoria de les fases mòbils. Cal indicar que el pentanol no va millorar els resultats obtinguts amb el butanol. Aquest últim va ser seleccionat com a modificador orgànic atès que permetia l'anàlisi de l'amoxicil·lina en un curt temps d'anàlisi i amb una completa resolució. L'observació dels cromatogrames simulats en el disseny experimental de les fases mòbils d' SDS-butanol, va permetre triar la fase mòbil òptima: 0.1 M SDS-4% (v/v) butanol-0.01 M NaH₂PO₄ tamponada a pH 3. Els paràmetres cromatogràfics de l'amoxicil·lina en aquesta fase mòbil van ser (*k*, *N* and *B/A*): 2.4, 2940, i 1.1.

3.4.3. Comportament de la matriu d'orina

El senyal de fons de les mostres d'orina, produït per les proteïnes (en forma d'una banda ampla en la capçalera dels cromatogrames), i per diversos compostos endògens (que originen pics a diferents temps de retenció), pot afectar seriosament la detecció de l'amoxicil·lina. D'altra banda, la injecció d'un nombre elevat de mostres d'orina pot produir el deteriorament del farciment de la columna, acurtant la seua vida, o pot obligar a realitzar una regeneració freqüent de la fase estacionària. Per tot això, es van analitzar mostres d'orina després de la seua dilució.

Es van injectar diversos blancs d'orina d'homes i dones directament en el sistema cromatogràfic amb l'objectiu de controlar el seu senyal de fons. El perfil de la banda proteica i els compostos endògens de totes les mostres van ser semblants als mostrats en la figura 3.2a. No es van observar pics addicionals en anàlisis posteriors.

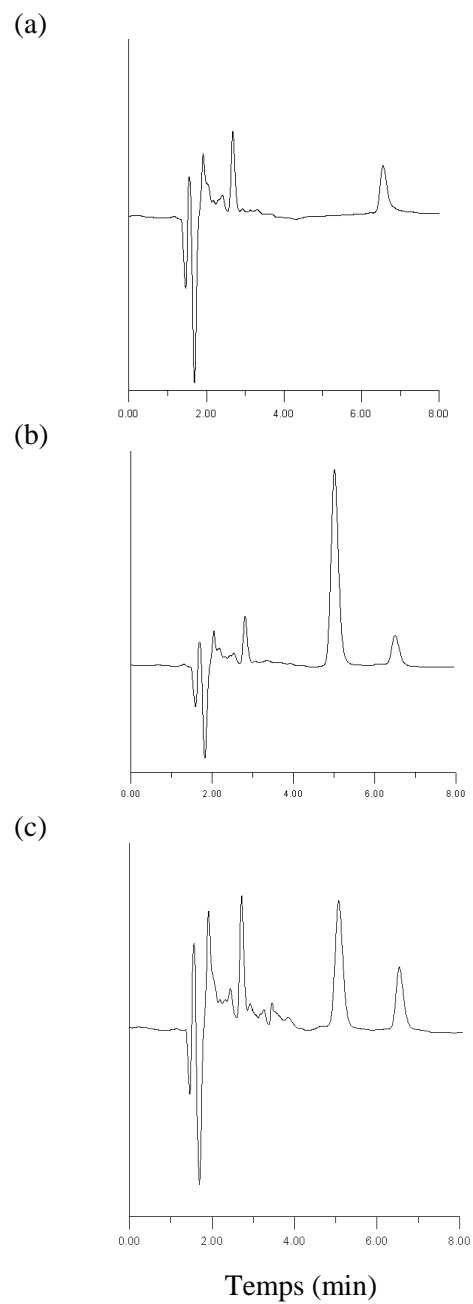


Figura 3.2. Cromatogrames del blanc d'orina (a), orina addicionada amb amoxicil·lina (15 µg/mL) (b), i amoxicil·lina excretada (6 µg/mL) en orina després de 2 h de la ingestió de l'antibiòtic (c). Fase mòbil: 0.1 M SDS–4% butanol–pH 3.

3.4.4. Validació del mètode

La validació del mètode es va dur a terme d'acord amb la guia de validació *Food and Drug Administration* (FDA) [39]. Els paràmetres avaluats van ser: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, precisió i exactitud, robustesa i estabilitat del compost.

a) Selectivitat

Es van injectar directament en el sistema cromatogràfic cinc mostres d'orina que no contenien l'antibiòtic per determinar si els compostos endògens podien interferir en el temps de retenció de l'antibiòtic. No es va trobar cap interferència dels endògens en les matrius fisiològiques estudiades.

b) Linealitat

Es van construir corbes de calibratge a partir de les àrees dels pics cromatogràfics en set concentracions distintes (nou rèpliques), en l'interval de concentració 0.4–50 µg/mL. Les corbes de calibratge es van obtenir per a dissolucions micel·lars de l'analit i per a mostres d'orina addicionades diluïdes en un factor 1:100, per mitjà del mètode de regressió lineal de mínims quadrats. També, es va estudiar la variabilitat dels coeficients d'ajust del calibratge obtenint 5 corbes en 5 dies diferents durant un període de dos mesos a partir de diferents sèries de patrons. Els pendents de les corbes en absència i presència d'orina van ser semblants (0.6525 ± 0.005), les ordenades en l'origen generalment estadísticament nul·les (-0.04 ± 0.09) i els coeficients de determinació, $R^2 > 0.9998$.

c) Límits de detecció i de quantificació

Els límits de detecció (LOD, criteri $3s$) i quantificació (LOQ) per a l'amoxicil·lina es van determinar d'acord amb la guia de validació FDA [37] a partir la desviació estàndard de les àrees dels pics obtinguts en injectar per decuplicat dissolucions que contenien l'amoxicil·lina, en presència i absència d'orina, en una concentració situada en la part baixa de la corba de calibratge. Els LODs i LOQs en SDS i en orina són: 0.04 i 0.10 $\mu\text{g/mL}$, i 0.14 i 0.34 $\mu\text{g/mL}$, respectivament.

d) Precisió i exactitud

Es va avaluar l'exactitud i precisió de les anàlisis en assajos realitzats en el mateix dia (intradia) o al llarg de diversos dies (interdia). Per a això es va analitzar l'amoxicil·lina en set concentracions distintes en l'interval 0.4–50 $\mu\text{g/mL}$ en presència i absència d'orina. La precisió intradia es va determinar injectant les dissolucions nou vegades en el mateix dia, mentre que la interdia es va calcular com la mitjana de les nou mesures dels valors intradia obtinguts al llarg de 5 dies en un període de 3 mesos realitzats per diferents analistes i equips. Els resultats, expressats com desviació estàndard relativa (RSD), per als assajos intra i interdia són 0.4–2.7% i 0.3–5%, respectivament, al medi micel·lar, i 0.14–2.6% i 0.13–6%, respectivament, en orina.

e) Robustesa

La robustesa del mètode es va estudiar injectant per sextuplicat una dissolució patró de 10 $\mu\text{g/mL}$ en fases mòbils a les quals se les havia realitzat xicotets canvis en els paràmetres cromatogràfics (flux, concentració de tensioactiu, percentatge del dissolvent orgànic i pH). Es van trobar diferències insignificants en les àrees i poca variabilitat en els temps de retenció de l'amoxicil·lina. Els resultats, mostrats en la taula 3.3, indiquen que els factors seleccionats es mantenen estables quan es realitzen xicotets canvis en aquests paràmetres, tret del flux.

Taula 3.3. Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	t_R (min)
A: SDS (M)		
0.095	-0.005	5.23
0.1	0	5.10
0.0105	+0.005	5.01
Mitjana \pm SD		5.11 \pm 0.11
RSD (%)		2.2
B: Butanol (% v/v)		
3.9	-0.1	5.29
4	0	5.10
4.1	+0.1	4.99
Mitjana \pm SD		5.13 \pm 0.15
RSD (%)		2.9
C: pH		
2.9	-0.1	5.31
3	0	5.10
3.1	+0.1	4.92
Mitjana \pm SD		5.11 \pm 0.20
RSD (%)		3.9
D: Flux (mL/min)		
0.9	-0.1	5.67
1	0	5.10
1.1	+0.1	4.56
Mitjana \pm SD		5.1 \pm 0.6
RSD (%)		11.8

f) Estabilitat

Es va observar que les dissolucions d'amoxicil·lina preparades en absència i presència d'orina es degradaven després d'una setmana d'emmagatzematge. La seua descomposició es va confirmar per l'aparició de nous pics en els cromatogrames a uns temps de retenció de 4.58 i 5.30 min, els quals no van interferir amb el de l'analit. Per tant, totes les dissolucions es van conservar a 4 °C fins a la seua anàlisi, i es van usar en el període d'una setmana. L'amoxicil·lina es va analitzar immediatament després de la seua preparació i en intervals de temps seleccionats durant el seu període d'emmagatzematge. Transcorregudes 24 h, 48 h i 1 setmana de la seua preparació en orina, la degradació va ser del 4%, 19% i 64%, respectivament.

g) Anàlisi en preparacions farmacèutiques

Per confirmar la utilitat del mètode, en primer lloc es van analitzar dos medicaments comercialitzats com comprimits (Normon i Alter) que contenen una mescla d'amoxicil·lina (875 mg) i un inhibidor de β -lactamases (àcid clavulànic, 125 mg). Per a les anàlisis, es van pesar, triturar i homogeneïtzar deu comprimits. A continuació, es van pesar sis porcions i cada una es va sonicar en una xicoteta quantitat d'etanol en un bany d'ultrasons. Després es va utilitzar una dissolució 0.05 M SDS-pH 3 per afavorir l'extracció de l'amoxicil·lina de nou amb ajuda del bany d'ultrasons, i finalment es va diluir amb la mateixa. Els excipients van ser insolubles en el medi micel·lar, per tant, les dissolucions de les mostres es van filtrar abans de la seua injecció en el sistema cromatogràfic. Els valors trobats concorden amb els declarats pels fabricants, no observant-se cap interferència de l'àcid clavulànic. La quantitat trobada per comprimit va ser 878.1 ± 0.6 mg i 880.0 ± 0.6 mg, per als medicaments de Normon i Alter, respectivament.

h) Determinació d'amoxicil·lina en mostres d'orina adicionades

En segon lloc, es va investigar també l'aplicació del procediment cromatogràfic proposat a la determinació d'amoxicil·lina en orina, utilitzant inicialment mostres d'orina adicionades en un factor de dilució d'1:100 amb 0.05 M SDS-pH 3. Per a això s'addiciona l'orina en set concentracions conegudes diferents (0.4 a 50 µg/mL) dins de l'interval de linealitat estudiat, realitzant-se nou repliques per a cada concentració. Les recuperacions es van calcular comparant la concentració obtinguda en les mostres d'orina adicionades respecte a les quantitats reals. Aquestes van ser excel·lents, trobant-se en l'interval 95–110%. Els errors més grans es van obtenir per a les concentracions més baixes. La figura 3.2b mostra el cromatograma d'una mostra d'orina adicionada que conté amoxicil·lina analitzada amb la fase mòbil òptima.

i) Control en mostres reals d'orina

Finalment, es van realitzar estudis d'excreció urinària amb un voluntari sa, al qual es va administrar una dosi oral d'amoxicil·lina (875 mg). Es va recollir una mostra d'orina just abans de l'administració del fàrmac per ser utilitzada com a blanc, i altres van ser recollides a intervals de temps apropiats postdosi (nou vegades al dia, aproximadament cada 1 h), mesurant-se el volum. Les mostres es van refrigerar a 4 °C fins a ser analitzades, moment en el qual es van diluir en un factor 1:100, i es van injectar directament en el sistema cromatogràfic sense cap tractament previ, excepte la filtració. No es va observar cap interferència de l'àcid clavulànic ja que aquest compost a penes absorbeix ($\lambda_{\max} = 201$ nm en aigua) a la longitud d'ona de mesura ($\lambda = 210$ nm). La figura 3.3 mostra l'evolució de la concentració de l'amoxicil·lina durant l'excreció urinària. La concentració màxima excretada va ser de 803 µg/mL a les 4 h de la seua administració oral, mentre que la quantitat excretada de forma inalterada va ser de 517 mg (59% de la dosi administrada). La figura 3.2c mostra el cromatograma de l'amoxicil·lina excretada després de 2 h de la seua administració.

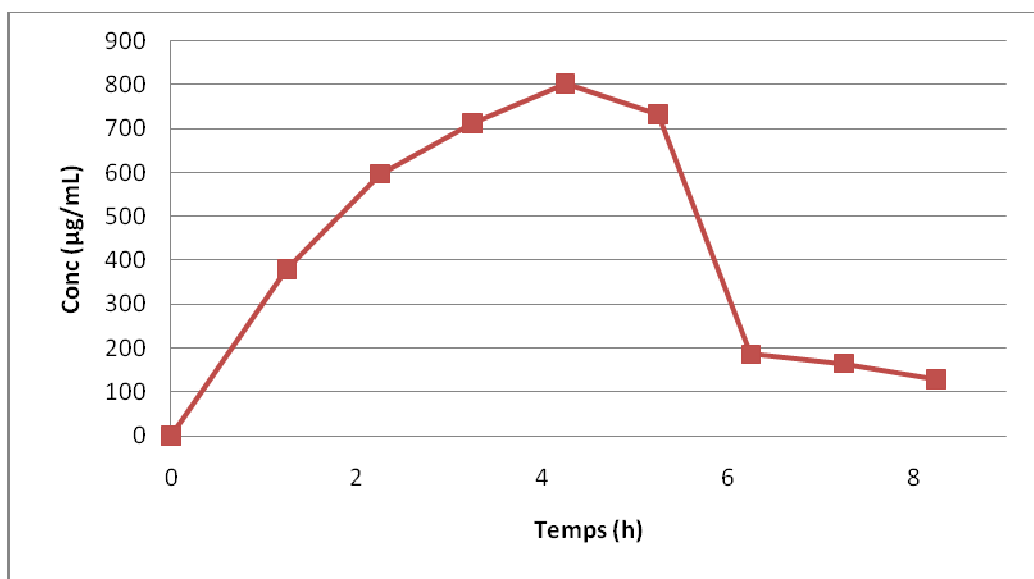


Figura 3.3. Estudi d'excreció urinària de l'amoxicil·lina després de la seua administració oral a un voluntari sa.

3.5. Conclusions

Els resultats indiquen que el procediment d'MLC proposat pot ser utilitzat per a l'anàlisi d'amoxicil·lina, una de les penicil·lines prescrites amb més freqüència, en mostres d'orina, amb un temps d'anàlisi inferior a 6 min.

La validació del mètode que inclou selectivitat, linealitat, sensibilitat, exactitud, precisió, estabilitat i robustesa, es va desenvolupar de manera eficient obtenint resultats satisfactoris. El mètode es va aplicar a l'anàlisi d'amoxicil·lina en preparacions farmacèutiques i orina. El procediment proposat també és prou sensible per ser aplicat en l'anàlisi rutinària de control de qualitat i estudis farmacocinètics del fàrmac si es té en compte que les mostres d'orina es van injectar sense cap tractament previ per separar o preconcentrar el fàrmac.

3.6. Referències

1. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, EUA, 1988.
2. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, Londres, Regne Unit, 2004.
3. D. Mainz, K. Borner, P. Koeppe, J. Kotwas, H. Lode, *J. Antimicrob. Chemother.* 50 (2002) 699.
4. G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 661.
5. S.J. Lyle, S.S. Yassin, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 225.
6. K.M. Matar, E.M. Nazi, Y.M. El-Saved, M.J. Al-Yamani, S.A. Al-Suwaveh, K.I. Al-Khamis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 97.
7. C.Y.W. Ang, W.H. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. AOAC International* 79 (1996) 389.
8. H.J. Mascher, C. Kikuta, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 221.

9. M. Dousa, R. Hosmanová, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 373.
10. Q.B. Cass, R.F. Gomes, S.A. Calafatti, J. Pedrazolli, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 235.
11. A. Aghazadeh, G. Kazemifard, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 325.
12. S.M. Foroutan, A. Zarghi, A. Shafaati, A. Khoddam, H. Movahed, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 531.
13. K.M. Matar, *Chromatographia* 64 (2006) 255.
14. N. Cavazos Rocha, L. Vera Cabrera, O. Welsh Lozano, N. Waksman de Torres, M.L. Salazar Cavazos, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1775.
15. P. Leroy, C. Gayriloff, A. Nicolas, P. Archimbault, G. Ambroggi, *Int. J. Pharm.* 82 (1992) 157.
16. T. Tokumura, Y. Machida, *Int. J. Pharm.* 228 (2001) 1.
17. H. Mascher, C. Kikuta, *J. Chromatogr.* 506 (1990) 417.
18. V. Gamba, G. Dusi, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 69.
19. S.M. Santos, M. Henriques, A.C. Duarte, V.I. Esteves, *Talanta* 71 (2007) 731.
20. G. Pajchel, K. Pawlowski, S. Tyski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 75.
21. W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2000) 69.
22. M.I. Bailón Pérez, L. Cuadros Rodríguez, C. Cruces Blanco, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 746.
23. H.M. González San Miguel, J.M. Alpízar Lorenzo, V. Cerdà Martín, *Talanta*, 72 (2007) 296.
24. K-H. Yoon, S-Y. Lee, W. Kim, J-S. Park, H-J. Kim, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 121.
25. S. Riediker, R.H. Stadler, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1614.
26. S. De Baere, M. Cherlet, K. Baert, P. De Backer, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1393.
27. T. Reyns, S. De Boever, S. De Baere, P. De Backer, S. Croubels, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 282.

28. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
29. M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, A. Martinavarro Domínguez, J. Esteve Romero, *Chromatographia* 57 (2003) 51.
30. M.E. Capella Peiró, M. Gil Agustí, A. Martinavarro Domínguez, J. Esteve Romero, *Anal. Biochem.* 309 (2002) 261.
31. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, D. Bose, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
32. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 187.
33. J.R. Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel Dekker, Nova York, EUA, 2000.
34. J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 57 (1983) 730.
35. B.K. Lavine, W.T. Cooper, Y. He, S. Hendayana, J.H. Han, J. Tetreault, *J. Colloid Interf. Sci.* 165 (1994) 497.
36. B.A. Olsen, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 113.
37. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
38. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
39. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Rockville, MD, EUA, 2001.

Capítol 4

Anàlisi cromatogràfic de mostres d'orina i medicaments que contenen antibiòtics del grup de les penicil·lines

4.1. Resum

En aquest quart capítol es presenta un procediment de cromatografia líquida d'alta resolució que utilitza fases mòbils micel·lars híbrides per a la determinació simultània de quatre antibiòtics del grup de les penicil·lines (amoxicil·lina, ampicil·lina, cloxacil·lina i dicloxacil·lina) en preparats farmacèutics i mostres d'orina, que s'injecten directament en el sistema cromatogràfic. Les penicil·lines són utilitzades per al tractament d'infeccions gastrointestinals i sistèmiques. La separació cromatogràfica es va realitzar utilitzant una columna Zorbax C18 i detecció a 210 nm. L'aplicació d'un procediment d'optimització interpretatiu, basat en l'equació que relaciona el factor de retenció amb la concentració micel·lar, va facilitar l'obtenció de la composició de la fase mòbil en què els antibiòtics es resolen millor. La seua determinació es va dur a terme amb una fase mòbil micel·lar de 0.11 M de dodecilsulfat sòdic – 6% propanol – 0.01 M NaH₂PO₄ tamponada a pH 3. En aquestes condicions el temps total d'anàlisi va ser de 16 min. No es va observar cap interferència de la banda de proteïnes de l'orina o compostos endògens. El mètode va ser validat d'acord amb la guia *Food and Drug Administration* tenint en compte paràmetres analítics com la linealitat ($R^2 > 0.994$), la precisió intra i interdia (RSD: 0.1–4.4%, i 1.2–5.9%, respectivament), o la robustesa, entre altres. El mètode és prou sensible per a l'anàlisi rutinària de penicil·lines en els nivells urinàries terapèutics, amb uns límits de detecció en un rang d'1.5–15 ng/mL i límits de quantificació de 50 ng/mL. Les recuperacions al medi micel·lar i en una matriu d'orina addicionada es van obtenir en els intervals 92.4–108.2% i 96–110%, respectivament. Finalment, el mètode es va aplicar amb èxit a la determinació d'aquests antibiòtics en medicaments i mostres d'orina.

4.2. Introducció

Les penicil·lines, antibiòtics del grup dels β -lactàmics, han sigut els agents antimicrobians més àmpliament utilitzats durant més de 80 anys i encara són considerats com un dels grups d'antibiòtics més importants. S'utilitzen per tractar infeccions del tracte respiratori l'origen del qual es deu a la invasió bacteriana [1]. També s'usen clínicament contra els bacteris grampositius i gramnegatius [2]. L'estructura bàsica de les penicil·lines (àcid 6-aminopenicil·lànic) consisteix en un anell tiazolidínic unit a un anell β -lactàmic amb una cadena lateral. L'anell de tiazolidina serveix per protegir a l'anell β -lactàmic. Les seues modificacions poden donar lloc a canvis en les propietats farmacocinètiques i antibacterianes. L'anell β -lactàmic és el responsable de l'acció antibacteriana. És molt làbil enfront de les β -lactamases bacterianes i quan es trenca l'antibiòtic perd el seu efecte. La cadena lateral és variable i determina les propietats farmacològiques de cada penicil·lina, en gran manera l'espectre antibacterià, la susceptibilitat a les β -lactamases i la potència que caracteritza a les distintes penicil·lines [3].

Hui en dia, l'amoxicil·lina (AMO) és l'antibiòtic més comunament usat. Es tracta d'un antibiòtic β -lactàmic α -amino-substituint que és utilitzat ben sovint a causa del seu ampli espectre d'acció contra microorganismes, i pel seu baix cost. Té una polaritat moderada, indicada pel valor del seu coeficient de repartiment octanol-aigua ($\log P_{o/w} = 0.87$), mentre que les seues constants de dissociació àcid-base són $pK_a = 2.7, 7.5$ i 9.6 [3, 4]. S'absorbeix ràpidament després d'haver sigut administrada per via oral. En orina, s'excreta de forma inalterada al voltant d'un 60% d'una dosi oral en les primeres 6 hores i un 20% com el seu metabòlit inactiu (àcid peniciloic) en el mateix període.

Per la seua banda, l'ampicil·lina (AMP) s'utilitza en el tractament de les infeccions dels tractes intestinals, urinàries i respiratòries, però mostra una menor activitat antimicrobiana que l'AMO. Té també una polaritat moderada ($\log P_{o/w} = 1.06$), i les

seues constants de dissociació són $pK_a = 2.5$ i 7.1 [3,4]. S'absorbeix fàcilment encara que de forma incompleta per via oral. Aproximadament un 30% d'una dosi oral s'excreta com a fàrmac inalterat en l'orina en les primeres 6 hores, i al voltant d'un 10% com àcid peniciloic.

Tanmateix, la cloxacil·lina (CLO) és un compost hidrofòbic ($\log P_{o/w} = 2.5$) amb una constant de dissociació $pK_a = 2.7$ [3]. S'absorbeix de manera incompleta per via oral i un 35% d'una dosi oral s'excreta en orina de forma inalterada després de 12 hores, mentre que un 11% ho fa com àcid peniciloic.

Finalment, la dicloxacil·lina (DIC) presenta unes característiques químiques molt semblants ($\log P_{o/w} = 2.91$) a la CLO [3]. CLO i DIC pertanyen a les penicil·lines resistents a la penicil·linasa, mentre que l'AMO i AMP pertanyen a les penicil·lines d'ampli espectre. La figura 4.1 mostra les estructures químiques dels quatre antibiòtics estudiats.

S'han desenvolupat diverses tècniques analítiques per a la determinació de les penicil·lines des del seu descobriment. Els assajos microbiològics han mostrat ser un tipus de mètodes microbiològics de screening insensibles i lents, o no quantitius [5], mentre que els mètodes colorimètrics no tenen especificitat, limitant d'aquesta forma la seua aplicació [6]. La cromatografia líquida d'alta resolució (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) és actualment la tècnica més utilitzada per a l'anàlisi d'antibiòtics, ja que combina especificitat amb sensibilitat, reproductibilitat i rendibilitat. Encara que aquesta tècnica s'ha aplicat principalment per a l'anàlisi d'amoxicil·lina, també han aparegut en bibliografia diversos procediments cromatogràfics per a l'anàlisi simultània de diverses penicil·lines.

D'aquesta manera, s'han descrit diversos mètodes analítics de cromatografia líquida per a la determinació d'AMO [7–20], AMP [11–23], CLO [11–17, 19, 21, 24–26] i DIC [11–16, 20, 23–27] en fluids fisiològics (sèrum, plasma i orina), preparacions farmacèutiques, i aliments d'origen animal, entre altres. S'ha utilitzat la detecció

ultraviolada, de fluorescència, electroquímica i, en alguns casos, l'espectrometria de masses. S'han detallat diverses tècniques de preparació de mostres per a plasma o sèrum que inclouen desproteïnitació [12, 23] i extracció [8, 9, 11, 13, 14, 18]. Alguns mètodes utilitzen derivatització precolumna [15, 26] o postcolumna [10] amb posterior detecció fluorescent, o una degradació fotoquímica [24] amb detecció electroquímica. D'altra banda, s'han establert altres mètodes per a l'anàlisi de mesclures de penicil·lines en el sector farmacèutic [7, 12, 28, 29], fluids biològics [29, 30] i aliments [31–33].

La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC), que utilitza una dissolució de tensioactiu com a fase mòbil en una concentració superior a la concentració micel·lar crítica, és una alternativa a l'HPLC clàssica. L'MLC permet l'anàlisi de matrius complexes sense necessitat de realitzar una etapa prèvia d'extracció, pel fet que les micel·les tendeixen a enllaçar-se a les proteïnes competitiuament, donant lloc així a complexos proteïnes-compostos i proteïnes lliures. Les proteïnes són solubilitzades i arrossegades de forma innòcua amb el dissolvent en compte de precipitar en la columna. Diversos treballs han demostrat la utilitat de la injecció directa en MLC per a la determinació de compostos de diversa naturalesa en productes farmacèutics [34], sèrum [35] i orina [36].

En aquest capítol, es mostra el desenvolupament i la validació d'un nou mètode d'MLC per a la quantificació de forma simple, ràpida i específica de quatre penicil·lines (AMO, AMP, CLO i DIC) en preparacions farmacèutiques i mostres d'orina. El mètode ha sigut validat seguint les directrius de la guia *Food and Drug Administration* [37]. El propòsit que es persegueix amb el desenvolupament d'aquest procediment és la seua possible aplicació en les anàlisis de rutina en controls de qualitat de productes farmacèutics, així com en estudis farmacocinètics.

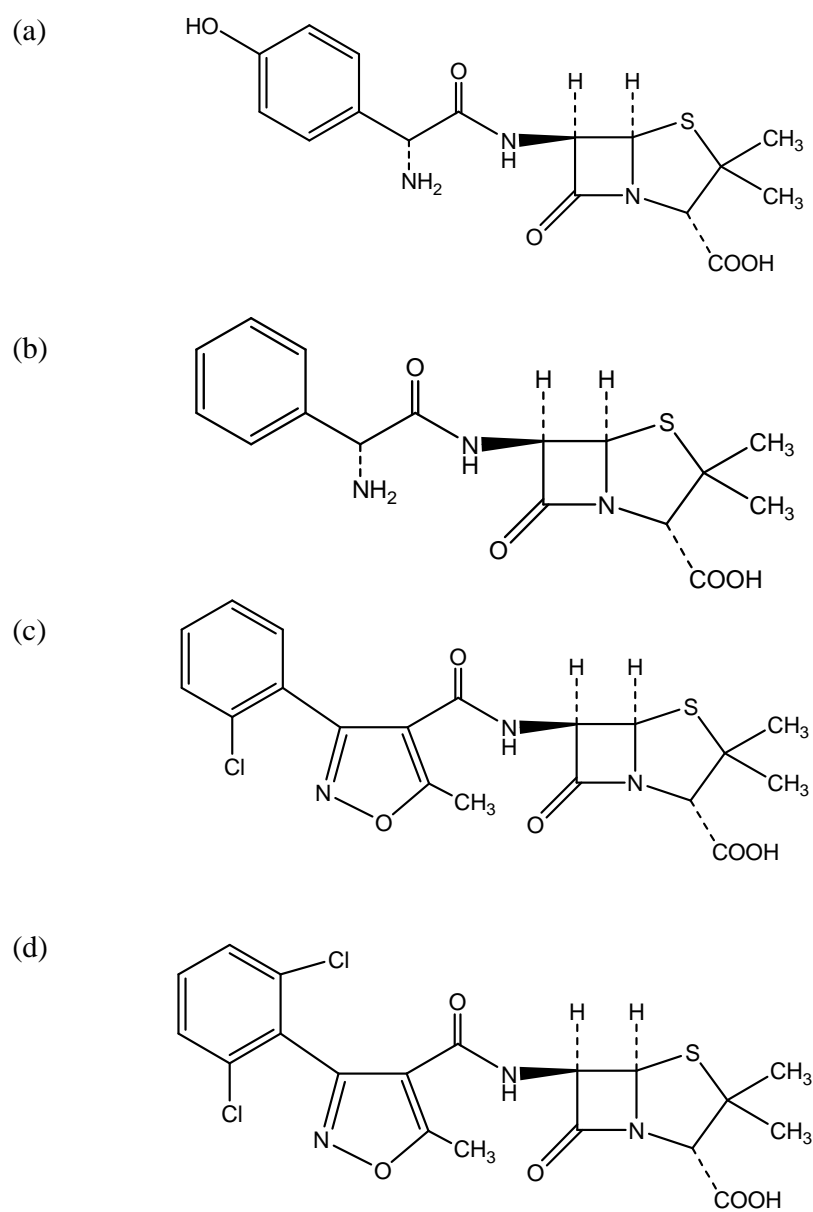


Figura 4.1. Estructures de: (a) amoxicil·lina, (b) ampil·lina, (c) cloxacil·lina, i (d) dicloxacil·lina.

4.3. Part experimental

4.3.1. Reactius

Es va utilitzar dodecilsulfat sòdic (SDS, 99% puresa), hidròxid sòdic (Merck, Darmstadt, Alemanya), dihidrogenfosfat sòdic, 1-propanol (Scharlab, Barcelona), àcid clorhídric i etanol (J.T. Baker, Deventer, Països Baixos). Els antibiòtics van ser: amoxicil·lina, ampicil·lina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), cloxacil·lina i dicloxacil·lina (MP Biomedicals, Solón, Ohio, EUA). Es va utilitzar aigua destil·lada desionitzada en la preparació de totes les dissolucions (Millipore S.A.S., Molsheim, França). Els medicaments es van adquirir en una farmàcia, excepte Pathocil que va ser directament subministrat per Sandoz (Princeton, EUA).

4.3.2. Instrumentació i condicions cromatogràfiques

Es va utilitzar el mateix sistema cromatogràfic d'Agilent Technologies, així com les mateixes condicions d'operació descrites en el capítol 3. La balança analítica, el pHmetre, l'agitador vòrtex, i la unitat d'ultrasons també van ser els mateixos que els descrits en el capítol 3.

Les columnes analítiques estudiades van ser: Hypersil Phenyl, Kromasil C18 i Zorbax C18 (Scharlab), totes amb les mateixes dimensions (150 mm × 4.6 mm, 5 µm de grandària de partícula).

La separació es va dur a terme utilitzant la columna Zorbax C18 en un compartiment termostatitzat a 25 °C a una longitud d'ona de 210 nm. La composició de la fase mòbil seleccionada va ser 0.11 M SDS–6% (v/v) propanol–0.01 M NaH₂PO₄ tamponada a pH 3. En aquestes condicions, el temps total d'anàlisi va ser inferior a 16 min. Finalment, es va usar el programari *Michrom* [38] per al tractament de les dades cromatogràfiques i la selecció de la composició de la fase mòbil òptima.

4.3.3. Preparació de dissolucions estàndard, mostres i fases mòbils

La preparació de les fases mòbils micel·lars es va dur a terme de la mateixa manera descrita en el capítol 3. No obstant això, en aquesta ocasió es va afegir propanol a les mateixes com a dissolvent orgànic.

Es van preparar dissolucions patró individuals de 50 µg/mL de cada antibiòtic (AMO, AMP, CLO i DIC) dissolent cadascun d'aquests en uns pocs mil·lilitres d'etanol, amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons i, finalment, es va aforar amb una dissolució 0.05 M SDS–pH 3.

Les mostres d'orina van ser recollides en dispositius de recollida d'orina (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Regne Unit). Es van preparar dissolucions patró addicionades amb orina, que contenien 50 µg/mL de cadascuna de les quatre penicil·lines, diluint l'orina en un factor d'1:50 amb 0.05 M SDS–pH 3. Les dissolucions van ser preparades diàriament, es van protegir de la llum i es van conservar a 4 °C fins al seu ús. Les mostres d'orina es van injectar directament en el sistema cromatogràfic després de la dilució descrita anteriorment sense cap altre pretractament. Les fases mòbils micel·lars, les dissolucions patró i les mostres d'orina es van filtrar a través de membranes de niló 0.45 µm (Micron Separations, Westboro, MA, EUA) previ a la seua utilització o anàlisi.

4.3.4. Determinació en preparacions farmacèutiques

Es van analitzar medicaments en forma de comprimits i càpsules que contenien entre 250–875 mg de l'antibiòtic corresponent i excipients. El pes mitjà per comprimit/càpsula es va calcular prenent 10 unitats. A continuació, el contingut del comprimit o càpsula es va triturar i es va reduir a pols fi homogeni en un morter, d'on es van pesar diverses porcions amb precisió i es van sonicar en presència d'etanol (5% v/v, del contingut final) en un bany d'ultrasons. Després es va afegir una dissolució de 0.05 M SDS–pH 3 per

afavorir l'extracció de l'analit, utilitzant de nou el bany d'ultrasons. A continuació, es va efectuar una dilució amb la mateixa dissolució micel·lar, per obtenir una concentració final de 20 µg/mL. Els excipients en els comprimits i càpsules no es van dissoldre en el medi micel·lar, d'ací que les dissolucions de les mostres es filtraren abans de la seua injecció en el sistema cromatogràfic.

4.4. Resultats i discussió

4.4.1. Selecció del pH de la fase mòbil

Les estructures dels antibiòtics estudiats es mostren en la figura 4.1. Es pot observar que AMO i AMP existiran en la seua forma catiònica en medi àcid a causa de la protonació del grup amino, en forma zwitteriònica quan el medi siga neutre a causa de la protonació del grup amino i la desprotonació del grup carboxílic, i en la seua espècie aniònica en medi bàsic per la desprotonació del grup carboxílic. Tanmateix, CLO i DIC es troben en la seua forma neutra a valors de pH àcid, i aniònica a pH bàsic.

Cal tenir en compte que l'estabilitat de les penicil·lines depèn en gran manera del pH, sent més estables en l'interval entre 6.0–7.0 [39]. Així, l'anàlisi de mostres que contingueren una mescla d'aquests quatre antibiòtics hauria de dur-se a terme amb fases mòbils tamponades en aquesta zona. Tanmateix, es va constatar que la retenció de les quatre penicil·lines disminueix quan el pH de la fase mòbil augmenta, i elueixen en el temps mort a pH 7. Això és causat per la repulsió entre les càrregues negatives del tensioactiu i els antibiòtics, que es troben en la seua forma aniònica a aquest pH. Per tant, l'única opció possible va ser utilitzar fases mòbils tamponades a pH 3. A aquest valor es va obtenir una millor resolució i uns temps de retenció adequats per als quatre compostos. El següent pas va ser estudiar l'estabilitat dels antibiòtics en aquestes condicions.

4.4.2. Estabilitat dels antibiòtics

La majoria de les penicil·lines són pràcticament inestables en medi àcid fort, ja que poden hidrolitzar-se, mentre que en condicions neutres o alcalines mantenen la integritat estructural de les seues molècules. No obstant això, com s'ha indicat anteriorment, només les fases mòbils tamponades a pH 3 proporcionen un control adequat sobre la retenció de les penicil·lines, i per tant ha d'estudiar-se la seua estabilitat en aquestes condicions. Per això, es van addicionar mostres d'orina amb les quatre penicil·lines, i es va avaluar l'estabilitat en medi àcid (pH 3) a dos temperatures (4 °C i 25 °C) fent ús de la fase mòbil 0.11 M SDS–6% propanol. Després de dos dies d'emmagatzematge a 4 °C, es va observar la degradació d'AMO, AMP i CLO per l'aparició de nous pics en els cromatogrames que van solapar amb els pics dels analits. D'altra banda, la descomposició de DIC és més ràpida i té lloc a les 3 hores de la seua preparació. Així, totes les dissolucions es van preparar diàriament i es van conservar a baixa temperatura (4 °C) fins a la seua utilització.

Durant el període d'estudi de l'estabilitat de les dissolucions de les penicil·lines, aquestes es van analitzar immediatament després de la seua preparació i en intervals de temps seleccionats al llarg del seu emmagatzematge. Després de 6 h, 24 h i 42 h de conservació a 4 °C, la descomposició d'AMO, AMP, CLO i DIC va ser de 0%, 1% i 35%; 0%, 0.2% i 18%; 1%, 10% i 30%; i 53%, 74% i 78%, respectivament. D'altra banda, a 25 °C es va observar una degradació entre el 5% (AMP) i el 90% (DIC) després de 3 hores d'haver-se preparat les dissolucions. Per tant, en aquestes condicions, les mostres han d'analitzar-se durant les primeres 3 h després de la seua preparació. Les mostres d'orina també poden conservar-se durant unes quantes setmanes a –20°C sense que s'observe cap degradació apreciable.

4.4.3. *Optimització cromatogràfica: selecció de la columna i la fase mòbil*

Per a la selecció de les millors condicions d'anàlisi, es van estudiar tres columnes de diferent naturalesa (Hypersil phenyl, Kromasil C18 i Zorbax C18). Aquestes presenten les següents característiques comunes: grandària de porus (100 Å), grandària de partícula (5 µm), longitud i diàmetre intern (150 mm × 4.6 mm). Les fases estacionàries d'octadecil (C18) continuen sent les més populars i els empaquetatges de base de sílice els més àmpliament utilitzats en cromatografia líquida de fase inversa a causa de la seua capacitat de separar una gran varietat de soluts amb bona resolució, selectivitat i eficàcia. Les fases estacionàries de fenil han demostrat ser útils per a la separació d'espècies en què poden utilitzar-se interaccions π - π durant el procés de retenció, com ara els compostos aromàtics.

La fase estacionària modificada pel tensioactiu adsorbit suposa importants implicacions en relació amb la retenció, eficàcia i asimetria dels soluts en MLC. A més, la majoria dels procediments analítics requereixen l'addició d'un dissolvent orgànic a la fase mòbil, la qual cosa redueix els temps de retenció i augmenta les eficàcies dels compostos. Generalment, s'usen alcohols de cadena curta, com el propanol, butanol o pentanol. En aquest cas, es va seleccionar propanol, ja que permetia la resolució completa dels quatre compostos en un temps d'anàlisi adequat, a més de la separació entre el pic d'AMO i la banda de les proteïnes de l'orina. No obstant això, si s'utilitzara butanol o pentanol, es produiria un solapament entre els pics de les penicil·lines i els de l'orina. Ha de ressenyar-se que la selecció de l'alcohol està directament relacionada amb la polaritat dels compostos estudiats.

Les dissolucions patró i les dissolucions patró adicionades en orina de les quatre penicil·lines es van injectar en les tres columnes usant fases mòbils micel·lars híbrides a diferents concentracions d'SDS i propanol. Els factors de retenció (k), eficàcies (N) i factors d'asimetria (B/A) obtinguts es resumeixen en la taula 4.1. Els resultats de la columna fenil no es mostren pel fet que diversos compostos no van eluir en la majoria de

les fases mòbils utilitzades, raó per la qual es va descartar l'ús d'aquesta columna per a posteriors estudis. Així, es van dur a terme dos processos d'optimització, un per a la columna Kromasil, i un altre per a la columna Zorbax.

A continuació, es va portar a terme una estratègia d'optimització interpretativa per seleccionar la columna, i les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic més adequades per a l'anàlisi simultània de les quatre penicil·lines. El disseny experimental que es va utilitzar per examinar el comportament cromatogràfic dels antibiòtics va consistir en seleccionar cinc fases mòbils (quatre d'aquestes situades en els vèrtexs d'un rectangle i la cinquena en el seu centre), les quals es van tamponar a pH 3. En el cas de la columna Kromasil es van utilitzar les següents composicions d' SDS (M) / propanol (%): 0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.10/7.5, 0.15/2.5 0.15/12.5. Aquestes concentracions van ser seleccionades a fi d'evitar per un costat que els temps de retenció foren molt elevats, i per un altre molt pròxims al temps mort. Tanmateix, la concentració màxima de propanol per a la columna Zorbax va ser de 7.5% en lloc del 12.5%, pel fet que totes les penicil·lines eluïen molt prop del temps mort per a concentracions superiors a 7.5%, la qual cosa donava lloc a un considerable error en les prediccions de l'etapa de modelització. Les dades cromatogràfiques (k , N i B/A), es van tractar amb el programari *Michrom* [38], el qual, a més, també mostra els canvis en els cromatogrames predits quan es varia progressivament la concentració de dissolvent orgànic i tensioactiu. La retenció dels compostos es va modelitzar amb la següent equació [40]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} [M]} \quad (4.1)$$

on $[M]$ i φ són la concentració molar del tensioactiu que es troba en forma de micel·les i la fracció volumètrica del dissolvent orgànic, respectivament; K_{AS} i K_{AM} descriuen el repartiment del solut entre la fase aquosa i la fase estacionària, o la micel·la, respectivament, K_{AD} i K_{MD} , mesuren la variació relativa de la concentració del solut en

l'aigua i en la micel·la, respectivament, en presència del modificador, considerant com a referència la dissolució micel·lar pura. L'equació 4.1 s'ha utilitzat, també, en els estudis de modelització de la retenció que es presenten en els capítols 5–10.

Les equacions de retenció dels quatre antibiòtics, junt amb les eficàcies i factors d'asimetria dels pics cromatogràfics es van utilitzar per obtenir diagrames de la funció de resolució [41]:

$$R_s = \frac{\prod_{i=1}^n O_i}{\left[\frac{\sum_{i=1}^n O_i}{n} \right]^n} \quad (4.2)$$

on O_i és el grau de solapament o fracció solapada del pic:

$$O_i = 1 - \frac{w_i'}{w_i} \quad (4.3)$$

sent w_i l'àrea total d'un pic donat i w_i' l'àrea del pic solapat amb el cromatograma format pels pics restants; n és el nombre de pics del cromatograma. La funció de resolució, R_s , varia entre 0 i 1, indicant la proximitat a la unitat la bondat de la separació. L'equació 3.3 del capítol 3 es va utilitzar per descriure el perfil dels pics cromatogràfics. Les diferents regions de l'espai de variables sovint s'associen amb diferents parells de pics crítics. Per tant, s'obté una millor visió del comportament cromatogràfic en els sistemes micel·lars si s'examinen els diagrames de resolució de les mescles, en un ampli interval de concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic, la qual cosa permet l'avaluació de la robustesa de la composició de la fase mòbil òptima.

La figura 4.2 mostra els diagrames de resolució per a les columnes Zorbax i Kromasil, dibuixats utilitzant les dades cromatogràfiques dels antibiòtics (k , N , i B/A) obtinguts en les cinc fases mòbils indicades anteriorment. Per a la columna Kromasil, la

majoria dels pics de les penicil·lines van solapar amb la banda de proteïnes de l'orina i/o els compostos endògens per a diverses composicions de les fases mòbils, donant lloc a una baixa resolució en quasi tot l'espai de les variables (figura 4.2a). La separació dels quatre compostos només va ser possible en una xicoteta regió, encara que aquests no es van resoldre fins a la línia base. D'altra banda, es van produir diversos canvis en l'ordre d'elució dels compostos en tot l'espai en variar tant la concentració de tensioactiu com la de dissolvent orgànic (p.ex., AMO i AMP, d'una banda, i CLO i DIC, d'una altra). Tanmateix, per a la columna Zorbax, es van obtenir uns temps de retenció adequats i bones eficàcies per als quatre compostos sense que s'observara cap interferència de l'orina. En aquest cas, l'ordre d'elució dels antibiòtics va ser sempre el mateix. A més, la resolució òptima (valors pròxims a la unitat) s'obté en una àmplia regió de concentracions d' SDS i propanol (figura 4.2b), la qual només es modifica en dos regions en què disminueix dràsticament a causa d'un solapament entre alguns pics: a) una zona molt estreta a concentracions baixes d' SDS (0.05 M) i concentracions elevades d'alcohol (7.5%), on es produeix el solapament entre els pics d'AMO i CLO, i b) en una regió delimitada per concentracions d' SDS entre 0.075 M i 0.15 M, i fins a un 5% de propanol, on els pics de DIC i AMP solapen completament, o fins i tot ocorre un solapament parcial entre AMP, CLO, i DIC. Per tant, es va seleccionar la columna Zorbax per a dur a terme els posteriors estudis ja que proporcionava una major robustesa (una zona més àmplia on els compostos se separen completament a nivell de la línia base).

Finalment, es va seleccionar la fase mòbil 0.11 SDS M–6% propanol–0.01 M NaH_2PO_4 –pH 3 per a l'anàlisi dels antibiòtics ja que permetia la seua determinació en menys de 16 minuts amb una bona resolució ($R_s = 0.993$), i a més, no es van observar interferències de la banda de proteïnes o compostos endògens. Els paràmetres cromatogràfics (k , N i B/A) obtinguts per als antibiòtics en aquesta fase mòbil van ser: 2.4, 1600 i 1.4; 11.1, 800 i 1.8; 5.6, 800 i 1.8; i 8.0, 800 i 1.7 per a AMO, AMP, CLO i DIC, respectivament. En la figura 4.3, es mostren els cromatogrames simulat i

experimental obtinguts per a una mescla de les penicil·lines, sent la concordança entre ambdós cromatogrames excel·lent.

4.4.4. Comportament de la matriu d'orina

A causa de la senzillesa en la manipulació de les mostres, l'orina s'utilitza preferentment a altres fluids fisiològics en el control de la ingestió de fàrmacs. Tanmateix, quan es realitza la injecció directa de l'orina en el sistema cromatogràfic, la banda ampla que apareix en la capçalera dels cromatogrames, i els pics dels compostos endògens que s'obtenen a diversos temps de retenció, poden afectar seriosament la detecció dels fàrmacs més hidrofílics. Per tant, si el nivell de concentració del fàrmac analitzat no és excessivament baix, és convenient diluir la mostra d'orina abans de la seua injecció, per reduir l'amplada de la banda de les proteïnes.

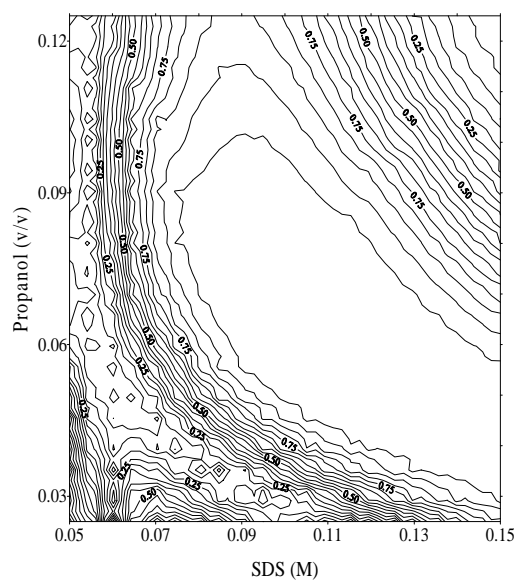
Per aquest motiu i per protegir la vida de la columna a causa de la matriu adsorbida després de la injecció d'un nombre elevat de mostres d'orina, es va decidir dur a terme les anàlisis després de la dilució de les mostres. Per a totes les penicil·lines, es va aconseguir una sensibilitat adequada després d'una dilució en un factor 1:50, per a la seua detecció en orina almenys fins a 12–14 h després de la ingestió dels antibiòtics. Els perfils de la banda de proteïnes i compostos endògens per a totes les mostres van ser semblants als mostrats en la figura 4.4a. No es van trobar pics addicionals en anàlisis posteriors. Aquestos resultats són compatibles amb els requisits de les anàlisis de rutina.

Taula 4.1. Paràmetres cromatogràfics (factor de retenció, k , eficàcia, N , i factor d'asimetria, B/A) obtinguts per a les penicil·lines, eluides en les columnes Kromasil i Zorbax.

KROMASIL C18													
SDS (M)	Propanol (% v/v)	AMO			AMP			CLO			DIC		
		k	N	B/A	k	N	B/A	k	N	B/A	k	N	B/A
0.05	2.5	12.0	1100	1.2	15.9	700	1.4	9.4	2000	0.8	20.5	200	1.3
0.05	12.5	6.9	200	1.9	13.1	100	1.4	6.8	200	1.1	10.8	800	1.5
0.1	7.5	3.6	400	1.4	12.5	1000	1.2	6.2	700	1.4	8.2	800	1.4
0.15	2.5	3.8	800	1.2	14.2	1100	1.1	9.6	1000	1.1	12.5	900	1.2
0.15	12.5	2.1	70	2.3	7.8	700	1.5	3.3	300	1.4	4.4	500	1.4

ZORBAX C18													
SDS (M)	Propanol (% v/v)	AMO			AMP			CLO			DIC		
		k	N	B/A	k	N	B/A	k	N	B/A	k	N	B/A
0.05	2.5	6.4	1100	1.1	29.3	2200	1.1	17.1	1900	1.1	23.8	1300	1.2
0.05	7.5	4.3	2600	1.7	21.6	900	0.9	4.3	700	1.3	8.8	900	1.1
0.1	5	2.4	1600	1.8	11.1	500	1.8	5.6	300	1.9	8.0	500	1.7
0.15	2.5	2.1	500	1.4	8.2	800	1.4	5.9	800	1.3	7.8	800	1.3
0.15	7.5	1.7	1300	1.0	6.2	800	1.5	2.8	300	1.1	3.9	400	1.5

(a)



(b)

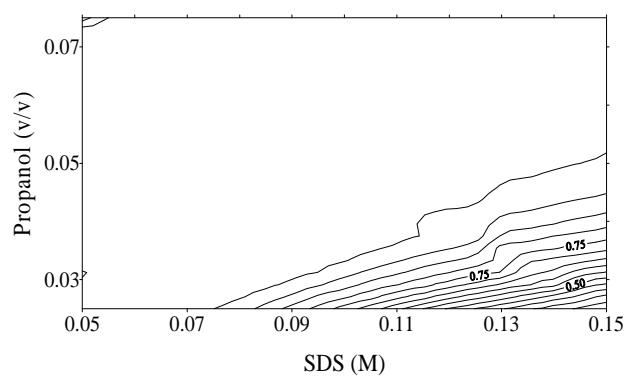
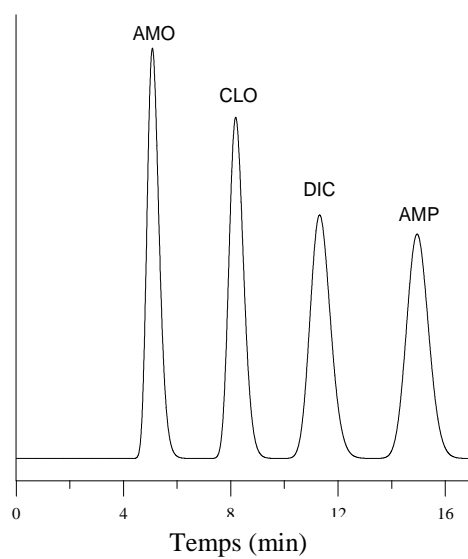


Figura 4.2. Diagrames de resolució segons el criteri d'optimització de les fraccions solapades per a la separació de les quatre penicil·lines, eluïdes amb fases mòbils d'SDS–propanol a pH 3 i utilitzant les columnes: (a) Kromasil, o (b) Zorbax.

(a)



(b)

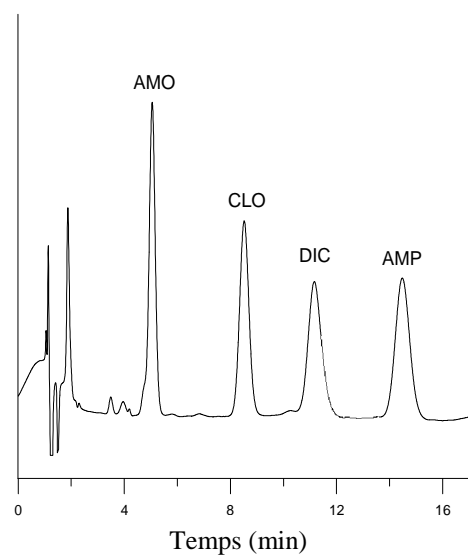
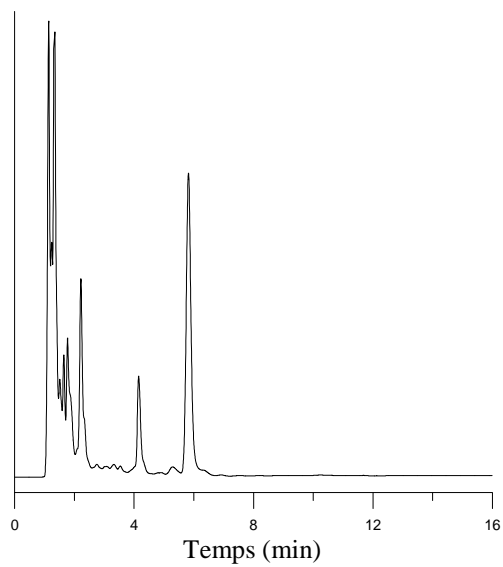


Figura 4.3. Cromatogrames predit (a), i experimental (b) d'una mescla d'aproximadament 10 $\mu\text{g/mL}$ d'amoxicil·lina (AMO), ampicil·lina (AMP), cloxacil·lina (CLO) i dicloxacil·lina (DIC), per a la fase mòbil seleccionada (0.11 M SDS–6% propanol–pH 3).

(a)



(b)

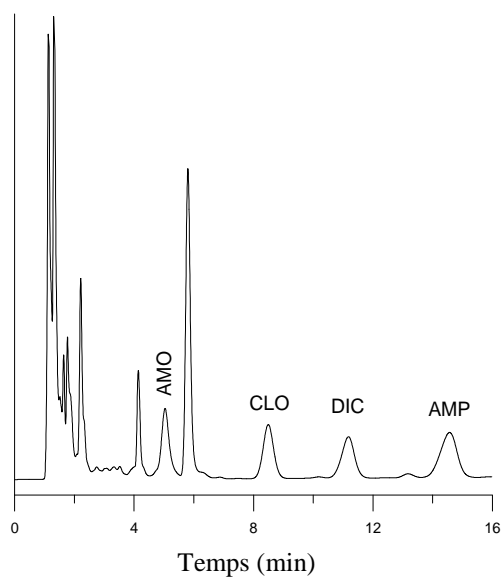


Figura 4.4. Cromatogrames del blanc d'orina (a), i de les quatre penicil·lines (10 µg/mL) en una mostra d'orina addicionada (b), per a la fase mòbil seleccionada (0.11 M SDS–6% propanol–pH 3). Totes les mostres es van diluir en un factor d' 1:50 amb 0.05 M SDS–pH 3.

4.4.5. *Validació del mètode*

La validació del mètode es va realitzar seguint les directrius indicades en la guia de validació *Food and Drug Administration* (FDA) [37], per a l'avaluació dels següents paràmetres: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, precisió, exactitud, recuperació i robustesa.

a) *Selectivitat*

Es van seleccionar sis mostres d'orina que no contenien els antibiòtics com a mostres de control, i es van analitzar mitjançant injecció directa en el sistema cromatogràfic després de la seua convenient dilució. Es va estudiar el grau en què els pics cromatogràfics dels compostos endògens poden interferir en els temps de retenció de les penicil·lines. No es va observar cap interferència en les matrius fisiològiques estudiades quan es van comparar els blancs d'orina amb mostres d'orina addicionades (figura 4.4).

b) *Linealitat*

Les corbes de calibratge es van construir utilitzant les àrees dels pics cromatogràfics de les penicil·lines en vuit concentracions diferents (sis rèpliques), en l'interval de 0.05–25 µg/mL, i en dos matrius diferents: medi micel·lar i orina (factor de dilució 1:50). La variabilitat dels paràmetres del calibratge es va estudiar per mitjà de la realització de les corbes durant 5 dies en un període de 2 mesos, a partir de diferents grups de patrons. Els pendents i les ordenades en l'origen es van determinar pel mètode de regressió lineal de mínims quadrats. Els resultats van ser semblants en ambdós matrius (els errors relatius foren inferiors a l'1% en tots els casos), mentre que la correlació va resultar ser lineal per a tots els antibiòtics en l'interval de concentració estudiat.

Les equacions ajustades, els coeficients de determinació (R^2) i les desviacions estàndard relatives (RSD, %) dels pendents per a cadascuna de les penicil·lines en orina són:

AMO	$y = 0.589 x + 0.018$	$R^2 = 0.994$	RSD (%) = 1.6
AMP	$y = 0.557 x - 0.034$	$R^2 = 0.997$	RSD (%) = 1.2
CLO	$y = 0.436 x - 0.031$	$R^2 = 0.994$	RSD (%) = 6.7
DIC	$y = 0.436 x - 0.032$	$R^2 = 0.994$	RSD (%) = 1.6

c) Límits de detecció i de quantificació

Es van calcular els límits de detecció (LOD) per a AMO, AMP, CLO i DIC en el medi micel·lar i en orina ($n = 10$) aplicant el criteri $3s$ [37] (tres vegades la desviació estàndard de la dissolució menys concentrada inclosa en la corba de calibratge dividida pel pendent, i utilitzant una sèrie de 10 dissolucions que contenen aquesta concentració). Els LODs (ng/mL) en la dissolució micel·lar i en orina van ser: 1.5 i 4; 3.7 i 4.4; 10.4 i 10.4; i 11 i 15 per a AMO, AMP, CLO i DIC, respectivament. Els límits de quantificació (LOQ) per als quatre compostos en ambdues matrius es van seleccionar com la concentració més baixa utilitzada en la corba de calibratge (50 ng/mL).

d) Precisió i exactitud

Es va calcular la precisió intra i interdia per a les quatre penicil·lines a quatre concentracions diferents en l'interval 0.5–10 $\mu\text{g/mL}$, en medi micel·lar i orina (factor de dilució 1:50) (taula 4.2). Els resultats van ser semblants en ambdues matrius. Els assajos intradia es van determinar per mitjà de la injecció consecutiva de sis rèpliques d'aquestes dissolucions al llarg del mateix dia, mentre que les anàlisis interdia van correspondre a la mitjana de cinc mesures dels valors intradia obtinguts en cinc dies diferents durant un període de tres mesos, realitzat per diferents analistes i en equips diferents per a les

mateixes concentracions. L'assaig de la precisió es va avaluar expressant la desviació estàndard (*standard deviation*, SD) de les rèpliques com a percentatge del valor mitjà. L'exactitud es va obtenir comparant la concentració dels analits calculada a partir de la corba de calibratge amb la concentració nominal (addicionada). Els resultats mostren una bona precisió (expressada com a desviació estàndard relativa, RSD, %) i exactitud (expressada com a error relatiu, Er, %) del mètode amb valors inferiors al 6% i 9% per als quatre analits en orina, respectivament (taula 4.2). Per tant, el mètode pot ser aplicat en les anàlisis de rutina de les penicil·lines.

e) **Robustesa**

Els estudis de la robustesa del mètode es van realitzar mitjançant la injecció en el sistema cromatogràfic de sis rèpliques d'una dissolució estàndard de cada penicil·lina a una concentració de 5 µg/mL, en un conjunt de fases mòbils a les quals se'ls va realitzar xicotets canvis en els paràmetres següents: concentració d'SDS, percentatge de propanol, flux, i pH. Els resultats mostrats en la taula 4.3, indiquen que les xicotetes variacions en aquestos paràmetres no alteren significativament el factor de retenció o l'àrea dels pics cromatogràfics dels compostos estudiats (RSD mitjana ≈ 6%). El flux de la fase mòbil és el paràmetre cromatogràfic que modifica en major grau els temps de retenció o les àrees dels pics (RSD mitjana ≈ 8.7%). Això es deu al fet que les condicions d'aquest paràmetre es van modificar en ± 10%, i aquesta variació és important per a alguns dels compostos estudiats. Una variació de ± 5% en les condicions del flux podria ser més apropiada, i donaria lloc a uns valors de dispersió més xicotets.

g) Recuperacions

Les recuperacions de les quatre penicil·lines es van determinar addicionant els compostos en mostres d'orina (en un factor de dilució 1:50) amb una dissolució 0.05 M SDS-pH 3 que contenia quantitats conegudes dels fàrmacs a quatre concentracions diferents (0.5, 1, 5 i 10 µg/mL). Les recuperacions es van obtenir també en dissolucions micel·lars (SDS) per comparar els resultats. Es van processar i analitzar les mostres addicionades per mitjà del procediment descrit anteriorment. Les recuperacions es van calcular comparant la concentració obtinguda en les mostres d'orina addicionada respecte a les quantitats reals addicionades. El valor mitjà de les recuperacions per a AMO va ser de 100.2% en SDS i 104.6% en orina; en el cas d'AMP es va obtenir un 100.2% en SDS i un 102% en orina; per a CLO un 99.0% en SDS i un 99.2% en orina, i finalment per a DIC un 102.1% en SDS i un 104.2 % en orina. Els resultats obtinguts mostren unes recuperacions satisfactòries per a les quatre penicil·lines.

Taula 4.2. Precisió i exactitud intradia (n = 6) i interdia (en un període de 5 dies al llarg de tres mesos) per a mostres d'orina addicionades amb les penicil·lines.

Analit	Conc. Addic. ($\mu\text{g/mL}$)	Intradia		
		Trobada (mitjana \pm SD) ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	RSD (%)
AMO	0.5	0.522 \pm 0.007	4.4	1.3
	1	0.955 \pm 0.021	4.5	2.2
	5	4.89 \pm 0.19	2.2	3.9
	10	10.36 \pm 0.06	3.6	0.6
AMP	0.5	0.525 \pm 0.018	5.0	3.4
	1	0.926 \pm 0.018	7.4	1.9
	5	5.22 \pm 0.23	4.4	4.4
	10	9.82 \pm 0.06	1.8	0.6
CLO	0.5	0.519 \pm 0.010	3.8	2.0
	1	0.933 \pm 0.016	6.7	1.7
	5	4.62 \pm 0.07	7.6	1.5
	10	10.827 \pm 0.012	8.3	0.1
DIC	0.5	0.518 \pm 0.011	3.6	2.1
	1	0.93 \pm 0.03	7.0	3.2
	5	5.28 \pm 0.04	5.6	0.7
	10	10.63 \pm 0.11	6.3	1.0

Taula 4.2. (continuació).

Analit	Conc. Addic. ($\mu\text{g/mL}$)	Interdia		
		Trobada (mitjana \pm SD) ($\mu\text{g/mL}$)	E_r (%)	RSD (%)
AMO	0.5	0.517 ± 0.008	3.4	1.5
	1	0.94 ± 0.03	6.0	3.2
	5	4.94 ± 0.08	1.2	1.6
	10	10.6 ± 0.4	6.0	3.8
AMP	0.5	0.534 ± 0.013	6.8	3.6
	1	0.918 ± 0.011	8.2	1.2
	5	5.3 ± 0.3	6.0	5.7
	10	10.2 ± 0.6	2.0	5.9
CLO	0.5	0.533 ± 0.019	6.6	3.6
	1	0.96 ± 0.03	4.0	3.1
	5	4.84 ± 0.23	3.2	4.8
	10	10.4 ± 0.5	4.0	4.8
DIC	0.5	0.541 ± 0.020	8.2	3.7
	1	0.97 ± 0.03	3.0	3.1
	5	5.3 ± 0.3	6.0	5.7
	10	10.61 ± 0.14	6.1	1.3

Taula 4.3. Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	AMO		AMP	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)					
0.105	-0.005	4.7	2.88	13.5	3.16
0.11	0	4.6	3.10	13.1	3.11
0.115	+0.005	4.5	2.88	13.1	3.30
Mitjana ± SD		4.63 ± 0.11	2.99 ± 0.06	13.23 ± 0.23	3.15 ± 0.04
RSD (%)		2.4	2.0	1.7	1.3
B: Propanol (%, v/v)					
5.9	-0.1	4.4	3.09	13.0	3.16
6	0	4.6	3.10	13.1	3.11
6.1	+0.1	4.5	2.96	13.1	3.22
Mitjana ± SD		4.51 ± 0.12	2.99 ± 0.06	13.07 ± 0.06	3.14 ± 0.03
RSD (%)		2.7	2.0	0.5	1.0
C: pH					
2.9	-0.1	5.2	3.08	13.6	3.07
3	0	4.6	3.10	13.1	3.11
3.1	+0.1	4.2	3.04	11.4	3.02
Mitjana ± SD		4.7 ± 0.5	3.07 ± 0.03	12.7 ± 1.2	3.07 ± 0.04
RSD (%)		10.6	1.0	9.4	1.3
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	5.2	3.02	14.6	3.11
1	0	4.6	3.10	13.1	3.11
1.1	+0.1	4.6	2.94	11.9	3.11
Mitjana ± SD		4.8 ± 0.3	3.02 ± 0.08	13.2 ± 1.4	3.1 ± 0.0
RSD (%)		6.3	2.6	10.6	0.0

Taula 4.3. (continuació).

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	CLO		DIC	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)					
0.105	-0.005	8.7	1.82	11.2	1.6
0.11	0	7.5	1.92	10.1	1.5
0.115	+0.005	7.3	1.67	9.5	1.6
Mitjana ± SD		7.8 ± 0.7	1.81 ± 0.12	10.3 ± 0.9	1.37 ± 0.03
RSD (%)		9.0	6.6	8.7	2.2
B: Propanol (%, v/v)					
5.9	-0.1	7.6	1.98	10.0	1.56
6	0	7.5	1.92	10.1	1.55
6.1	+0.1	7.2	1.93	9.5	1.63
Mitjana ± SD		7.43 ± 0.21	1.95 ± 0.06	9.9 ± 0.3	1.37 ± 0.03
RSD (%)		2.8	3.1	3.0	2.2
C: pH					
2.9	-0.1	7.1	1.99	10.0	1.54
3	0	7.5	1.92	10.1	1.55
3.1	+0.1	7.3	1.96	8.6	1.48
Mitjana ± SD		7.3 ± 0.2	1.85 ± 0.12	9.6 ± 0.8	1.34 ± 0.07
RSD (%)		2.7	6.5	8.3	5.2
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	8.4	1.96	11.1	1.3
1	0	7.5	1.92	10.1	1.5
1.1	+0.1	7.3	2.13	9.2	1.4
Mitjana ± SD		7.7 ± 0.6	2.00 ± 0.11	10.1 ± 1.0	1.42 ± 0.12
RSD (%)		7.8	5.5	9.9	8.5

4.4.6. Anàlisi de medicaments i mostres d'orina

a) Preparacions farmacèutiques comercials

Es van construir corbes de calibratge utilitzant les dissolucions dels antibiòtics, en vuit concentracions creixents en l'interval 0.05–25 µg/mL tal com s'indica en l'apartat 4.4.5. Es van analitzar deu medicaments comercialitzats en forma de comprimits o càpsules que contenen AMO, AMP, CLO i DIC, la majoria d'aquests prescrits a Espanya (taula 4.4). Per a cada medicament, es van analitzar deu mostres que es van injectar per sextuplicat. Aquestes es van pesar, triturar i homogeneïtzar. Posteriorment es van pesar sis porcions i cadascuna es va sonicar en una xicoteta quantitat d'etanol en un bany d'ultrasons. Es va utilitzar 0.05 M SDS–pH 3 per afavorir l'extracció de les penicil·lines de nou amb ajuda del bany d'ultrasons, i finalment es va diluir amb la mateixa. Els excipients van ser insolubles en el medi micel·lar, per tant, les dissolucions de les mostres es van filtrar abans de la seua injecció en el sistema cromatogràfic, evitant d'aquesta manera que interferiren en l'anàlisi. La taula 4.4 proporciona els valors declarats pels fabricants, així com l'exactitud i precisió aconseguides. Els valors trobats van estar al voltant del 102.2% del contingut declarat. Es va obtenir una excel·lent exactitud (0.4–5.2%) i precisió (0.1–2.4%) en totes les preparacions farmacèutiques, mentre que els resultats van estar d'acord amb el contingut declarat pels fabricants.

Taula 4.4. Anàlisi de preparacions farmacèutiques que contenen penicil·lines (n = 6).

Medicament (fabricant)	Composició (mg)	Trobat (mg)	Percentatge del valor declarat (%)	Er (%)	RSD (%)
Amoxicil·lina Normon (Laboratoris Normon, Madrid)	AMO (875), excipients (comprimít)	878.4 ± 0.6	100.4	0.4	0.1
Amoxicil·lina Ratiopharm (Ratiopharm Espanya, Madrid)	AMO (750), excipients (comprimít)	786.4 ± 2.2	104.9	4.9	0.3
Amoxicil·lina Cinfa (Laboratoris Cinfa, Pamplona)	AMO (500), excipients (càpsula)	517.5 ± 0.9	103.5	3.5	0.2
Amoxicil·lina Ardine (Lab. Reig Jofré, Barcelona)	AMO (500), excipients (càpsula)	496 ± 3	99.2	0.8	0.6
Amoxicil·lina Sandoz (Sandoz farmacèutica, Barcelona)	AMO (500), excipients (comprimít)	516.3 ± 1.1	103.3	3.3	0.2

Taula 4.4. (continuació)

Medicament (fabricant)	Composició (mg)	Trobat (mg)	Percentatge del valor declarat (%)	Er (%)	RSD (%)
Ampicil·lina Britapen (Lab. Reig Jofré)	AMP (500), excipients (càpsula)	526 ± 11	105.2	5.2	2.1
Ampicil·lina Gobemicina (Laboratoris Norrmon)	AMP (500), excipients (càpsula)	512 ± 9	102.4	2.4	1.8
Cloxacil·lina Anaclosil (Lab. Reig Jofré)	CLO (500), excipients (càpsula)	505 ± 9	101	1.0	1.8
Cloxacil·lina Orbenin (GlaxoSmithKline, Madrid)	CLO (500), excipients (càpsula)	508 ± 12	101.6	1.5	2.4
Pathocil (Sandoz Inc., EUA)	DIC (250), excipients (comprimít)	251.4 ± 1.6	100.6	0.6	0.6

b) Mostres reals d'orina

Es van dur a terme estudis farmacocinètics per demostrar la utilitat del procediment desenvolupat per mitjà del seguiment de l'excreció urinària de diversos voluntaris sans a qui es van administrar una dosi oral única dels següents antibiòtics: 875 mg d'AMO (comprimet), 500 mg d'AMP (càpsula), i 500 mg de CLO (càpsula). Es va recollir una mostra just abans de l'administració dels antibiòtics per ser utilitzada com a blanc. A més, es van recollir altres mostres d'orina a intervals de temps apropiats postdosi durant 14 hores (10 vegades al llarg del dia), mesurant-se el volum i conservant-se a 4 °C fins a la seua anàlisi. Aquestes es van diluir en un factor 1:50, i es van injectar directament en el sistema cromatogràfic sense cap tractament previ, excepte la filtració. En la figura 4.5 s'han representat les quantitats mesurades durant l'excreció urinària d'AMO, AMP, i CLO, trobant-se la seua concentració màxima a les 4 h, 6 h i 0.5 h, respectivament, després de la seua administració oral. La quantitat total d'AMO, AMP i CLO excretada al cap de 6 hores de la seua ingestió va ser de 500 mg, 194 mg i 202 mg, respectivament, és a dir, un 57%, 39% i 40% de la dosi administrada, resultats que concorden amb la informació trobada en la bibliografia [3]. Les figures 4.6 i 4.7 mostren els cromatogrames d'AMP i CLO, respectivament, excretades en orina 2 h i 12 h després de la seua administració oral. En cap cas es van observar pics que pogueren assignar-se a metabòlits dels antibiòtics. Aquestos resultats mostren que els estudis d'excreció urinària poden dur-se a terme en les condicions cromatogràfiques proposades.

Encara que l'administració d'una mescla d'antibiòtics no és usual, pot ser avantatjosa l'ús de les mateixes condicions experimentals per determinar diversos antibiòtics. Això permetria efectuar l'anàlisi de les mostres d'individus que hagueren ingerit diferents antibiòtics, sense necessitat de canviar la composició de la fase mòbil.

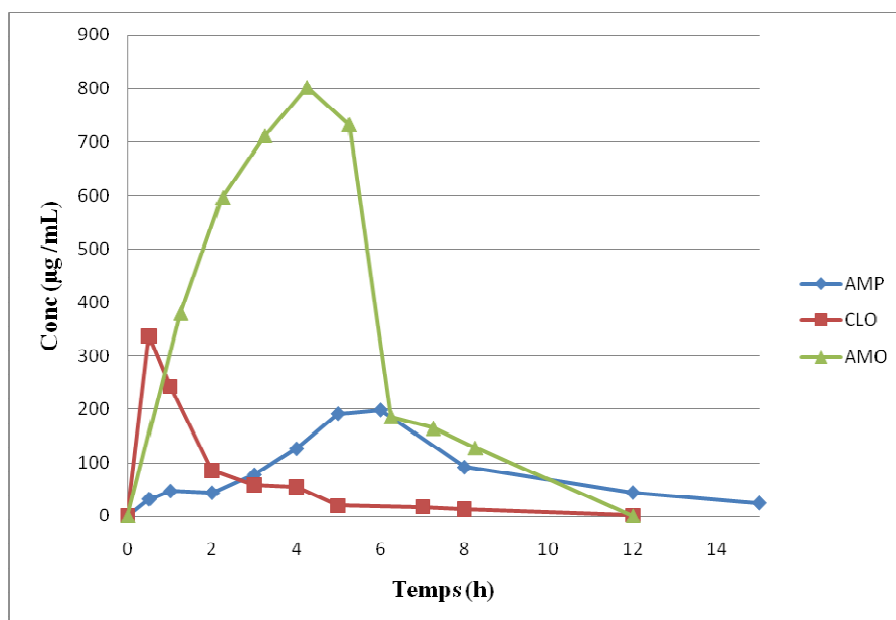


Figura 4.5. Estudi de l'excreció urinària d'algunes penicil·lines després de la seua administració oral a voluntaris sans: AMO (▲), AMP (◆) i CLO (■).

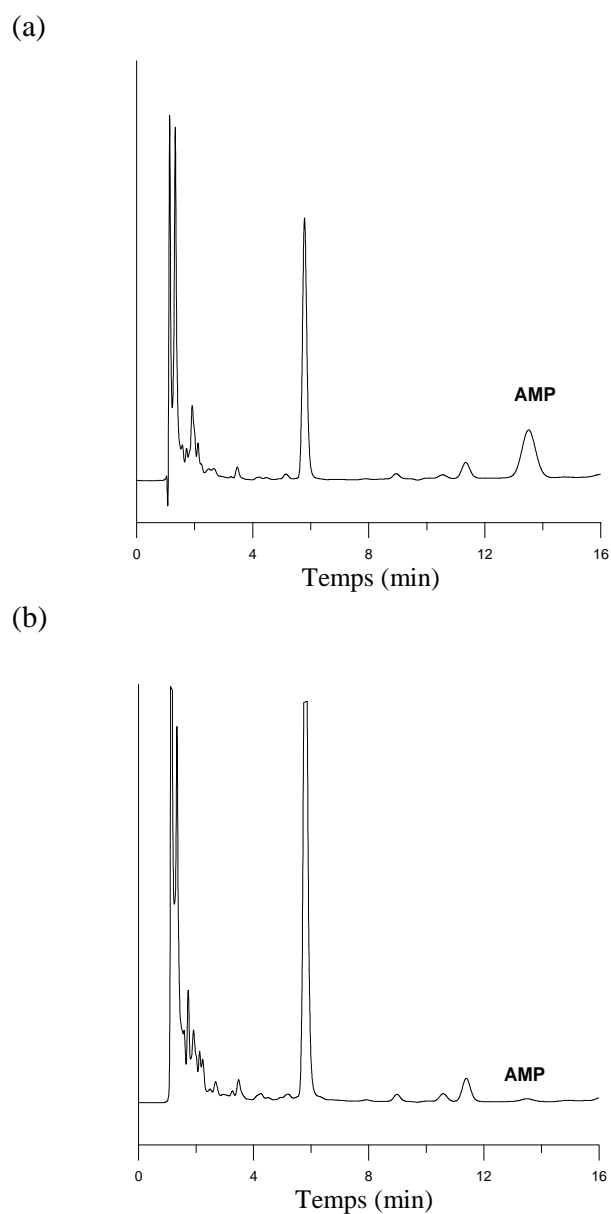
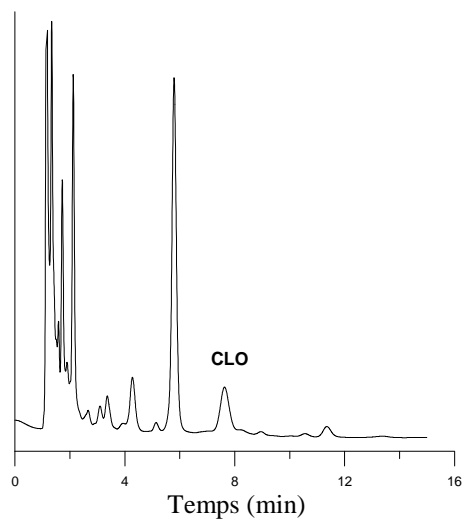


Figura 4.6. Cromatogrames d'una mostra d'orina recollida: 2 h després de la ingestió d'una dosi oral de 500 mg d'ampicil·lina (AMP) (a), i 12 h després de la seua administració (b). Totes les mostres van ser diluïdes en un factor 1:50 amb 0.05 M SDS–pH 3. Fase mòbil: 0.11 M SDS–6% propanol–pH 3.

(a)



(b)

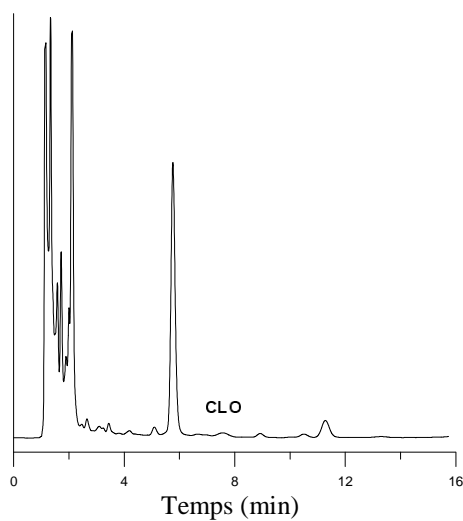


Figura 4.7. Cromatogrames d'una mostra d'orina recollida: 2 h després de la ingestió d'una dosi oral de 500 mg de cloxacil·lina (CLO) (a), i 12 h després de la seua administració (b). Totes les mostres van ser diluïdes en un factor 1:50 amb 0.05 M SDS-pH 3. Fase mòbil: 0.11 M SDS-6% propanol-pH 3.

4.5. Conclusions

Els resultats indiquen que el procediment d'MLC descrit en aquest capítol pot ser utilitzat per a la determinació d'una mescla d'amoxicil·lina, ampil·lina, cloxacil·lina i dicloxacil·lina, amb un temps d'anàlisi inferior a 16 minuts. El mètode és prou sensible per al control rutinari de les penicil·lines als nivells urinaris terapèutics habituals. Els límits de detecció van ser semblants als indicats en la bibliografia, tenint en compte que la mostra d'orina s'injecta directament en el sistema cromatogràfic sense cap tractament previ per separar o preconcentrar els analits, evitant així les tedioses extraccions i les possibles pèrdues de mostres. La validació es va realitzar de forma eficient seguint la guia *Food and Drug Administration*, obtenint-se resultats satisfactoris per als paràmetres següents: selectivitat, linealitat, exactitud, precisió, recuperació i robustesa. Aquest procediment pot utilitzar-se també en estudis de tipus farmacocinètic.

D'altra banda, també es van analitzar medicaments que contenien alguna de les penicil·lines obtenint-se valors pròxims al 100% del contingut declarat pel fabricant. Els resultats mostren que el mètode desenvolupat és prou sensible per ser aplicat en les anàlisis rutinàries d'aquests antibiòtics tant en mostres fisiològiques com en preparacions farmacèutiques.

4.6. Referències

1. J.G. Hardman, L.E. Limbird, A.G. Gilman, Goodman and Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics, 10a ed., McGraw-Hill, Nova York, EUA, 2001.
2. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, EUA, 1988.
3. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, Londres, Regne Unit, 2004.
4. P.O. Erah, D.A. Barrett, P.N. Shaw, *J. Chromatogr. B* 705 (1998) 63.
5. D. Mainz, K. Borner, P. Koepe, J. Kotwas, H. Lode, *J. Antimicrob. Chemother.* 50 (2002) 599.
6. M.A. Korany, M.H. Abdel-Hay, M.M. Bedair, A.A. Gazy, *Talanta* 36 (1989) 1253.
7. H. Liu, H. Wang, V.B. Sunderland, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 395.
8. M. Douša, R. Hosmanová, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 373.
9. E. Benito Peña, J.L. Urraca, M.C. Moreno Bondi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 289.
10. H.J. Mascher, C. Kikuta, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 221.
11. W.A. Moats, R.D. Romanowski, *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 237.
12. V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1550.
13. M.I. Bailón Pérez, A.M. García Campaña, M. del Olmo Iruela, L. Gámiz Gracia, C. Cruces Blanco, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8355.
14. L.K. Sorensen, L.K. Snor, T. Elkaer, H. Hansen. *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 307.
15. I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 46.
16. V.F. Samanidou, D.E. Giannakis, A. Papadaki, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1302.

17. D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 406.
18. R. Fernández Torres, M. Olías Consentino, M.A. Bello López, M. Callejón Mochon, *Talanta* 81 (2010) 871.
19. S. Riediker, A. Rytz, R.H. Stadler, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 359.
20. S. Ghidini, E. Zanardi, G. Varisco, R. Chizzolini, *Food Addit. Cont.* 20 (2003) 528.
21. C. Kukulamude, A. Santalad, S. Boonchiangma, R. Burakham, S. Srijaranai, O. Chailapakul, *Talanta* 81 (2010) 486.
22. E. Verdon, R. Fuselier, D. Hurtaud-Pessel, P. Couëdor, N. Cadieu, M. Laurentine, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 135.
23. B.C. McWhinney, S.C. Wallis, T. Hillister, J.A. Roberts, J. Lipman, J.P.J. Ungerer, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2039.
24. S. Lihl, A. Rehorek, M. Petz, *J. Chromatogr. A* 729 (1996) 229.
25. V.F. Samanidou, S.A. Nisyriou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3193.
26. M. Marchetti, I. Schwaiger, E.R. Schmid, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 64.
27. O. Alderete, D.F. González Esquivel, L. Misael Del Rivero, N. Castro Torres, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 353.
28. S. Joshi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 795.
29. V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1879.
30. A. Marzo, L. Dal Bo, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 17.
31. V.F. Samanidou, S.A. Nisyriou, I.N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 1145.
32. G. Balizs, A. Hewitt, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 105.
33. W.F. Smyth, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 1.

34. S. Carda Broch, M.T. Gil Agustí, M. Rambla Alegre, L. Monferrer Pons, J.S. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 254.
35. J. Esteve Romero, E. Ochoa Aranda, D. Bose, M. Rambla Alegre, J. Peris Vicente, A. Martinavarro Domínguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1557.
36. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, D. Bose, *Trac-Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
37. U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration, Guidance for Ind. Bioanal. Method Validation, 2001. (www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf)
38. J.R. Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
39. A. P. Kondrat'eva, V. P. Bruns, *Pharm. Chem. J.* 1 (1967) 696.
40. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
41. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.

Capítol 5

Validació d'un mètode de cromatografia líquida micel·lar per a la determinació de quinolones en mostres d'orina mitjançant injecció directa i detecció fluorimètrica

5.1. Resum

Es mostra l'aplicació d'un mètode cromatogràfic d'injecció directa amb detecció fluorimètrica per a la identificació i quantificació rutinària de cinc quinolones (ciprofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina i ofloxacina) sense realitzar cap etapa de pretractament de la mostra. En el procediment proposat s'utilitza una columna C18 i fases mòbils micel·lars de dodecilsulfat sòdic (SDS), 1-propanol, trietilamina (TEA) i tampó fosfat a pH 3. En aquest estudi, no va ser possible la separació simultània dels cinc compostos amb una única fase mòbil, per la qual cosa aquests es van dividir en dos grups que van ser eluïts en dues fases mòbils: amb una fase mòbil (a) 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA es van separar ciprofloxacina i levofloxacina ($\lambda_{exc} = 285 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 465 \text{ nm}$), i amb la fase mòbil (b) 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA es van separar lomefloxacina, ofloxacina i moxifloxacina ($\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$). El mètode desenvolupat va ser validat seguint la guia *Food and Drug Administration*. El límit de quantificació va ser d'1 ng/mL per a totes les quinolones, mentre que l'exactitud (E_r , %) i la precisió (RSD, %) dels assajos interdia van ser inferiors a 2.4 % i 6.0%, respectivament. Els estudis farmacocinètics d'excreció urinària realitzats a quatre de les quinolones van indicar que és possible la seua detecció almenys fins a 24 h després de la seua ingestió, on no es va observar cap interferència dels metabòlits. Aquest procediment permet la mesura ràpida i reproductible de nivells baixos de les quinolones en mostres d'orina.

5.2. Introducció

Les quinolones es troben entre els agents antibacterians més importants utilitzats en medicina. Són actives enfront d'un gran nombre de gèrmens, entre els que es troben els bacteris grampositius i gramnegatius, mitjançant la inhibició de la seua ADN-girasa [1]. S'utilitzen principalment en el tractament de malalties humanes i veterinàries, i són també molt útils en la prevenció de malalties dels animals [2, 3]. Hi ha una preocupació a causa de la possibilitat d'exposició a baixos nivells d'aquests compostos que poden donar lloc al desenvolupament de resistència dels patògens humans als antibiòtics [4, 5].

S'han desenvolupat diversos procediments cromatogràfics per a la determinació d'aquests compostos. La cromatografia líquida d'alta resolució (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) s'ha convertit en una eina important per a l'anàlisi de rutina de les quinolones [6]. Recentment s'han publicat diversos treballs en què es determinen diferents quinolones mitjançant HPLC i detecció UV i/o fluorescent en fluids biològics [7–11], aliments [12–14] i medi ambient [15, 16]. També s'han analitzat fluoroquinolones d'última generació, com la moxifloxacina [17]. La cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses per ionització d'electrosprai (*liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*, LC-ESI-MS) s'ha utilitzat per a l'anàlisi de quinolones en orina [18] i aliments [19, 20]. Generalment, és una tècnica ràpida, però requereix un equip complex i econòmicament costós, així com un procediment laboriós de preparació de la mostra. Recentment, s'han desenvolupat mètodes que fan ús de la tècnica d'electroforesi capil·lar zonal (*capillary zone electrophoresis*, CZE) per a l'anàlisi de quinolones en mostres biològiques i mediambientals [21, 22].

Els medis micel·lars han de considerar-se com una alternativa real als mètodes convencionals d'HPLC, que utilitzen mescles aquo-orgàniques per a la separació de compostos en un ampli interval de polaritats. En la cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC), a més de la formació de micel·les en la fase mòbil, la fase estacionària queda recoberta per una capa de monòmers de tensioactiu que protegeix a la sílice alquilenllaçada subjacent, modificant les seues propietats. La varietat d'interaccions que s'estableixen entre els soluts, la fase aquosa, les micel·les i la fase estacionària confereix una gran versatilitat a aquesta tècnica. D'altra banda, l'MLC proporciona una solució simple al problema de la injecció directa de fluids fisiològics, gracies a l'habilitat solubilitzant de les micel·les que permet la determinació d'analits en aquest tipus de matrius, sense necessitat de realitzar una extracció prèvia [23, 24], la qual cosa simplifica i accelera els procediments analítics. Les proteïnes se solubilitzen en el medi micel·lar i elueixen amb el front del dissolvent en compte de precipitar en la columna. A més, l'MLC ha demostrat ser una tècnica útil en l'anàlisi de mostres d'orina [25–28].

En aquest capítol s'aplica un procediment cromatogràfic ràpid, sensible i selectiu que fa ús de fases mòbils micel·lars, per determinar la ciprofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, ofloxacina, i moxifloxacina (figura 5.1) en orina mitjançant injecció directa utilitzant dues condicions analítiques diferents. El mètode ha sigut validat seguint la guia *Food and Drug Administration* [29]. El procediment desenvolupat també pot ser d'utilitat en l'àrea de control de qualitat, anàlisi de rutina i estudis farmacocinètics.

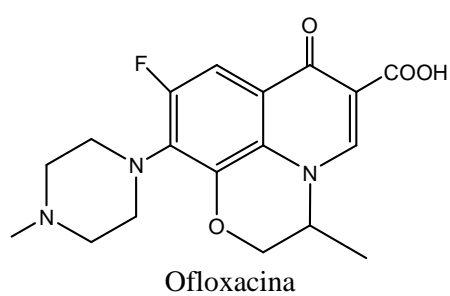
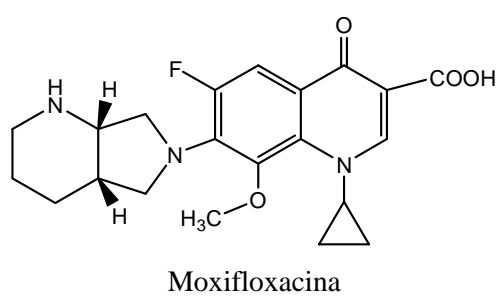
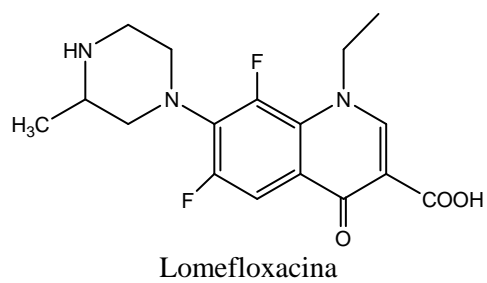
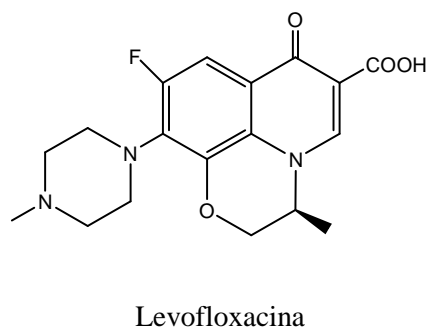
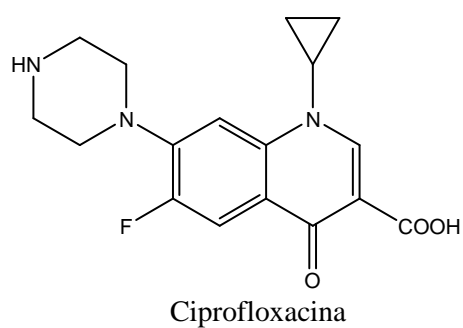


Figura 5.1. Estructures de les quinolones estudiades.

5.3. Part experimental

5.3.1. *Reactius*

Es va examinar el comportament cromatogràfic de les següents quinolones: ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), lomefloxacina (LOM), ofloxacina (OFL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), i moxifloxacina (MOX) (Bayer, Leverkusen, Alemanya). Les fases mòbils es van preparar amb dodecilsulfat sòdic (SDS) (Merck, Darmstadt, Alemanya), 1-propanol o 1-butanol (Scharlab, Barcelona) i trietilamina (TEA) (J.T. Baker, Deventer, Països Baixos). El pH es va tamponar a 3.0 amb dihidrogenfosfat de sodi 0.01 M (Scharlab) i addició d'HCl (J.T. Baker). En totes les dissolucions es va utilitzar aigua destil·lada desionitzada (Millipore S.A.S., Molsheim, França).

5.3.2. *Instrumentació i condicions cromatogràfiques*

Es va utilitzar el mateix cromatògraf d'Agilent Technologies descrit en els capítols anteriors. També van coincidir els paràmetres instrumentals (flux, volum d'injecció i temperatura). La separació analítica es va dur a terme en una columna de fase inversa Kromasil C18 (150 mm × 4.6 mm de diàmetre intern i 5 µm de grandària de partícula) (Scharlab). Es van emprar dues fases mòbils per analitzar les quinolones: (a) 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA per separar CIP i LEV, i (b) 0.05 SDS M–12.5% propanol–0.5% TEA per separar LOM, OFL i MOX. Els temps de retenció van ser inferiors a 10 min i 22 min, respectivament.

Es va realitzar la monitorització de la separació cromatogràfica amb un detector fluorimètric (model G1321A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) a una longitud d'ona d'excitació (nm) i d'emissió (nm): 285/485 per al primer grup de quinolones i 295/485 per al segon, respectivament. La freqüència de tir del llum de xenó va ser de 220 Hz, i el temps de resposta, 4000 ms. El guany del tub fotomultiplicador va ser aproximadament de 2^{10} . Les dimensions de les esclatxes van ser de 2 mm × 2 mm abans

de la cel·la de flux, 4 mm × 4 mm després de la cel·la, i 4 mm × 4 mm abans del tub fotomultiplicador. Els senyals analítics es van adquirir mitjançant un PC connectat al cromatògraf a través d'una estació de dades d'Agilent (Rev. B.03.01). El programari *Michrom* [30] es va emprar per al tractament de les dades cromatogràfiques i en els estudis d'optimització.

Es va usar un potenciòmetre GLP 22 (Crison, Barcelona) equipat amb un elèctrode combinat d'Ag/AgCl/vidre per a les mesures de pH, a més d'una balança analítica Mettler-Toledo AX105 delta-range (Greifensee, Suïssa).

5.3.3. Preparació de dissolucions estàndard, mostres i fases mòbils

Es van preparar dissolucions patró de 10 µg/mL per a les cinc quinolones, dissolent cada patró en uns pocs mil·lilitres d'etanol amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons i llavors, es va aforar amb una dissolució 0.05 M SDS–pH 3. Per a l'anàlisi de quinolones en orina, aquestes es van dividir en dos grups: CIP i LEV d'una banda, i LOM, MOX, i OFL d'una altra. Les dissolucions patró en orina per a cada grup de quinolones, que també contenien 10 µg/mL, van ser preparades diàriament a partir d'1 mL de mostra d'orina, que es va diluir en un factor d'1:25 amb 0.05 M SDS–pH 3. Les mostres d'orina es van recollir en dispositius de recollida d'orina (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Regne Unit). L'estudi farmacocinètic de les mostres d'orina es van realitzar diluint aquestes amb 0.05 M SDS–pH 3 en diferents factors de dilució. Totes les dissolucions es van filtrar a través de membranes de niló 0.45 µm (Micron Separations, Westboro, MA, EUA) abans de l'anàlisi.

Les fases mòbils micel·lars es van preparar dissolent SDS en aigua. A continuació, es va afegir una xicoteta quantitat (0.5%) de TEA per millorar l'eficàcia dels pics cromatogràfics i es va tamponar a pH 3 amb dihidrogenfosfat sòdic 0.01 M i addició d'àcid clorhídric 0.1 M. Finalment, es va afegir propanol fins aconseguir la seua concentració desitjada, i es va aforar amb aigua.

5.4. Resultats i discussió

5.4.1. Fluorescència de les quinolones

Es van obtenir els espectres d'excitació i d'emissió de les quinolones en dissolucions d'SDS tamponades a pH 3, trobant-se els màxims d'excitació i emissió a 287 ± 10 nm i 470 ± 30 nm, respectivament. Les longituds d'ona d'excitació (nm) i d'emissió (nm) per a cada quinolona van ser: 277/440 per a CIP, 277/490 per a LEV, 290/449 per a LOM, 295/492 per a OFL i 297/493 per a MOX. Finalment, les longituds d'ona seleccionades per a la detecció van ser $\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 465$ nm per a CIP i LEV, i $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 485$ nm per a LOM, OFL i MOX.

5.4.2. Estratègia d'optimització i selecció de la fase mòbil

És important conèixer les constants de dissociació de les quinolones ja que defineixen el seu grau d'ionització a qualsevol valor de pH. La presència del grup carboxílic en la posició 3 determina que les quinolones tinguen caràcter àcid, mentre que la introducció de grups piperazinil en la posició 7, incorpora grups amino, els quals són bàsics. Com a conseqüència, en dissolució aquosa i en termes àcid-base, les quinolones amb grups 7-piperazinil presenten espècies catióniques, zwitteriòniques i aniòniques, mentre que la resta de quinolones només poden ser neutres o aniòniques. Les quinolones estudiades en aquest capítol posseeixen un grup 7-piperazinil en la seua estructura (figura 5.1), i per tant existiran en la seua forma catiónica en medi àcid, en la seua forma aniònica en medi bàsic i en la seua forma zwitteriònica en medi neutre. Els equilibris àcid-base per a aquest tipus de quinolones en l'interval fisiològic de pH es mostren en la figura 5.2. Els valors referenciats de les constants de dissociació oscil·len entre $pK_{a1} \approx 5.5-6.6$, i $pK_{a2} \approx 7.2-8.9$ [31].

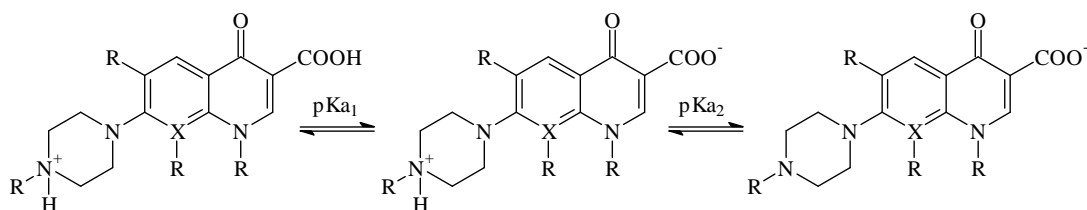


Figura 5.2. Equilibri àcid-base de les quinolones.

En els medis micel·lars, els valors de les constants de dissociació es modifiquen respecte als obtinguts en aigua pura. Diversos estudis han mostrat com aquests valors canvien per a alguns compostos en presència de determinats tensioactius catiònics, aniònics i no iònics [32]. La variació del pH de la fase mòbil contribueix a la capacitat de separació d'aquells compostos que presenten unes constants de dissociació amb valors intermedis. Les micel·les del tensioactiu aniònic incrementen l'estabilitat de les formes protonades dels compostos i, conseqüentment, les seues constants de protonació.

Malgrat que les constants de dissociació per a les quinolones estudiades s'incrementen en dissolució micel·lar, en medi neutre ha de predominar la seua forma zwitteriònica. Per tant, en aquest medi, la seua retenció ha de disminuir a causa de la repulsió amb els caps carregats negativament del tensioactiu monomèric adsorbit sobre la fase estacionària i els grups silanol lliures. La retenció en una fase mòbil àcida serà major a causa, probablement, de què les espècies catióniques predominants són atretes preferentment cap a la fase estacionària modificada pel tensioactiu aniònic, i no cap a les micel·les. Això es va constatar experimentalment atès que la retenció de les cinc quinolones va disminuir quan es va augmentar el pH de la fase mòbil, eluint en el temps mort a pH 7. La millor resolució, juntament amb uns adequats temps de retenció, per a les cinc quinolones es va obtenir a pH 3, per la qual cosa aquest es va seleccionar per realitzar les següents experiències. D'aquesta manera es va obtenir un millor control de la força eluent.

D'altra banda, es van dur a terme diversos estudis per seleccionar els paràmetres òptims d'anàlisi. Els temps de retenció de les quinolones van ser massa elevats en fases mòbils que només contenien SDS, i per això, es va afegir un dissolvent orgànic per incrementar la força d'elució. Es va comparar l'efecte que produïen sobre la retenció de les quinolones els alcohols 1-propanol i 1-butanol. L'ús de propanol va millorar les eficàcies dels pics cromatogràfics respecte a l'ús del butanol, però els temps de retenció van ser més elevats. Tanmateix, quan es va injectar orina addicionada amb les quinolones en fases mòbils que contenien butanol, els seus pics no es van separar de la banda de proteïnes, i per tant, es va preferir l'ús de propanol en l'etapa d'optimització de la separació dels antibiòtics.

Freqüentment, s'afegeix trietilamina (TEA) a les fases mòbils aquo-orgàniques convencionals tamponades a valors baixos de pH (2.5–4.0) per reduir les cues dels pics cromatogràfics de compostos bàsics i millorar l'eficàcia. No obstant això, en presència d'una amina, els temps de retenció es modifiquen. En aquest cas, la retenció va disminuir per a tots els antibiòtics. Així, es va considerar, la idoneïtat de l'addició de TEA en el procés d'optimització, afegint un 0.5% de l'amina en les fases mòbils. Aquesta concentració va proporcionar tant eficàcies adequades com temps de retenció adequats per a l'anàlisi dels antibiòtics en mostres d'orina.

Es van estudiar dues estratègies distintes per obtenir les condicions cromatogràfiques més adequades. En primer lloc, es va investigar la possibilitat d'utilitzar una única fase mòbil per analitzar mescules de les cinc quinolones. Tanmateix, l'elució simultània dels cinc antibiòtics amb la mateixa fase mòbil no va ser possible a causa d'un solapament entre CIP, LOM i MOX, d'una banda, i LEV i OFL d'una altra. En segon lloc, es va estudiar l'ús de dues fases mòbils òptimes dividint als antibiòtics en dos grups (CIP i LEV, per una banda i LOM, MOX i OFL, d'una altra), la qual cosa pot ser útil en alguns casos per aconseguir menors temps de retenció i accelerar les anàlisis.

El desenvolupament d'ambdues estratègies es va veure facilitat gràcies a la capacitat de l'MLC de predir la retenció mitjançant l'ús d'equacions senzilles. El model utilitzat per a aquestes prediccions va ser el mateix del capítol anterior (veure equació 4.1), igual que la funció descriptora de la resolució (veure equació 4.2). L'equació de retenció es va ajustar de forma no lineal segons el model de Powell [33], fent ús de les dades de retenció obtingudes a partir d'injeccions dels antibiòtics en cinc fases mòbils que contenen SDS (M) / propanol (% , v/v): 0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.1/7.5, 0.15/2.5 i 0.15/12.5 (totes elles tamponades amb fosfat 0.01 M a pH 3). Els errors d'ajust per a la predicció dels factors de retenció amb l'equació 4.1 van ser inferiors al 3%.

Es va observar el comportament habitual en MLC utilitzant SDS com a tensioactiu: la retenció dels antibiòtics va disminuir en augmentar la concentració d'SDS o propanol. D'altra banda, les eficàcies dels pics cromatogràfics van disminuir quan va augmentar la concentració de tensioactiu, mentre que van augmentar a concentracions més elevades del dissolvent orgànic.

L'optimització de la resolució de mesclades dels antibiòtics, basat en la variació seqüencial de la composició de la fase mòbil, no és senzilla. No obstant això, la predicció exacta de la retenció amb ajuda de l'equació 4.1 va permetre aplicar un procediment interpretatiu per predir la resolució òptima. Aquesta estratègia pot ser aplicada mitjançant simulació per ordinador, que imita la metodologia seguida pels cromatografistes experimentats però amb un menor temps i esforç. Així, es va seleccionar la fase mòbil més adequada amb ajuda del programari *Michrom*, tenint en compte que ha d'obtenir-se una màxima resolució en el menor temps d'anàlisi possible [30]. Aquest programari permet l'observació gràfica dels canvis en els cromatogrames quan l'usuari varia progressivament les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic.

Com s'ha indicat, les quinolones es van dividir en dos grups (CIP i LEV, d'una banda, i LOM, MOX i OFL, d'una altra), que es van analitzar en dues fases mòbils diferents. A més, aquestes no presenten ni el mateix màxim d'excitació ni d'emissió. Les fases mòbils i les condicions de detecció utilitzades van ser: (a) 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.0, $\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 465$ nm, per a l'anàlisi de CIP i LEV, i (b) 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.0, $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 485$ nm, per a la determinació de LOM, OFL i MOX. Les figures 5.3b i 5.4b mostren els cromatogrames obtinguts per a ambdós grups d'antibiòtics.

Els paràmetres cromatogràfics (factor de retenció, k ; eficàcia, N ; i factor d'asimetria, B/A) per als compostos del primer grup (CIP i LEV) van ser: 4.6, 1950 i 1.1; i 3.5, 1800 i 1.1, respectivament, i per als del segon grup (LOM, MOX i OFL) van ser: 13.8, 2400 i 1.2; 15.0, 1650 i 1.4; i 11.0, 2400 i 1.2, respectivament.

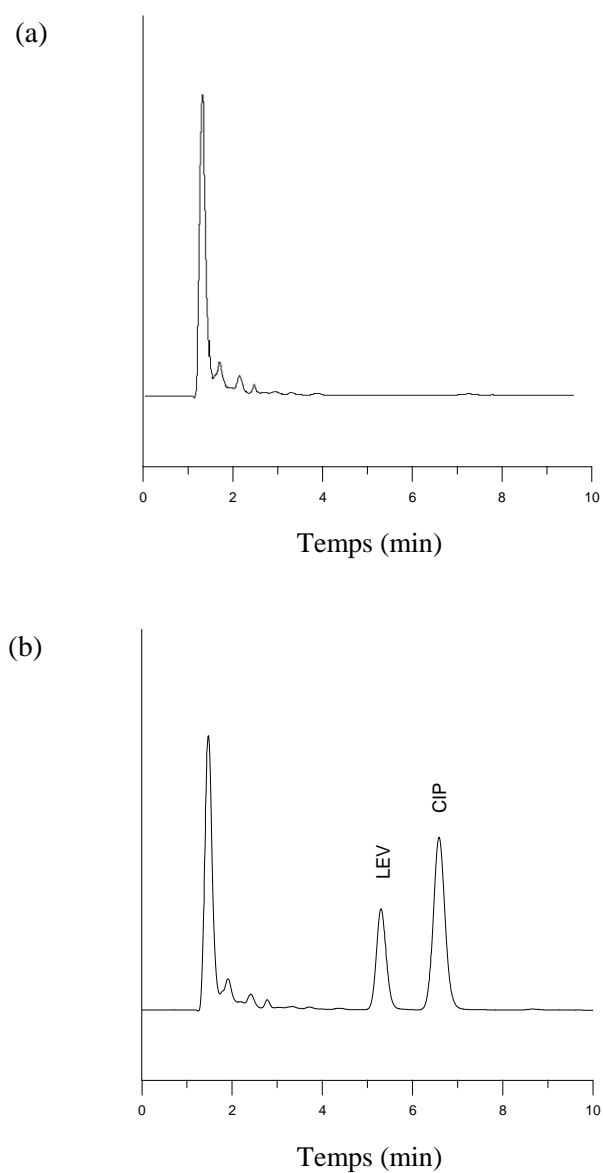


Figura 5.3. Cromatogrames del blanc d'orina (a), i orina addicionada amb LEV i CIP (100 ng/mL) (b). Fase mòbil: 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3. Condicions de detecció: $\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$. Totes les mostres d'orina es van diluir en un factor 1:25 amb una dissolució 0.05 M SDS.

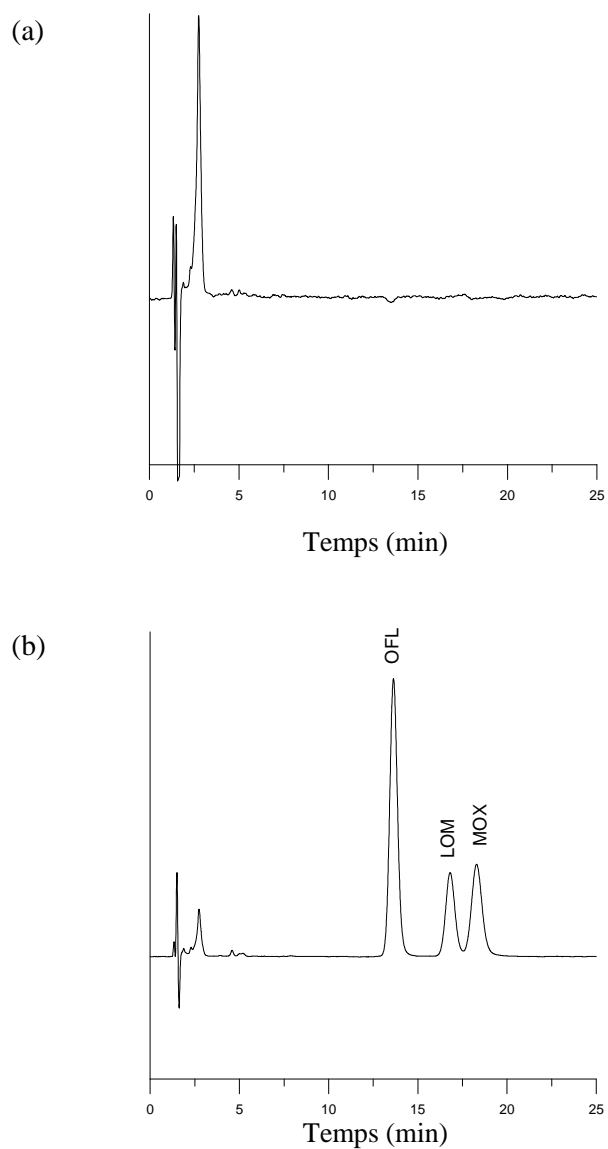


Figura 5.4. Cromatogrames del blanc d'orina (a), i orina addicionada amb OFL, LOM i MOX (500 ng/mL) (b). Fase mòbil: 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3. Condicions de detecció: $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$. Totes les mostres d'orina es van diluir en un factor 1:25 amb una dissolució 0.05 M SDS.

5.4.3. Validació del mètode

La guia de validació seguida va ser la mateixa que s'ha utilitzat en els capítols 3 i 4, *Food and Drug Administration* (FDA) [29]. Els paràmetres avaluats van ser: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, precisió i exactitud, recuperació i robustesa.

a) Selectivitat

A causa de la senzillesa en el tractament de les mostres, l'orina s'utilitza preferentment a altres fluids fisiològics en el control de la ingestió de fàrmacs. Tanmateix, quan es realitza la injecció directa de l'orina en el sistema cromatogràfic, la banda ampla que apareix en el front d'elució dels cromatogrames, i els pics dels compostos endògens que s'obtenen a diversos temps de retenció, poden afectar seriosament la detecció dels fàrmacs més hidrofílics. Si el nivell de concentració del fàrmac analitzat no és excessivament xicotet, és convenient diluir la mostra d'orina abans de la seua injecció, per reduir l'amplada de la banda de les proteïnes.

D'altra banda, la injecció d'un nombre elevat de mostres d'orina pot acurtar la vida de la columna, o forçar una freqüent regeneració de la fase estacionària per evitar una variació significativa en els temps de retenció, a causa de la matriu adsorbida. Per aquest motiu, es va decidir dur a terme les anàlisis després de la dilució de les mostres. La sensibilitat aconseguida va resultar adequada després d'una dilució en un factor 1:25, per a la seua detecció en orina almenys fins a 24 h després de la ingestió dels fàrmacs.

Per determinar el grau en què els compostos endògens poden interferir en la retenció dels fàrmacs, es van injectar directament en el sistema cromatogràfic sis mostres d'orina que no contenien cap dels antibiòtics. No es va trobar cap interferència a causa dels endògens en les matrius fisiològiques estudiades, com s'observa en les figures 5.3a i 5.4a.

b) Linealitat

Per a cada antibiòtic, es van construir corbes de calibratge a partir de les àrees dels pics cromatogràfics en vuit concentracions distintes (sis rèpliques). L'interval de concentració va ser el mateix per a tots els fàrmacs, 1–1000 ng/mL. Les corbes de calibratge es van obtenir per a dissolucions aquoses dels analits i per a mostres d'orina addicionades diluïdes en un factor 1:25, mitjançant el mètode de regressió lineal de mínims quadrats. Els pendents de les corbes en absència i presència d'orina van ser semblants i els coeficients de determinació (R^2) van ser sempre superiors a 0.99996. Amb l'objectiu d'estudiar la variabilitat dels coeficients d'ajust del calibratge, es van obtenir les corbes durant 5 dies en un període de 2 mesos, preparades a partir de diferents sèries de patrons. En la taula 5.1 es mostren les característiques analítiques significatives obtingudes per als cinc antibiòtics.

c) Límits de detecció i de quantificació

Els límits de detecció (LOD) i de quantificació (LOQ) en presència d'orina es van obtenir d'acord amb la guia de validació FDA [29]. El LOD per a les cinc quinolones es va determinar aplicant el criteri $3s$ a partir d'una sèrie de 10 dissolucions que contenien una concentració baixa de cada compost (0.5 ng/mL). Es va seleccionar el LOQ com la concentració més baixa utilitzada en la corba de calibratge (1 ng/mL). Els valors dels LODs per als antibiòtics es mostren en la taula 5.1. Tant els LODs com els LOQs van concordar amb els nivells terapèutics que es troben en orina per a aquests antibiòtics.

Taula 5.1. Característiques analítiques significatives obtingudes en la determinació dels cinc antibiòtics.

Compost	$a \pm SD^a$	$b \pm SD^a$	R^2	LOD (ng/mL) ^b
CIP	0.0101 ± 0.0004	-0.0226 ± 0.0021	0.99997	0.3
LEV	0.0073 ± 0.0005	-0.0055 ± 0.0021	0.99997	0.2
LOM	0.0117 ± 0.0005	-0.0022 ± 0.0022	0.99998	0.4
MOX	0.0060 ± 0.0004	-0.006 ± 0.004	0.99996	0.5
OFL	0.0158 ± 0.0003	-0.006 ± 0.008	0.99998	0.4

^a Paràmetres de calibratge en orina: Àrea = $a C$ (ng/mL) + b ; SD = desviació estàndard ; R^2 = coeficient de determinació.

^b Límit de detecció en orina obtingut a partir de 10 rèpliques dels antibiòtics a una concentració de 0.5 ng/mL (criteri $3s$).

d) Precisió i exactitud

Es va determinar l'exactitud i precisió intra i interdia del mètode mitjançant l'anàlisi de les cinc quinolones adicionades en orina (1:25) en tres concentracions diferents (5, 50 i 500 ng/mL). L'anàlisi intradia es van dur a terme injectant les tres dissolucions sis vegades durant el mateix dia. Les anàlisis interdia es van calcular com la mitjana de sis mesures dels valors intradia obtinguts al llarg de 5 dies en un període de 3 mesos realitzats per diferents analistes i equips. Els resultats, expressats com a error relatiu per a l'exactitud (Er, %) i desviació estàndard relativa per a la precisió (*residual standard deviation*, RSD, %) corresponent a les anàlisis intra i interdia, es mostren en la taula 5.2. S'observa com totes les quinolones poden determinar-se fàcilment als tres nivells de concentració estudiats, i com les recuperacions obtingudes van ser quantificades en tots els casos amb valors d'RSD inferiors a 6.0%. Aquests resultats demostren que el mètode proposat és adequat per a l'anàlisi dels antibiòtics estudiats en mostres d'orina. Així, el procediment desenvolupat pot ser utilitzat en treballs de control de qualitat, anàlisi de rutina i estudis farmacocinètics.

e) Robustesa

Es van injectar per sextuplicat dissolucions de cadascun dels antibiòtics a una concentració de 500 ng/mL en fases mòbils a què se'ls havia realitzat xicotets canvis en els paràmetres cromatogràfics (concentració de tensioactiu, percentatge de propanol, pH, flux, i percentatge de TEA). Les diferències observades en les àrees dels pics o en els temps de retenció van ser insignificants en la majoria dels casos. Els resultats, que es mostren en la taula 5.3, indiquen que els factors seleccionats no es veuen pràcticament afectats per lleugeres variacions en aquests paràmetres. Com calia esperar, la variació sobre el flux és la que exerceix una major influència sobre l'àrea i la retenció dels compostos estudiats, a diferència dels altres paràmetres. Com es va comentar en el capítol 4, això és a causa de l'excessiva variació d'aquest paràmetre respecte al seu valor

nominal (10%), donada la gran influència de tipus cinètic (velocitat amb què es mou el solut en el sistema cromatogràfic) del mateix sobre el comportament cromatogràfic dels compostos. Variacions del mateix orde en altres paràmetres (TEA, SDS) tenen un menor efecte sobre la retenció o l'àrea del pic.

f) Recuperacions

Es van determinar les recuperacions de les quinolones utilitzant mostres d'orina addicionades en un factor de dilució 1:25 amb una dissolució 0.05 M SDS–pH 3. Per a això, s'addiciona l'orina amb quantitats conegudes dels antibiòtics en cinc concentracions diferents (5 a 1000 ng/mL) incloses en l'interval de calibratge, i cadascuna d'elles es va injectar per sextuplicat. Les mostres addicionades es van processar i analitzar amb el procediment desenvolupat. Com en els capítols anteriors, les recuperacions es van calcular comparant la concentració obtinguda en les mostres d'orina addicionada respecte a les quantitats reals addicionades, les quals van ser molt satisfactòries per a les cinc quinolones (96–103%). Les figures 5.3b i 5.4b mostren els cromatogrames obtinguts de dues mostres d'orina addicionades amb els dos grups d'antibiòtics.

Taula 5.2. Exactitud i precisió intra i interdia per a mostres d'orina addicionades amb els antibiòtics.

Analít	Conc. Addic. (ng/mL)	Intradia			Interdia		
		Trobada ^a (ng/mL)	Exactitud (Er, %)	Precisió RSD (%)	Trobada ^b (ng/mL)	Exactitud (Er, %)	Precisió RSD (%)
CIP	5	5.02 ± 0.20	0.4	4.0	4.99 ± 0.06	0.2	1.2
	50	50.3 ± 1.6	0.6	3.2	50.1 ± 0.5	0.2	1.0
	500	498 ± 7	0.4	1.4	509.3 ± 2.1	1.9	0.4
LEV	5	5.01 ± 0.07	0.2	1.4	5.00 ± 0.05	0.0	1.0
	50	50.4 ± 1.1	0.8	2.2	49.8 ± 0.4	0.4	0.8
	500	500 ± 5	0.0	1.0	499 ± 3	0.2	0.6
LOM	5	5.0 ± 0.3	0.0	6.0	5.01 ± 0.04	0.2	0.8
	50	49.3 ± 0.7	1.4	1.4	49.4 ± 0.3	1.2	0.6
	500	496.89 ± 0.13	0.03	0.06	499.5 ± 2.4	0.1	0.5
MOX	5	4.91 ± 0.16	1.8	3.3	5.00 ± 0.12	0.0	2.4
	50	50.1 ± 1.7	0.2	3.4	50.0 ± 0.6	0.0	1.2
	500	497 ± 5	0.6	1.0	497 ± 4	0.6	0.8
OFL	5	5.1 ± 0.3	2.0	5.9	5.04 ± 0.03	0.8	0.6
	50	51.2 ± 0.3	2.4	0.6	50.8 ± 0.4	1.6	0.8
	500	496 ± 5	0.8	1.0	497.8 ± 2.1	0.4	0.4

^a Els valors intradia corresponen a sis injeccions de les mostres.

^b Els valors interdia corresponen a cinc injeccions de les mostres.

Taula 5.3 Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	CIP		LEV	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)					
0.145	-0.005	7.61	4.66	6.02	3.65
0.15	0	6.61	4.10	5.40	3.66
0.155	+0.005	6.28	4.66	5.23	3.12
Mitjana ± SD		6.8±0.7	4.5±0.3	5.6±0.4	3.5±0.3
RSD (%)		10.3	6.7	7.1	8.6
B: Propanol (% v/v)					
12.4	-0.1	6.74	4.06	5.04	3.32
12.5	0	6.61	4.10	5.40	3.66
12.6	+0.1	6.68	3.57	5.25	3.23
Mitjana ± SD		6.68±0.07	3.9±0.3	5.23±0.18	3.40±0.23
RSD (%)		1.0	7.7	3.4	6.8
C: pH					
2.9	-0.1	6.72	3.58	5.41	3.98
3	0	6.61	4.10	5.40	3.66
3.1	+0.1	7.05	3.39	5.65	3.23
Mitjana ± SD		6.79±0.23	3.7±0.4	5.49±0.14	3.6±0.4
RSD (%)		3.4	10.8	2.6	11.1
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	7.50	3.58	6.04	3.79
1	0	6.61	4.10	5.40	3.66
1.1	+0.1	5.99	3.39	4.83	3.10
Mitjana ± SD		6.7±0.8	3.7±0.4	5.4±0.6	3.5±0.4
RSD (%)		11.9	10.8	11.1	11.4
E: TEA (% v/v)					
0.45	-0.05	6.66	4.54	5.35	3.45
0.5	0	6.61	4.10	5.40	3.66
0.55	+0.05	6.73	4.20	5.38	3.38
Mitjana ± SD		6.67±0.06	4.28±0.23	5.377±0.025	3.50±0.15
RSD (%)		0.9	5.4	0.5	4.3

Taula 5.3 (continuació).

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	LOM		MOX		OFL	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)							
0.045	-0.005	18.16	6.17	20.91	2.90	15.20	8.19
0.05	0	16.80	5.51	18.48	2.75	13.70	7.61
0.055	+0.005	16.70	5.84	17.94	2.64	13.40	7.57
Mitjana ± SD		17.2±0.8	5.8±0.3	19.1±1.6	2.76±0.13	14.1±1.0	7.8±0.3
RSD (%)		4.7	5.2	8.4	4.7	7.1	3.8
B: Propanol (% v/v)							
12.4	-0.1	17.90	5.44	18.72	2.71	16.18	7.34
12.5	0	16.80	5.51	18.48	2.75	13.70	7.61
12.6	+0.1	16.47	5.76	17.53	2.87	13.53	8.32
Mitjana ± SD		17.1±0.7	5.57±0.17	18.2±0.6	2.78±0.08	14.5±1.5	7.8±0.5
RSD (%)		4.1	3.1	3.3	2.9	10.3	6.4
C: pH							
2.9	-0.1	17.93	5.44	19.18	2.76	14.18	7.48
3	0	16.80	5.51	18.48	2.75	13.66	7.61
3.1	+0.1	17.54	5.64	18.71	2.96	13.53	7.84
Media ± SD		17.4±0.6	5.54±0.14	18.8±0.4	2.82±0.12	13.8±0.3	7.64±0.18
RSD (%)		3.4	2.5	2.1	4.3	2.2	2.4
D: Flux (mL/min)							
0.9	-0.1	19.48	6.66	21.08	2.83	15.71	6.85
1	0	16.80	5.51	18.48	2.75	13.70	7.61
1.1	+0.1	15.70	5.71	17.03	2.51	12.67	6.36
Mitjana ± SD		17.3±1.9	6.0±0.6	18.9±2.1	2.70±0.17	14.0±1.5	6.9±0.6
RSD (%)		11.0	10.0	11.1	6.3	10.7	8.7
E: TEA (% v/v)							
0.45	-0.05	18.60	5.88	18.62	2.79	14.60	7.75
0.5	0	16.80	5.51	18.48	2.75	13.70	7.61
0.55	+0.05	16.10	5.79	18.20	2.71	13.60	7.73
Mitjana ± SD		17.2±1.3	5.73±0.19	18.43±0.21	2.75±0.04	14.0±0.6	7.70±0.08
RSD (%)		7.6	3.3	1.1	1.5	4.3	1.0

g) Aplicació del procediment a l'estudi de l'excreció urinària dels antibiòtics

Es va investigar l'excreció urinària de quatre voluntaris sans, a qui es va administrar una dosi oral única en forma de comprimit dels següents antibiòtics: CIP (500 mg), LEV (500 mg), MOX (400 mg), i OFL (200 mg). Es va recollir una mostra d'orina just abans de la ingestió dels fàrmacs, que es va utilitzar com a blanc. Les mostres d'orina es van prendre durant 24 h, a diferents intervals de temps (cada hora durant les tres primeres hores, i després en intervals més espaiats), i es va mesurar el volum excretat. Les mostres es van protegir de la llum i es van refrigerar a 4 °C fins ser analitzades. Aquestes es van diluir en diferents factors amb 0.05 M SDS–pH 3, i es van injectar directament en el sistema cromatogràfic sense cap tractament previ, excepte la filtració. Els factors de dilució van ser: 0.0125:25 per a CIP, 0.025:25 per a LEV, 0.25:25 per a MOX, i 0.025:25 per a OFL.

En la figura 5.5 s'han representat les quantitats mesurades durant l'excreció urinària de CIP, LEV, MOX i OFL, així com les acumulades en 24 h. La concentració màxima excretada per a cada antibiòtic es va trobar als següents temps: 2 h per a CIP, 6 h per a LEV, 1 h per a MOX, i 1 h per a OFL. Les quantitats i percentatges de les dosis excretades de forma inalterada per a cada fàrmac van ser: 290 mg (58%) per a CIP, 448 mg (89%) per a LEV, 92 mg (23%) per a MOX, i 163 mg (82%) per a OFL. Aquests resultats concorden amb la informació trobada en la bibliografia [34], on s'indica que les quinolones estudiades s'excreten de forma inalterada en orina en els següents percentatges: 40–60% per a CIP, 80–85% per a LEV, 20% per a MOX, i 80 % per a OFL. La figura 5.6 mostra els cromatogrames de CIP i LEV, d'una banda, i MOX i OFL, d'una altra, excretats 3 h després de la seua administració oral. Els pics que podrien ser assignats als metabòlits dels antibiòtics o als seus productes de degradació no van interferir en l'anàlisi. Tots els compostos es van poder encara detectar 12 h després de la seua ingestió. Aquests resultats indiquen que els estudis farmacocinètics per als antibiòtics estudiats poden realitzar-se en les condicions cromatogràfiques proposades.

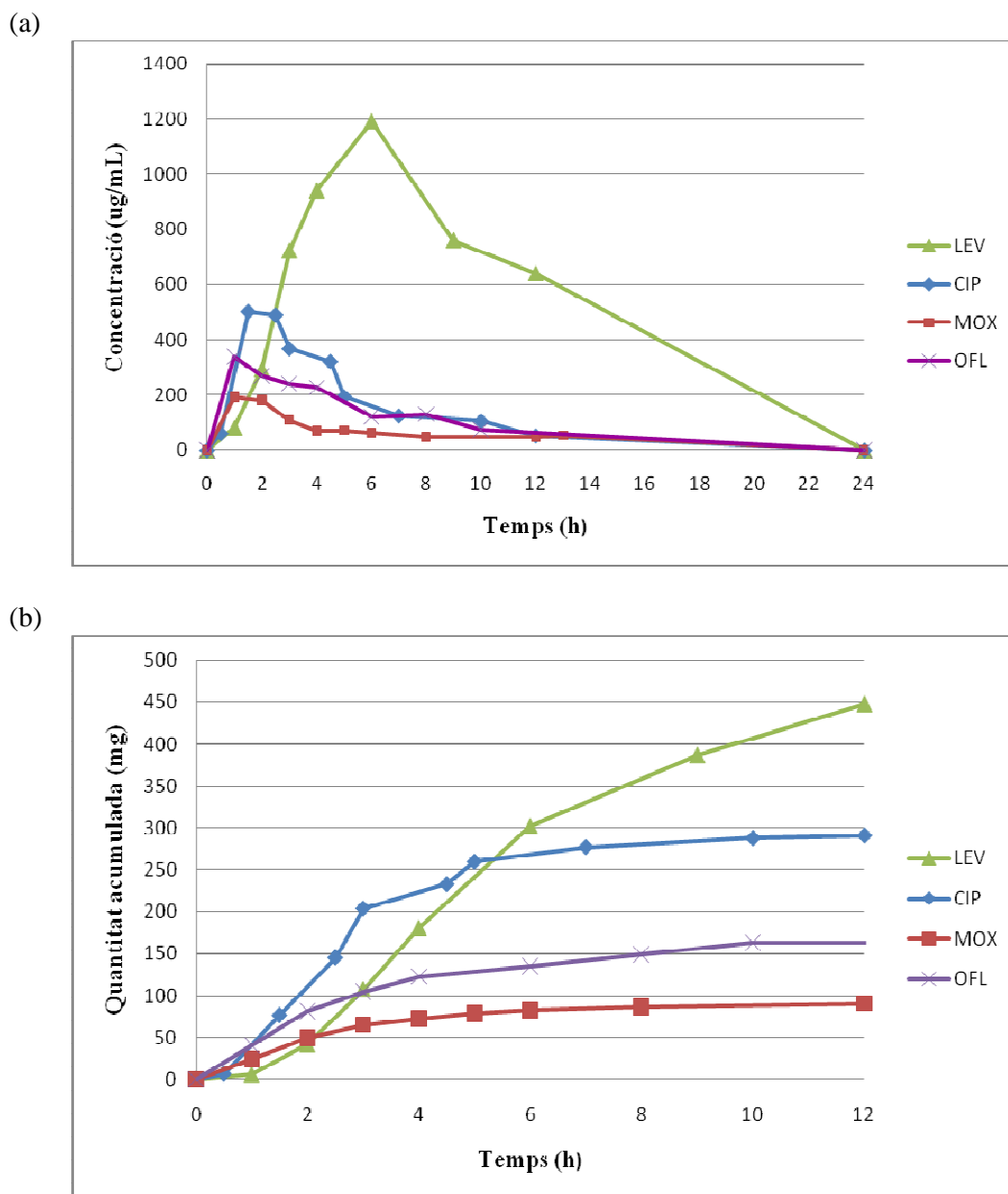


Figura 5.5. Estudi d'excreció urinària de CIP (◆), LEV (▲), MOX (■), i OFL (x) després de la seua administració oral a un voluntari sa (a), i quantitat acumulada (mg) de les fluoroquinolones excretades de forma inalterada en orina (b).

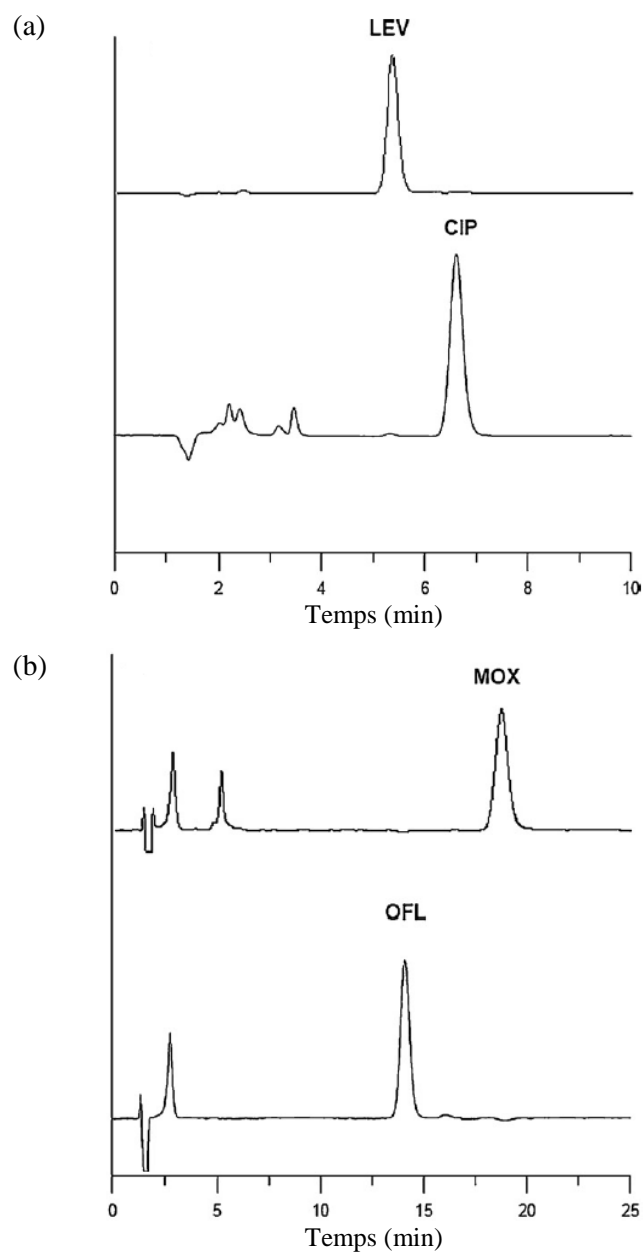


Figura 5.6. Cromatogrames de mostres d'orina de diversos voluntaris, a qui es va administrar diferents antibiòtics. El temps transcorregut després de la seua ingestió i la composició de la fase mòbil va ser: (a) CIP i LEV (3 h, 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3), i (b) MOX i OFL (3 h, 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3).

5.5. Conclusions

El mètode desenvolupat, que ha sigut dissenyat per analitzar un gran nombre de mostres en poc de temps, pot ser utilitzat en processos de monitorització per confirmar i quantificar els antibiòtics estudiats en mostres d'orina. Aquest procediment ofereix bons resultats per a la determinació de quinolones en orina en termes de linealitat, precisió, recuperació i robustesa. No es va observar cap interferència d'altres fàrmacs comunament administrats. El límit de detecció se'n situa en nivells de ng/mL, la qual cosa significa que el procediment proposat és particularment útil en estudis farmacocinètics utilitzant volums xicotets de mostres d'orina.

Aquest mètode presenta una major sensibilitat en comparació amb altres publicats prèviament [10, 18, 21], i el temps d'anàlisi és prou ràpid per ser aplicat en anàlisis de rutina [9, 10, 21,22]. A més, aquest procediment és més senzill que la majoria dels descrits prèviament, que requereixen una extracció prèvia de la mostra i/o l'ús d'un estàndard intern [9, 18, 21]. A més, el present mètode és prou sensible per aplicar-se en anàlisi de rutina de control de qualitat i estudis farmacocinètics d'aquests compostos, si es té en compte que les mostres d'orina es van injectar sense cap tractament previ per separar o preconcentrar els fàrmacs.

5.6. Referències

1. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, EUA, 1988.
2. D. Currie, L. Lynas, D.G. Kennedy, W.J. McCaughey, *Food Addit. Contam.* 15 (1998) 162.
3. Métodos de análisis de residuos de productos farmacéuticos y contaminantes para productos pesqueros de exportación (Programa de laboratorios, Norma Técnica 4), Servei Nacional de Pesca, Departament de Sanitat Pesquera, Xile, 2002.
http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&task=view&id=253&Itemid=761
4. Food Chemical News, vol. 37, no 52, CRC Press, Washington DC, EUA, 1996, p.21.
5. Health and Consumer Protection. European Union Decision 2002/657/EC.
http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm
6. H-W. Sun, F-X Qiao, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 1.
7. I.F. Al-Momani, *Anal. Lett.* 39 (2006) 741.
8. F. Barbato, G. Martino, L. Grumetto, M.I. Rotonda, *Eur. J. Pharm. Sci.* 30 (2007) 211.
9. Z. Vybíralová, M. Nobilis, J. Zoulova, J. Kvetina, P. Petr, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 851.
10. J.L. Vílchez, L. Araujo, A. Prieto, A. Navalón, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 135.
11. F. Cañada Cañada, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1242.
12. V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 531.
13. E.A. Christodoulou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 246.

14. S.-J. Zhao, C. Li, H.Y. Jiang, B.-Y. Li, J.-Z. Shen, *Chin. J. Anal. Chem.* 35 (2007) 786.
15. E. Turiel, A. Martín Esteban, J.L. Tadeo, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 30.
16. M. Seifrtová, A. Pena, C.M. Lino, P. Solich, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 799.
17. S. Tatar-Ulu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 320.
18. O. Ballesteros, I. Toro, V. Saenz Nebot, A. Navalón, J.L. Vílchez, J. Barbosa, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 137.
19. R. Romero González, J.C. López Martínez, E. Gómez Milán, A. Garrido French, J.L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 142.
20. M.P. Hermo, E. Nemutlu, S. Kir, D. Barrón, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 98.
21. M. Ferdig, A. Kaleta, T.D.T. Vo, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 305.
22. S. Wei, J. Lin, H. Li, J.M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 333.
23. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
24. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
25. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, D. Bose, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
26. S. Carda Broch, M.T. Gil Agustí, M. Rambla Alegre, L. Monferrer Pons, J.S. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 254.
27. M. Rambla Alegre, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 250.
28. M. Rambla Alegre, M.T. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero, *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 89.

29. Guidance for Industry. Bioanalytical, Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Maig 2001. Rockville, MD, EUA.
30. J.R. Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
31. A. Hernández Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 1.
32. P.V. Jaiswal, V.S. Ijeri, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 46 (2005) 45.
33. S.S. Rao, Optimization: Theory and applications, Wiley, Nova Delhi, India, 1985.
34. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, Londres, Regne Unit, 2004.

Capítol 6

Separació i determinació simultània de quinolones en medicaments mitjançant cromatografia líquida micel·lar

6.1. Resum

En aquest sisè capítol, es descriu un procediment cromatogràfic ràpid i simple que utilitza fases mòbils micel·lars per a la separació i determinació de quatre quinolones (àcid pipemídic, levofloxacina, moxifloxacina i norfloxacina) en medicaments. No va ser necessària cap etapa prèvia de pretractament de la mostra. La resolució de la mescla d'antibiòtics es va aconseguir mitjançant l'aplicació d'un mètode quimiomètric, en què en una primera etapa es modelitza la retenció a partir dels factors de retenció obtinguts en tan sols cinc fases mòbils. A continuació, es va aplicar un criteri d'optimització que té en compte la posició i la forma dels pics cromatogràfics. La separació cromatogràfica es va dur a terme amb una columna C18 utilitzant una fase mòbil micel·lar de 0.15 M dodecilsulfat sòdic, 2.5% propanol, i 0.5% trietilamina a pH 3, amb un temps d'anàlisi inferior a 12 min, fent ús d'un detector de fila de díodes UV-vis a una longitud d'ona de 276 nm. Els límits de detecció i quantificació van estar en els intervals 8–56 i 28–171 ng/mL, respectivament. El mètode ací descrit ha sigut validat seguint la guia *International Conference on Harmonisation* en termes d'exactitud i precisió intra i interdia, i robustesa. Els calibratges van ser lineals ($R^2 > 0.9997$) en l'interval de concentracions entre 0.1–50 µg/mL. Els valors trobats en l'anàlisi de diferents medicaments van estar en l'interval 96–106% del contingut declarat pel fabricant. Els resultats mostren que aquest procediment és apropiat per a l'anàlisi rutinària de les quinolones estudiades en preparacions farmacèutiques.

6.2. Introducció

Les quinolones i fluoroquinolones són antibiòtics sintètics l'acció dels quals es basa en la seua activitat antiADN. Des del descobriment de l'àcid nalidíxic [1], s'han realitzat una sèrie de modificacions estructurals en el nucli de les quinolones per augmentar l'activitat antimicrobiana i millorar el rendiment farmacocinètic d'aquests fàrmacs. Les quinolones representen una classe d'antibiòtics homogènia des del punt de vista químic. Encara que no tenen una estructura química bàsica idèntica, sí que comparteixen un esquelet tipus que és l'anell 4-oxo-1,4-dihidroquinolona. Les diferències estructurals entre les distintes quinolones radiquen tant en el nombre i posició dels àtoms de nitrogen com en les cadenes laterals i la presència d'àtoms de fluor en la seua molècula. Segons es pot observar en la figura 6.1 totes les quinolones tenen una estructura comuna composta d'un anell de piridina (amb un grup àcid carboxílic lliure en la posició 3 i un nitrogen en la posició 1 que ha d'estar unit a una cadena lineal o cíclica (R_1) perquè la substància presente activitat), unit a un anell aromàtic.

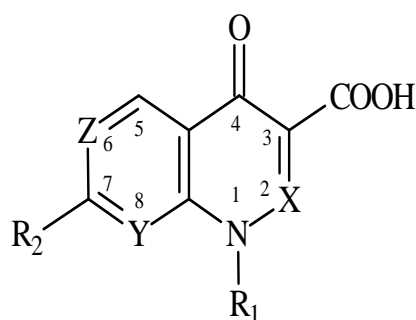


Figura 6.1. Estructura bàsica de les quinolones. X = N, H; Y = N, H; Z = N, H.

Les fluoroquinolones, que pertanyen a la segona generació de quinolones, incorporen un àtom de fluor en la posició 6 i un grup piperanizil en la posició 7. Es caracteritzen per la seua gran eficàcia contra l'activitat bacteriana [2], i s'utilitzen en medicina i veterinària. En els éssers humans, s'usen per tractar una àmplia gamma de malalties, com les infeccions del tracte urinari, respiratori i gastrointestinal [3].

L'anàlisi de quinolones s'ha realitzat tradicionalment mitjançant mètodes microbiològics. No obstant, aquesta tècnica és molt tediosa pel temps que requereix i a més, ofereix una precisió i especificitat roïnes. També s'han aplicat altres tècniques no rutinàries com la luminescència sensibilitzada de terbi (III) [4], l'electroforesi capil·lar [5–7], o la cromatografia d'immunoafinitat [8].

També s'han utilitzat equips d'última generació de cromatografia líquida adaptada a espectrofotometria de masses en tàndem (*liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) [9–11], encara que aquesta instrumentació és molt cara i només uns pocs laboratoris poden fer ús de la mateixa. La cromatografia líquida d'alta resolució (*high performance liquid chromatography*, HPLC) s'ha convertit en una eina important per a l'anàlisi individual o de diverses combinacions de quinolones en fluids biològics, aliments, mostres ambientals, i preparacions farmacèutiques utilitzant mètodes de detecció en la regió ultraviolada o de fluorescència [12–27].

Els mètodes de cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC) tenen els avantatges de permetre la injecció directa de mostres sense necessitat de realitzar cap tractament previ excepte la filtració, així com la baixa toxicitat de les seues fases mòbils [28]. L'MLC ha demostrat ser una tècnica útil en la determinació de diversos grups de fàrmacs, com els diürètics del grup de les tiazides [29, 30], la furosemida [31], i la trazodona [32] en medicaments.

En aquest capítol, es demostra que les fases mòbils micel·lars híbrides que contenen dodecilsulfat sòdic i propanol són apropiades per a la determinació simultània d'àcid pipemídic, levofloxacina, norfloxacina, i moxifloxacina (figura 6.2). El procediment

desenvolupat s'ha aplicat al control de diverses preparacions farmacèutiques que es comercialitzen en diferents presentacions, i ha sigut validat d'acord amb la guia *International Conference on Harmonisation (ICH)* [33]. Malgrat que aquests compostos no s'administren conjuntament, el mètode proposat permet la determinació i quantificació de les quatre quinolones estudiades en una única anàlisi cromatogràfica sense la necessitat de realitzar modificacions addicionals per a cada compost per separat, que fan que el mètode proposat siga més econòmic i ràpid.

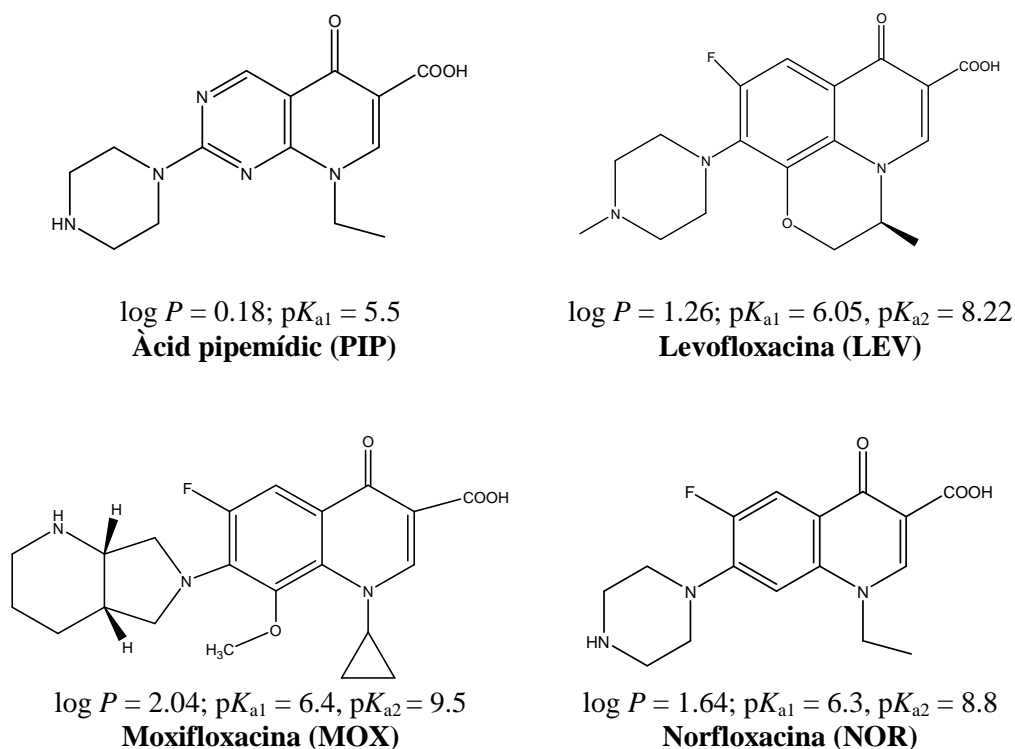


Figura 6.2. Estructures, coeficients de repartiment octanol-aigua ($\log P$) i constants de dissociació àcid-base de les quinolones estudiades [34–36].

6.3. Part experimental

6.3.1. Reactius

Els estàndards d'àcid pipemídic (PIP) i norfloxacina (NOR) van ser adquirits a Sigma (St. Louis, MO, EUA), moxifloxacina (MOX) va ser de Bayer (Leverkusen, Alemanya) i levofloxacina (LEV) de Fluka (Milà, Itàlia). Altres reactius emprats van ser: dodecilsulfat sòdic (SDS), dihidrogenfosfat sòdic, i metanol (Merck, Darmstadt, Alemanya), propanol (Scharlab, Barcelona), àcid clorhídric i trietilamina (J.T. Baker, Deventer, Països Baixos). Es va utilitzar aigua destil·lada desionitzada (Millipore S.A.S., Molsheim, França) per a la preparació de totes les dissolucions.

6.3.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix sistema cromatogràfic d'Agilent Technologies (equipat amb una bomba quaternària, un mostrejador automàtic i un detector UV-visible), així com les mateixes condicions d'operació (flux i volum d'injecció) descrites en el capítol 3. La balança analítica, pH-metre, agitador vòrtex, i la unitat d'ultrasons també van ser els mateixos que els descrits en el capítol 3.

6.3.3. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica es va realitzar amb una columna Kromasil C18 (150 mm × 4.6 mm de diàmetre intern i 5 µm de grandària de partícula) (Scharlab) termostatitzada a 25 °C, utilitzant una fase mòbil de 0.15 M SDS–2.5% (v/v) propanol–0.5% trietilamina tamponada a pH 3, mentre que la detecció es va realitzar a 276 nm. D'altra banda, el senyal analític es va adquirir amb un PC connectat al cromatògraf a través d'una estació de dades d'Agilent (Rev. B.03.01).

6.3.4. Preparació de dissolucions estàndard i fases mòbils

La preparació de les fases mòbils micel·lars es va dur a terme de la mateixa manera descrita en el capítol 5. Resumint, es va dissoldre l'SDS en aigua i a continuació es va afegir trietilamina (TEA) (0.5%). Tot seguit, es va tamponar a pH 3 amb dihidrogenfosfat sòdic 0.01 M, i per últim, es va addicionar propanol fins a aconseguir la seua concentració desitjada, i es va aforar amb aigua.

Es van preparar dissolucions patró de 50 µg/mL de cada antibiòtic. Aquestes es van dissoldre en uns pocs mil·lilitres d'etanol amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons i finalment es van aforar amb una dissolució 0.1 M SDS tamponada amb fosfat a pH 3. Es van preparar diverses dissolucions patró en l'interval de concentracions d'1–25 µg/mL per a l'anàlisi dels antibiòtics en medicaments. Les dissolucions es van preparar de forma periòdica.

6.3.5. Preparació de les mostres de medicaments

Els fàrmacs analitzats van ser comprimits i càpsules. Per a les anàlisis, es van pesar, triturar i homogeneïtzar deu comprimits. A continuació, es van pesar diverses porcions i cadascuna es va sonicar en una xicoteta quantitat d'etanol (5%, v/v del volum final) en un bany d'ultrasons. Llavors es va afegir una dissolució 0.1 M SDS a pH 3 per afavorir l'extracció dels compostos, i es va usar novament el bany d'ultrasons. Finalment, es va diluir amb la mateixa dissolució micel·lar. Per la seua banda, les càpsules es van pesar abans i després de buidar-les amb cura, per obtenir un pes exacte del seu contingut. A continuació es va seguir el mateix procediment indicat per als comprimits. Els excipients no van ser solubles en el medi micel·lar, per la qual cosa les dissolucions de les mostres es van filtrar abans de la seua injecció en el cromatògraf, directament en els vials col·locats en el mostrejador automàtic, a través de membranes de niló de 0.45 µm (Micron separacions, MA, EUA).

6.4. Resultats i discussió

6.4.1. Selecció de la fase mòbil

Es van realitzar una sèrie d'estudis preliminars amb el propòsit d'obtenir un mètode eficient per a la separació de les quatre quinolones considerades. Es van estudiar de forma exhaustiva els següents paràmetres: longitud d'ona de detecció, components i composició de la fase mòbil, i pH.

Es van provar diverses fases mòbils utilitzant diferents composicions de dos alcohols: propanol i butanol. El propanol va produir millors eficàcies en els pics cromatogràfics, però aquestos van presentar una elevada retenció respecte al butanol. No obstant, els antibiòtics no es van separar amb butanol a causa de diversos solapaments entre ells. Per tant, es va preferir l'ús de propanol en l'etapa d'optimització de la separació.

Les quinolones presenten dos grups funcionals ionitzables: àcid carboxílic i un nitrogen quaternari en l'anell de piperazina. El grup carboxílic té un caràcter àcid més fort que el grup amoni, la constant de dissociació àcid del qual (pK_a) varia entre 5.5 i 9.5 en medi aquós. Els valors de pK_a i els coeficients de repartiment octanol-aigua ($\log P$) de les quinolones es mostren en la figura 6.2 [34–36]. Entre els diferents valors de pH que es van estudiar, es va triar pH 3 atès que es van obtenir temps de retenció adequats amb pics estrets i ben separats. D'altra banda, cal comentar que l'eficàcia dels pics es deteriorava quan s'incrementava el pH de la fase mòbil.

Les fases estacionàries de sílice són problemàtiques des del punt de vista de l'estabilitat del pH i l'activitat química residual dels grups silanol lliures, la qual cosa pot originar pics amb cua i temps de retenció variables per a compostos amb caràcter bàsic. L'addició d'una amina en la fase mòbil, com la TEA, és una pràctica comuna per protegir als grups silanol de la fase estacionària i augmentar d'aquesta manera l'eficàcia de compostos bàsics que posseeixen grups amino. En el nostre cas, l'ús de TEA va

millorar l'eficàcia de les quatre quinolones. No obstant, aquesta amina es comporta com un nou modificador i provoca una disminució en els factors de retenció dels compostos. Per aquestes raons, la concentració de TEA es va limitar a 0.5%.

6.4.2. Estratègia d'optimització

Es va realitzar un estudi d'optimització de la mescla de les quatre quinolones (PIP, LEV, MOX i NOR). Un adequat control de les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic pot donar lloc a cromatogrames amb una bona resolució i una apropiada força d'elució.

Es va aconseguir la composició adequada de la fase mòbil que permet la completa resolució dels antibiòtics, mitjançant l'estratègia d'optimització interpretativa descrita en els capítols 3–5. L'equació 4.1 del capítol 4 es va utilitzar per descriure la retenció, utilitzant les dades cromatogràfiques (factor de retenció, k ; eficàcia, N ; i factor d'asimetria, B/A) obtingudes després d'injectar els compostos en un nombre reduït de fases mòbils (cinc, quatre d'elles situades en els vèrtexs d'un rectangle i la cinquena en el seu centre). Les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic estudiades van estar en els intervals següents: 0.05 M–0.15 M per a SDS, i 2.5%–12.5% per a propanol. Els errors d'ajust en els factors de retenció predits amb l'equació 4.1 van ser inferiors al 2% per a tots els compostos. Els paràmetres cromatogràfics (k , N , i B/A) dels antibiòtics es van mesurar amb el programari *Michrom* [37, 38], que permet a més modelitzar la seua retenció, considerant un criteri de màxima resolució i mínim temps d'anàlisi per part del cromatografista.

En la figura 6.3 es mostra el diagrama de resolució global. S'observa que la màxima resolució (valors pròxims a la unitat) només s'aconsegueix en una zona estreta en l'interval de concentracions d' SDS (0.12 M–0.15 M) i propanol (2.5%–3.5%, v/v).

Finalment, es va seleccionar la fase mòbil amb el millor valor de resolució ($R_S = 0.868$): 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–0.01 M NaH_2PO_4 –pH 3, on el temps d’anàlisi total va ser inferior a 12 minuts. En aquest cas no és necessària una separació completa dels antibiòtics ja que mai es trobaren junts en el mateix medicament, però si han d’estar prou resolts perquè puguin identificar-se en les distintes preparacions farmacèutiques de forma individual. L’ús d’una única fase mòbil permet un estalvi a nivell de temps i econòmic. La figura 6.4 mostra els cromatogrames simulat i experimental per a la mescla de les quatre quinolones en la fase mòbil òptima, sent la concordança entre ambdós excel·lent. Els paràmetres cromatogràfics (k , N i B/A) obtinguts per als antibiòtics en aquesta fase mòbil van ser: 6.6, 1900, i 1.1; 5.7, 1500, i 1.1; 9.1, 1700, i 1.0; i 8.1, 1100, i 1.2 per a PIP, LEV, NOR i MOX, respectivament.

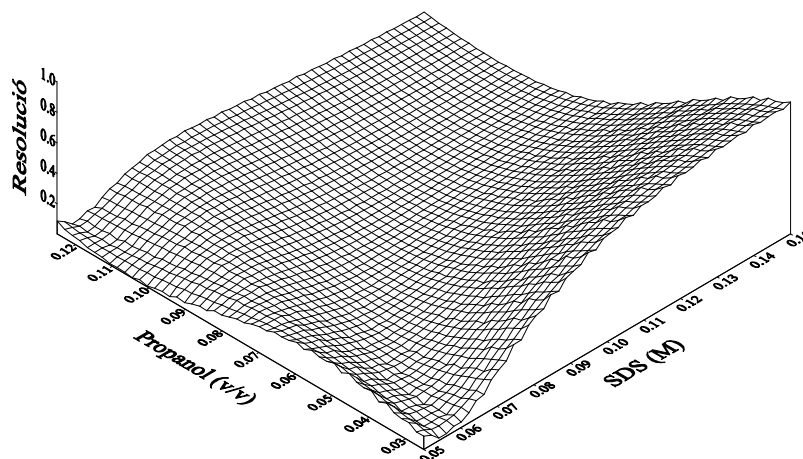


Figura. 6.3. Diagrama de resolució global.

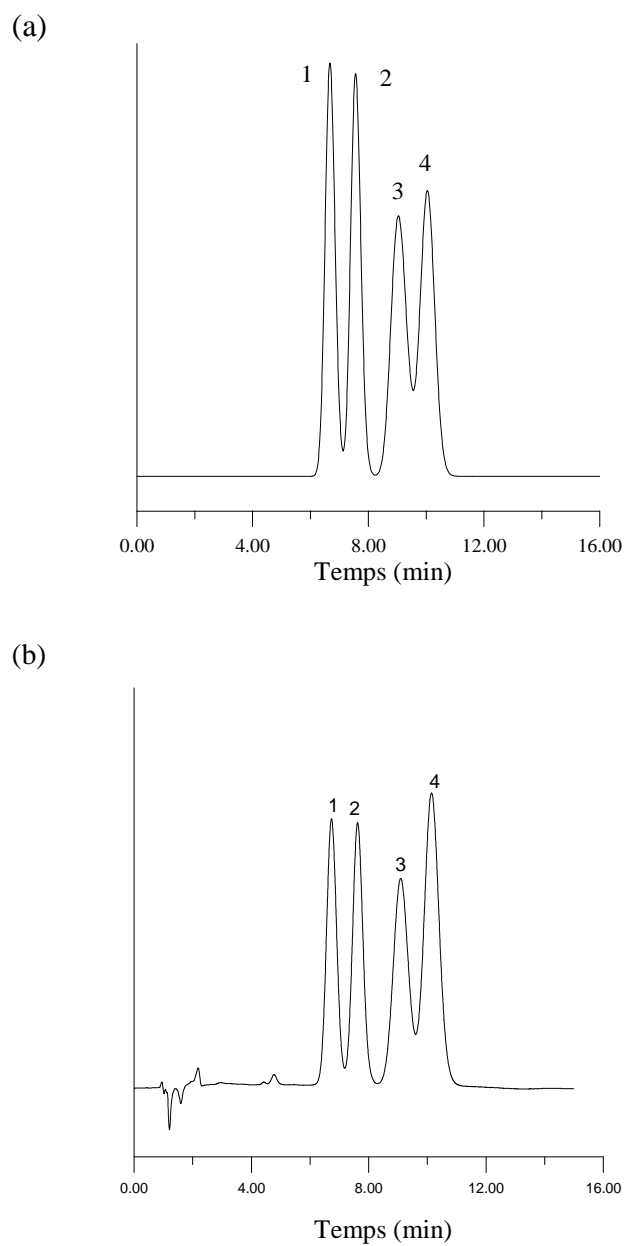


Figura 6.4. Cromatogrames predit (a), i experimental (b) d'una mescla de: (1) PIP (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (2) LEV (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (3) NOR (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i (4) MOX (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Fase mòbil: 0.15 SDS M–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

6.4.3. Validació del mètode

En aquest capítol s'ha utilitzat la guia de validació *International Conference on Harmonisation* (ICH) [33].

a) Linealitat

Es va estudiar l'interval lineal de resposta de cada compost en el rang de 0.1–50 µg/mL per a les condicions cromatogràfiques seleccionades, a partir de set dissolucions a concentracions creixents (0.1, 0.5, 1, 5, 15, 25, 50 µg/mL). Cada dissolució es va injectar en el sistema cromatogràfic per sextuplicat, i es van mesurar les àrees dels pics cromatogràfics. Les corbes de calibratge es van construir mitjançant la representació de les dites àrees enfront dels respectius valors de concentració, i es van ajustar utilitzant el mètode de regressió lineal de mínims quadrats. Totes les corbes van ser lineals ($R^2 > 0.9997$) en l'interval de concentracions estudiat (taula 6.1).

Taula 6.1. Característiques analítiques significatives obtingudes en la determinació dels antibiòtics.

Analit	$a \pm SD^a$	$b \pm SD^a$	R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
LEV	0.83 ± 0.03	-0.149 ± 0.021	0.9997	56	171
MOX	0.405 ± 0.024	-0.020 ± 0.016	0.9999	14	43
NOR	2.47 ± 0.14	-0.09 ± 0.07	0.9999	33	100
PIP	2.67 ± 0.19	-0.27 ± 0.16	0.9998	8	28

^a Paràmetres de calibratge: Àrea = $a C$ (µg/mL) + b ; SD = desviació estàndard; R^2 = coeficient de determinació.

b) Límits de detecció i de quantificació

Els límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ) de LEV, MOX, NOR, i PIP es van calcular d'acord amb la guia ICH [33], utilitzant els criteris $3s$ i $10s$, respectivament, per mitjà de la injecció d'una sèrie de 10 dissolucions que contenen una concentració baixa dels compostos. La taula 6.1 resumeix els valors dels LODs i LOQs per als antibiòtics. El mètode és prou sensible perquè pugui aplicar-se en assajos de rutina de preparacions farmacèutiques.

c) Precisió i exactitud

La precisió i exactitud intradia (dins d'un mateix dia) es van determinar per mitjà de la injecció per sextuplicat de quatre concentracions conegudes (0.5, 5, 25 i 50 $\mu\text{g/mL}$) dels antibiòtics. Per la seua banda, la precisió i exactitud interdia (en diferents dies) es van avaluar realitzant sis injeccions en el mateix dia de les dissolucions indicades anteriorment durant cinc dies consecutius (taula 6.2). La gran exactitud i excel·lent precisió dels resultats obtinguts indica la utilitat del mètode.

d) Robustesa

La robustesa del mètode es va avaluar realitzant xicotetes variacions en les condicions òptimes dels paràmetres següents: SDS (M), 1-propanol (% v/v), pH, TEA (% v/v), i flux de la fase mòbil. Per a això es van injectar sis rèpliques d'una dissolució estàndard de 5 $\mu\text{g/mL}$ de cada compost. La dispersió en els temps de retenció (RSD, % < 11) dels compostos a causa d'aquests canvis es mostra en la taula 6.3. La variació del flux va tenir una major influència en la retenció que la resta de paràmetres. No obstant, les variacions de tots els paràmetres no van tenir cap efecte significatiu sobre la resolució, l'àrea dels pics i la seua forma.

Taula 6.2. Exactitud i precisió (intra i interdia) dels antibiòtics.

Analit	Concentració addicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Trobada ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Exactitud (Er, %)	Intradia RSD (%)	Trobada ^b ($\mu\text{g/mL}$)	Exactitud (Er, %)	Interdia RSD (%)
LEV	0.5	0.4888 \pm 0.0011	2.2	0.2	0.499 \pm 0.010	0.2	2.0
	5	4.88 \pm 0.08	2.4	1.6	5.03 \pm 0.09	0.6	1.8
	25	24.51 \pm 0.14	2.0	0.6	25.2 \pm 0.4	0.8	1.6
	50	50.3 \pm 0.6	0.6	1.2	50.16 \pm 0.13	0.3	0.3
MOX	0.5	0.495 \pm 0.007	1.0	1.4	0.496 \pm 0.007	0.8	1.4
	5	4.89 \pm 0.06	2.2	1.2	4.97 \pm 0.03	0.6	0.6
	25	24.4 \pm 0.3	2.4	1.2	24.85 \pm 0.14	0.6	0.6
	50	50.1 \pm 0.9	0.2	1.8	50.15 \pm 0.14	0.3	0.3
NOR	0.5	0.505 \pm 0.006	1.0	1.2	0.498 \pm 0.006	0.4	1.2
	5	4.90 \pm 0.17	2.0	3.5	4.99 \pm 0.08	0.2	1.6
	25	25.20 \pm 0.06	0.8	0.2	24.9 \pm 0.5	0.4	2.0
	50	49.9 \pm 0.3	0.2	0.6	50.05 \pm 0.13	0.1	0.3
PIP	0.5	0.505 \pm 0.008	1.0	1.6	0.501 \pm 0.007	0.2	1.4
	5	4.97 \pm 0.15	0.6	3.0	5.00 \pm 0.08	0.0	1.6
	25	24.75 \pm 0.13	1.0	0.5	24.7 \pm 0.3	1.2	1.2
	50	50.17 \pm 0.19	0.3	0.4	50.11 \pm 0.18	0.2	0.4

^a n = 6, ^b n = 5

Taula 6.3. Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	LEV	MOX	NOR	PIP
		t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)
A: SDS (M)					
0.145	-0.005	6.8	9.2	10.3	7.7
0.15	0	6.7	9.1	10.1	7.6
0.155	+0.005	6.7	9.1	10.1	7.6
Mitjana ± SD		6.73 ± 0.06	9.13 ± 0.06	10.17 ± 0.12	7.63 ± 0.06
RSD (%)		0.9	0.7	1.2	0.8
B: Propanol (% v/v)					
2.4	-0.1	7.3	9.9	11.2	8.3
2.5	0	6.7	9.1	10.1	7.6
2.6	+0.1	6.7	9.3	10.0	7.6
Mitjana ± SD		6.9 ± 0.3	9.4 ± 0.4	10.4 ± 0.7	7.8 ± 0.4
RSD (%)		4.3	4.3	6.4	5.12
C: pH					
2.9	-0.1	6.7	9.1	10.2	7.7
3	0	6.7	9.1	10.1	7.6
3.1	+0.1	6.7	9.1	10.2	7.7
Mitjana ± SD		6.7 ± 0.0	9.1 ± 0.0	10.17 ± 0.06	7.67 ± 0.06
RSD (%)		0.0	0.0	0.6	0.8
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	7.4	10.2	11.3	7.7
1	0	6.7	9.1	10.1	7.6
1.1	+0.1	6.1	8.2	9.2	6.7
Mitjana ± SD		6.7 ± 0.7	9.2 ± 1.0	10.2 ± 1.1	7.3 ± 0.6
RSD (%)		10.4	10.9	10.8	8.2
E: TEA (% v/v)					
0.45	-0.05	6.7	9.1	10.2	7.7
0.5	0	6.7	9.1	10.1	7.6
0.55	+0.05	6.7	9.0	10.1	7.6
Mitjana ± SD		6.7 ± 0.0	9.07 ± 0.06	10.13 ± 0.06	7.63 ± 0.06
RSD (%)		0.0	0.7	0.6	0.8

e) Anàlisi de medicaments

Es va determinar el contingut de 19 preparacions farmacèutiques comercialitzades a Espanya com comprimits i càpsules (taula 6.4). Es van construir rectes de calibratge, a partir de la mesura de les àrees dels pics cromatogràfics, en l'interval 1–25 µg/mL per a cada antibiòtic (LEV, MOX, NOR, i PIP), realitzant injeccions per duplicat de cinc dissolucions de concentració creixent. D'altra banda, es va realitzar l'anàlisi per sextuplicat dels medicaments a una concentració aproximada de 10 µg/mL per a cada compost.

En les figures 6.5 i 6.6 es mostren els cromatogrames de quatre dels medicaments analitzats que contenen els següents antibiòtics: LEV i PIP (figura 6.5), i MOX i NOR (figura 6.6). Els excipients van eluir en el temps mort o no van absorbir a la longitud d'ona de mesura.

En la taula 6.4 apareixen els valors declarats pels fabricants i els trobats, junt amb els percentatges dels valors declarats i la precisió obtinguda (RSD, %). Els valors trobats van estar en l'interval 96–106% del contingut declarat, i les dispersions en l'interval 0.2–1.9%. Els resultats van estar d'acord amb el contingut declarat pels fabricants.

Taula 6.4. Anàlisi de medicaments que contenen els antibiòtics estudiats (n = 6).

Medicament (fabricant)	Composició (mg)	Trobat (mg)	Percentatge del valor declarat (%)	RSD (%)
Urisan (Tedec-Meiji Farma, Madrid)	Per càpsula: PIP (400), excipients	415 ± 7	103.8	1.7
Galusan (Almirall, Barcelona)	Per càpsula: PIP (400), excipients	420 ± 8	105.0	1.9
Nuril (Almirall)	Per càpsula: PIP (400), excipients	421 ± 4	105.3	1.0
Levofloxacina Normon (Normon, Madrid)	Per comprimit: LEV (500), excipients	500.0 ± 1.7	100.0	0.3
Levofloxacina Stada (Stada, Barcelona)	Per comprimit: LEV (500), excipients	485 ± 3	97.0	0.6
Tavanic (Sanofi Aventis, Barcelona)	Per comprimit: LEV (500), excipients	483.7 ± 1.0	96.7	0.2
Amicrobin (Quimifar, Barcelona)	Per càpsula: NOR (400), excipients	417.6 ± 1.3	104.4	0.3
Norfloxacina Stada (Stada)	Per comprimit: NOR (400), excipients	407.0 ± 1.8	101.8	0.4
Nalion (Sandoz Farmacéutica, Barcelona)	Per comprimit: NOR (400), excipients	423.7 ± 1.9	105.9	0.4
Uroctal (Almirall)	Per comprimit: NOR (400), excipients	422.2 ± 1.3	105.6	0.3

Taula 6.4. (continuació).

Medicament (fabricant)	Composició (mg)	Trobat (mg)	Percentatge del valor declarat (%)	RSD (%)
Noroxin (Sharp & Dohme, Madrid)	Per comprimit: NOR (400), excipients	383.9 ± 1.7	96.0	0.4
Norflok (Belmac, Madrid)	Per comprimit: NOR (400), excipients	420.3 ± 0.7	105.1	0.2
Norfloxacina Normon (Normon)	Per comprimit: NOR (400), excipients	393.5 ± 0.6	98.4	0.2
Norfloxacina Sandoz (Sandoz Farmacèutica)	Per comprimit: NOR (400), excipients	393 ± 4	98.3	1.0
Norfloxacina Bexal (Bexal Farmacèutica, Madrid)	Per comprimit: NOR (400), excipients	421.0 ± 1.5	105.3	0.4
Esclebin (Alacan, Alacant)	Per comprimit: NOR (400), excipients	384.7 ± 1.8	96.2	0.5
Octegra (Química Farmacèutica Bayer, Barcelona)	Per comprimit: MOX (400), excipients	394.4 ± 1.9	98.6	0.5
Proflox (Esteve, Barcelona)	Per comprimit: MOX (400), excipients	406.8 ± 1.6	101.7	0.4
Actira (Bayer)	Per comprimit: MOX (400), excipients	413 ± 6	103.3	1.5

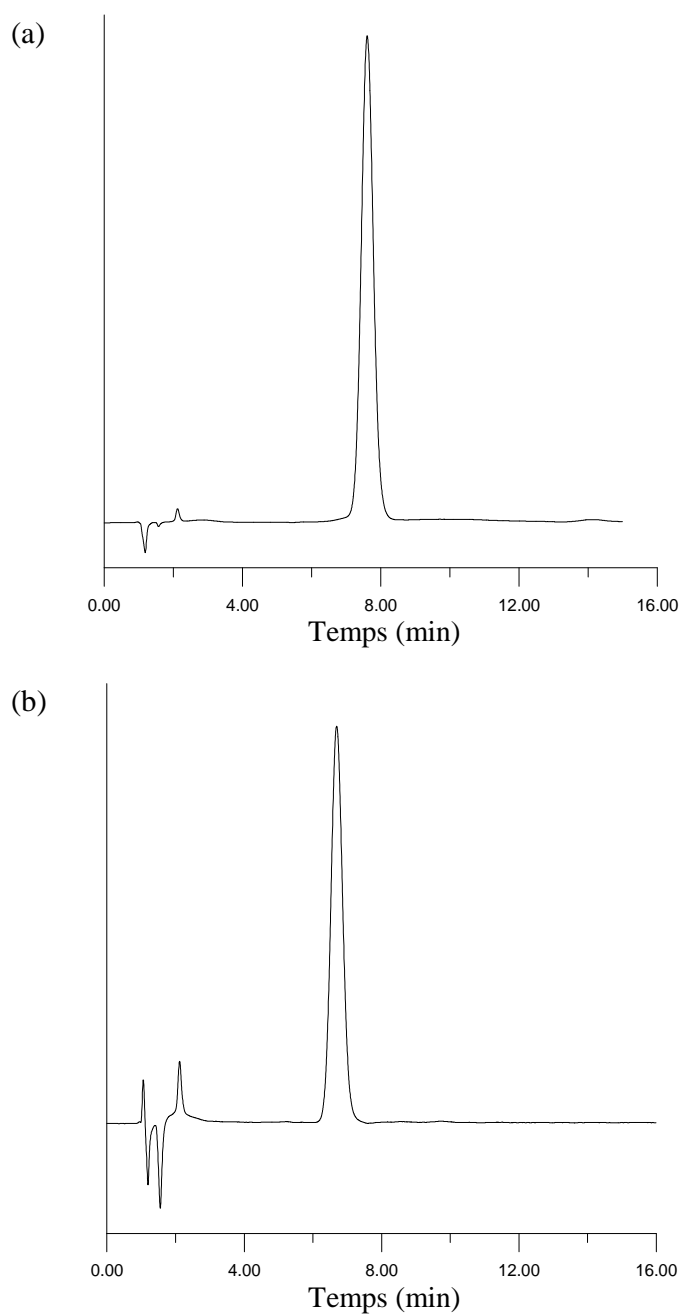


Figura 6.5. Cromatogrames de les preparacions farmacèutiques: (a) Nuril (400 mg PIP), i (b) Stada (500 mg LEV) injectades en una concentració de 10 µg/mL. Fase mòbil: 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

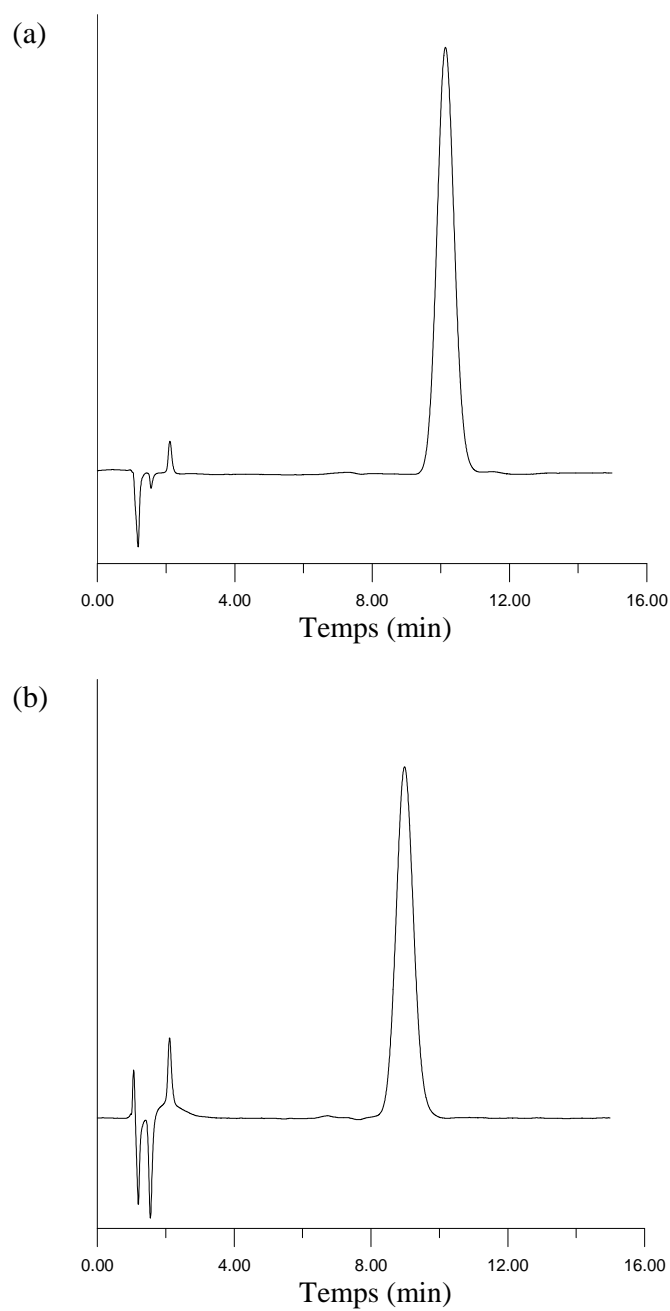


Figura 6.6. Cromatogrames de les preparacions farmacèutiques: (a) Norfloxacin Sandoz (400 mg NOR), i (b) Actira (400 mg MOX) injectades en una concentració de 10 µg/mL. Fase mòbil: 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

6.5. Conclusions

El procediment cromatogràfic ací proposat per a la determinació rutinària, en medicaments d'alguns antibiòtics del grup de les quinolones amb una fase mòbil micel·lar híbrida d'SDS i propanol, és simple i ràpid. El mètode d'optimització interpretativa aplicat va conduir a la fase mòbil òptima per mitjà de l'ús de les dades cromatogràfiques obtingudes en només cinc fases mòbils, necessàries per ajustar les equacions que descriuen el comportament d'elució de cada antibiòtic. S'ha obtingut una bona sensibilitat, linealitat, i robustesa. La precisió intra i interdia va ser satisfactòria (RSD inferior a 3.5% i 2.0%, respectivament). Els resultats de les anàlisis van estar d'acord amb el contingut declarat pels fabricants (96–106%).

6.6. Referències

1. G.Y. Leshner, E.D. Froelich, M.D. Gruet, J.H. Bailey, R.P. Brudage, *J. Med. Pharm. Chem.* 5 (1962) 1063.
2. L.C. Jackson, L.A. Machado, M.L. Hamilton, *Acta Medica* 8 (1998) 5.
3. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, EUA, 1988.
4. J.A. Hernández Arteros, R. Companó, R. Ferrer, M.D. Prat, *Analyst* 125 (2000) 1155.
5. Y. Fan, X. Gan, S. Li, W. Qin, *Electrophoresis* 28 (2007) 4101.
6. H. Sun, W. Zharo, P. He, *Chromatographia* 68 (2008) 425.
7. M. Ferdig, A. Kaleta, T.D.T. Vo, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 305.
8. C.K. Holtzapple, S.A. Buckley, L.H. Stanker, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2963.
9. Z. Yue, X. Lin, S. Tang, X. Chen, C. Ji, H. Hua, Y. Liu, *Chin. J. Chromatogr. (Se Pu)* 25 (2007) 491.

10. M.D. Hernando, M. Mezcua, J.M. Suárez Barcena, A.R. Fernández Alba, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 176.
11. R. Romero González, J.C. López Martínez, E. Gómez Milán, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 142.
12. M.P. Hermo, E. Nemutlu, S. Kir, D. Barrón, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 98.
13. F. Cañada Cañada, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz Peña, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1242.
14. M.I.R.M. Santoro, N.M. Kassab, A.K. Singh, E.R.M. Kedor-Hackman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 179.
15. L.A. Shervington, M. Abba, B. Hussain, J. Donnelly, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 769.
16. A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, D. González Gómez, *Talanta* 62 (2004) 853.
17. J.L. Vílchez, L. Araujo, A. Prieto, A. Navalón, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 135.
18. Z. Vybíralová, M. Nobilis, J. Zoulova, J. Kvetina, P. Petr, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 851.
19. S.T. Ulu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 320.
20. F. Barbato, G. di Martino, L. Grumetto, M.I. la Rotonda, *Eur. J. Pharm. Sci.* 30 (2007) 211.
21. E.A. Christodoulou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 119.
22. S.J. Zhao, H.Y. Jiang, S.Y. Ding, G.Q. Wang, C. Li, J.Z. Shen, *Chromatographia* 65 (2007) 539.
23. E.A. Christodoulou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 246.
24. M.D. Marazuela, M.C. Moreno Bondi, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 25.

25. J.F. Huang, B. Lin, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1228.
26. R.C. Rodríguez Diaz, M.P. Aguilar Caballos, A. Gomez Hens, *Anal. Lett.* 37 (2004) 1163.
27. M. Seifrtová, A. Pena, C.M. Lino, P. Solich, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 799.
28. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
29. S. Carda Broch, J. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, *Analyst* 123 (1998) 301.
30. M.J. Ruiz Ángel, M.T. Gil Agustí, J. Esteve Romero, S. Carda Broch, *LC-GC Europe* 18 (2004) 32.
31. S. Carda Broch, J. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 803.
32. S. Carda Broch, M.T. Gil Agustí, M. Rambla Alegre, L. Monferrer Pons, J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 254.
33. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005).
<http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A> (30.04.09)
34. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, Londres, Regne Unit, 2004.
35. Moxifloxacin, *Tuberculosis* 88 (2008) 127.
36. Levofloxacin, *Tuberculosis* 88 (2008) 119.
37. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 187.
38. J.R. Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.

Part II

Anàlisi d'antibiòtics en aliments

Les ciències tenen les arrels amargues, però molt dolços fruits
Aristòtil

Capítol 7

Determinació de sulfamides en llet mitjançant cromatografia líquida micel·lar prèvia derivatització i acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall

7.1. Resum

En aquest capítol es proposa un procediment cromatogràfic que fa ús de fases mòbils micel·lars que contenen dodecilsulfat sòdic (SDS) i 1-propanol, a pH 3, per determinar en llet sis sulfamides (sulfacetamida, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizole, sulfametoxazole i sulfatiazole). En aquest procediment la determinació dels analits, es duu a terme mitjançant una derivatització precolumna de les sulfamides, consistent en la diazotació amb nitrit sòdic i acoblament amb *N*-(1-naftil)etilendiamina (reactiu de Bratton-Marshall), per formar azocolorants. La formació dels azocolorants va disminuir la polaritat de les sulfamides, i conseqüentment augmenta la seua retenció en ser cromatografiades amb eluents micel·lars, alhora que possibilita la seua detecció en la regió visible ($\lambda = 490$ nm) atès que elimina el senyal de fons de la matriu de llet. Tot això va incrementar la selectivitat del procediment. La separació es va dur a terme amb una fase mòbil de 0.08 M SDS–8.5% propanol tamponada a pH 7, en què el temps d'anàlisi va ser inferior a 16 min. Per a la validació del mètode es va estudiar el rang de linealitat ($R^2 > 0.9999$), i la precisió intra i interdia (inferiors al 3.7%). Els límits de detecció i quantificació van estar compresos en els intervals 0.7–0.9 i 2.4–3.1 ng/mL, respectivament. El límit de detecció va ser inferior al límit residual màxim que estableix la Unió Europea. Les recuperacions en mostres de llet addicionades van estar en l'interval 83.7–103.0%.

7.2. Introducció

Les sulfamides (SAs) són àmpliament utilitzades per prevenir i controlar malalties veterinàries, com infeccions gastrointestinals i respiratòries, així com per promoure el creixement, i fins profilàctics [1–4]. Es caracteritzen per presentar una estructura química semblant a l'àcid *p*-aminobenzoic (*p*-*amino benzoic acid*, PABA).

En el tractament de malalties de bestiar pot fer-se un ús abusiu d'aquests antibiòtics, donant lloc a residus indesitjables tant en teixits com en els biofluids d'animals, incloent la llet. Aquests residus poden originar una certa resistència als medicaments en éssers humans, la qual cosa condueix a una ineficàcia del fàrmac quan s'administra en el tractament terapèutic [5, 6]. En els últims anys, la comunitat científica ha manifestat una gran preocupació per l'alarmant increment de la resistència a antibiòtics a causa del problema que això suposa en el tractament de les malalties infeccioses. S'ha destacat una possible relació entre l'ús d'antibiòtics en animals i l'increment de la resistència a aquests compostos en bacteris d'importància en patologia humana i animal. La resistència a antibiòtics en éssers humans podria estar associada al consum de carn d'animals que han sigut tractats amb aquest tipus de compostos. Així, per prevenir problemes de salut, la Unió Europea hi ha establert un límit màxim residual (*maximum residue limit*, MRL) per a les SAs de 100 µg/kg en productes comestibles d'origen animal [5]. Per tant, la determinació de tals residus en menjar i altres subproductes animals utilitzats per a consum humà, s'ha convertit en un objectiu important d'estudi.

S'han desenvolupat diversos mètodes analítics per determinar SAs en teixit i biofluids d'origen animal utilitzant la cromatografia líquida d'alta resolució (*high performance liquid chromatography*, HPLC), amb detecció UV, de fluorescència o espectroscòpia de masses [2, 7–11]. Altres mètodes emprats han sigut la cromatografia de gasos (*gas chromatography*, GC) [12, 13], electroforesi capil·lar [3, 14, 15], i cromatografia micel·lar electrocinètica (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) [16]. Les dificultats inherents en l'anàlisi d'una mostra biològica es deuen a la

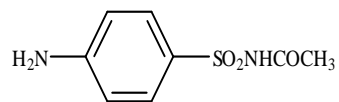
presència d'interferències que són coextretes junt amb els analits d'interès. Per aquesta raó, els mètodes anteriorment mencionats necessiten un tractament previ de la mostra, la qual cosa inclou diverses etapes, com una extracció amb dissolvent orgànic [4, 13], extracció en fase sòlida [1, 7] o ultrafiltració per centrifugació [9, 17]. El tractament de la mostra pot donar lloc a recuperacions variables o baixes. A més, el procés pot ser tòxic a causa de l'ús de clorur de metilè, acetonitril i metanol emprats en l'extracció o en la pròpia fase mòbil.

La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC) és una alternativa a la cromatografia líquida convencional que fa ús de fases mòbils aquo-orgàniques [18–20]. En MLC, la fase mòbil està composta per un tensioactiu en una concentració superior a la concentració micel·lar crítica, i ben sovint també per un dissolvent orgànic, generalment un alcohol de cadena curta (propanol, butanol o pentanol), l'addició del qual disminueix la retenció dels pics cromatogràfics i augmenta la seua eficàcia. És possible predir la retenció d'un solut eluït en fases mòbils micel·lars mitjançant l'ús de models que a més també s'utilitzen per optimitzar la separació de mescles de soluts [21, 22]. Un dels principals avantatges de l'MLC és que ofereix la possibilitat de determinar fàrmacs en matrius complexes (orina, plasma i aliments) sense necessitat de realitzar una extracció prèvia de les proteïnes presents en dites mostres, ja que permet la seua injecció directa mitjançant la solubilització dels seus components proteics [19, 20]. Això simplifica i accelera en gran mesura el tractament de la mostra, la qual cosa repercuteix en una major exactitud dels procediments analítics i en un menor cost econòmic. A més, els monòmers de tensioactiu i les micel·les desplacen els fàrmacs associats a les proteïnes, alliberant-los per al seu repartiment amb la fase estacionària. En els últims anys, l'MLC ha demostrat ser una tècnica útil per a l'anàlisi de diversos grups de substàncies en diferents matrius [23–26]. Els avantatges de l'MLC resideixen en la utilització de fases mòbils que són biodegradables, menys tòxiques i inflamables, i relativament més econòmiques en comparació amb altres mètodes.

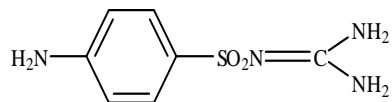
En presència d'un tensioactiu es pot modificar l'equilibri químic, la cinètica i les propietats espectrals, la qual cosa pot ser aprofitat per millorar les característiques dels procediments analítics. Els tensioactius indueixen alteracions favorables en les constants d'equilibri i en les propietats espectrals, inhibeixen reaccions no desitjades, com ara les d'hidròlisi i fotòlisi, estableixen intermedis de reacció, cosolubilitzen mostres polars i apolars, reactius derivatitzants i productes, i augmenten la velocitat de reacció per mitjà d'una catàlisi micel·lar.

Les SAs són arilamines i contenen una amina primària aromàtica (figura 7.1). Per aquesta raó poden ser derivatitzades i quantificades en la regió del visible mitjançant la formació d'un complex acolorit, que es genera com a conseqüència de la reacció de diazotació i acoblament. La derivatització [27, 28] inclou una primera reacció de diazotació amb nitrit de sodi, seguida d'un segon pas d'eliminació de l'excés de nitrit amb àcid sulfàmic, i posterior acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall (*N*-(1-naftil)etilendiamina o NED). L'ús d'un medi micel·lar de dodecilsulfat sòdic (SDS) ofereix diversos avantatges ja que no es requereixen canvis de pH, es redueix el temps de reacció i augmenta l'absortivitat molar dels azocolorants [29–31].

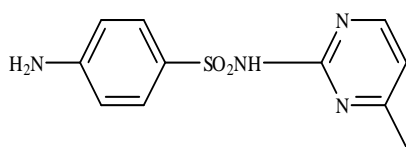
En aquest capítol, es mostra un procediment d'MLC en què es fa ús d'una reacció de derivatització precolumna amb el reactiu de Bratton-Marshall per a la determinació de sis SAs (sulfacetamida, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizole, sulfametoxazole i sulfatiazole) en llet. La formació de SAs cromògenes junt amb l'ús de l'MLC augmenta la selectivitat en la determinació d'aquests antibiòtics en matrius biològiques i d'aliments. A més, l'MLC permet la injecció directa de mostres que contenen impureses. El mètode desenvolupat és ràpid, selectiu, econòmic i no contamina el medi ambient.



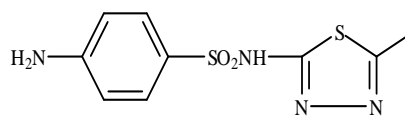
Sulfacetamida



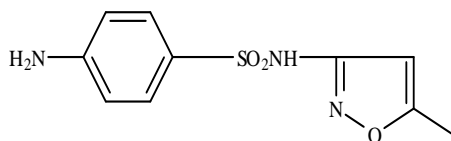
Sulfaguanadina



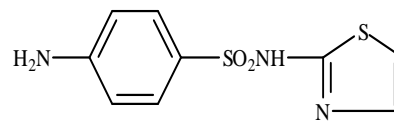
Sulfamerazina



Sulfametizole



Sulfametoxazole



Sulfatiazole

Figura 7.1. Estructures de les sulfamides.

7.3. Reacció de derivatització

Els tensioactius poden ser utilitzats com a eines versàtils per millorar la selectivitat, sensibilitat i fiabilitat de procediments espectrofotomètrics en l'anàlisi de materials orgànics, per ampliar l'aplicabilitat de les reaccions orgàniques cromogèniques a una major gamma de substrats i reactius, i tornar compatibles compostos iònics hidrofílics, hidrofòbics i les mostres. L'ús de tensioactius va ser inicialment limitat a les mesures de propietats d'equilibris, però s'ha ampliat als procediments cinètics analítics. L'àmplia varietat de reaccions orgàniques i les diferències en la reactivitat i propietats físiques dels reactius, substrats, intermedis de reacció i productes, suggereix que només és una xicoteta part de les possibilitats que es pot arribar a investigar.

Les arilamines reaccionen amb nitrit en excés en medi àcid per formar l'ió diazoni corresponent en la reacció anomenada de diazotació. El nitrit que no ha reaccionat ha de ser eliminat abans d'afegir el substrat amb el qual ha de reaccionar. Una vegada aquest ha sigut eliminat, es realitza l'acoblament entre el substrat i l'ió diazoni per originar l'azocolorant. En el nostre cas el substrat va ser el NED. Els compostos azo produïts en la reacció d'acoblament absorbeixen en el visible, amb una longitud d'ona de màxima absorció i absortivitat molar, que depenen de l'estructura del producte format, del pH i del dissolvent. L'absortivitat molar generalment és molt elevada i permet la determinació d'una gran varietat d'analits, en concentracions de l'ordre dels $\mu\text{g/mL}$.

La determinació espectrofotomètrica d'arilamines basada en la diazotació amb nitrit i acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall (*N*-(1-naftil)etilendiamina o NED) se simplifica àmpliament en un medi micel·lar d'SDS [32, 33]. En aquest medi, s'acceleren les reaccions de diazotació i acoblament, alhora que les constants de protonació dels grups amino secundaris dels azocolorants es desplacen a valors de pH majors, amb la qual cosa la càrrega positiva es manté en un rang més ampli de pH, afavorint la interacció amb les càrregues negatives de l'SDS. Aquests fets són la base que explica el

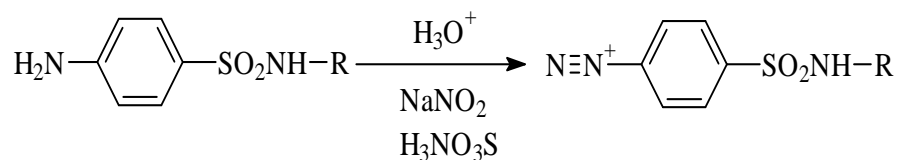
desenvolupament d'un procediment espectrofotomètric simple aplicat a la determinació d'arilamines [31].

En una solució no micel·lar, els ions diazoni es formen a $\text{pH} < 1$, mentre que es necessari un $\text{pH} > 4$ per a l'acoblament, particularment si els ions diazoni no tenen un substituent activador fort. Finalment, es duu a terme una altra modificació del pH per mesurar l'absorbància dels azocolorants en la seua forma diprotonada. En una solució micel·lar d'SDS s'estableix el rang òptim de pH de manera que l'acoblament es produïska amb una velocitat suficient, alhora que té lloc la protonació de l'azocolorant [31].

L'estratègia de formació de complexos acolorits de les SAs augmenta la selectivitat en la seua determinació en matrius biològiques, ja que aquests complexos acolorits només es formaran en aquells compostos que presenten les característiques d'una sal de diazoni capaç de reaccionar amb NED. El procediment de Bratton-Marshall en un medi micel·lar d'SDS va ser aplicat per a la determinació de SAs en preparacions farmacèutiques [32, 33], i anilina en olis vegetals [34]. Més recentment s'ha desenvolupat un procediment cromatogràfic per a la determinació de SAs en preparacions farmacèutiques [29], i orina [30]. En aquest procediment els azocolorants formats, en un medi micel·lar d'SDS, són separats amb una fase mòbil micel·lar. També es va desenvolupar un altre mètode cromatogràfic per a la determinació de diürètics en orina, en el qual aquests eren hidrolitzats a les corresponents arilamines en un medi àcid amb una dissolució 0.15 M HCl a 100 °C, prèviament a la formació dels azocolorants, i posteriorment es van analitzar amb fases mòbils micel·lars [35, 36]. La figura 7.2 mostra les reaccions generals de diazotació de les SAs amb nitrit, i el posterior acoblament dels ions diazoni de les SAs amb NED.

El desplaçament a la regió visible de la longitud d'ona de màxima absorció (480–560 nm) a causa del procediment de derivatització millora de manera important la selectivitat, la qual cosa permet una adequada anàlisi de diversos tipus de mostres.

Etapa 1. Reacció de diazotació



Ió diazoni

Etapa 2. Reacció d'acoblament

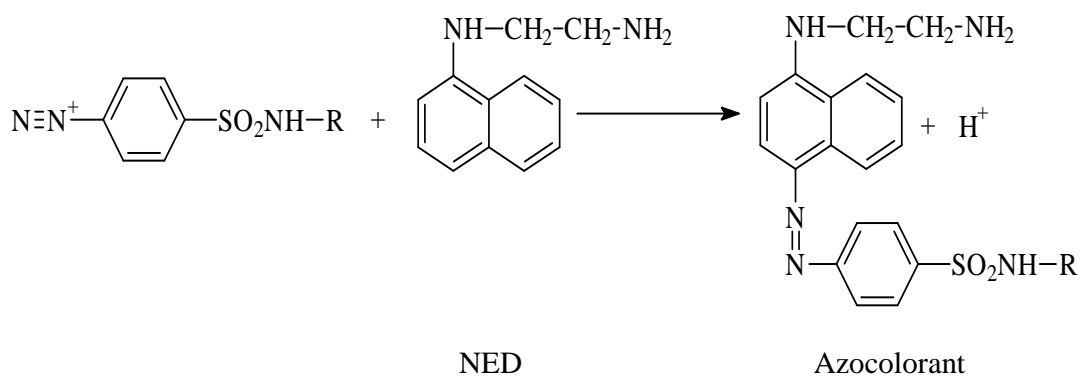


Figura 7.2. Reacció de diazotació de les sulfamides amb nitrit i acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall (NED).

7.4. Part experimental

7.4.1. Reactius

Les SAs estudiades van ser: sulfacetamida, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizole, sulfametoxazole i sulfatiazole (Sigma, St. Louis, EUA). A més s'ha fet ús dels següents reactius: nitrit sòdic, àcid sulfàmic, clorhidrat de *N*-(1-naftil)etilendiamina, dodecilsulfat sòdic, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, dihidrogenfosfat dissòdic, àcid clorhídric i hidròxid sòdic (Merck, Darmstadt, Alemanya). En totes les dissolucions es va utilitzar aigua destil·lada desionitzada (Millipore S.A.S, Mosheim, França). Les dissolucions de les SAs i les fases mòbils es van filtrar a través de membranes de niló de 0.45 µm (Micron Separations, Westboro, MA, EUA).

7.4.2. Instrumentació

Es va utilitzar el cromatògraf descrit en capítols anteriors (model 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), proveït d'una bomba quaternària i un mostrejador automàtic. La separació analítica es va realitzar per mitjà d'una columna Kromasil C18 (250 mm × 4.6 mm de diàmetre intern, i 5 µm de grandària de partícula) (Scharlab, Barcelona) col·locada en un compartiment termostatitzat a 25 °C. El volum d'injecció i el flux de la fase mòbil van ser 20 µL i 1 mL/min, respectivament. El temps mort es va determinar com la primera desviació significativa de la línia base obtinguda en cada cromatograma, després d'injectar les dissolucions micel·lars dels azocolorants. Per analitzar les mostres que contenen les SAs, es va seleccionar una fase mòbil de 0.08 M SDS–8.5% propanol–pH 7.

Els senyals analítics es van monitoritzar mitjançant un detector UV-visible de fila de díodes a una longitud d'ona de 490 nm, i es van adquirir per mitjà d'un PC connectat al cromatògraf a través d'una estació de dades d'Agilent. Les dades cromatogràfiques es van tractar amb el programari *Michrom* [21, 22]. La balança analítica, el pHmetre,

l'agitador vòrtex, i la unitat d'ultrasons també van ser els mateixos que els descrits en els capítols anteriors.

7.4.3. Preparació de dissolucions, mostres i fases mòbils

Es van preparar dissolucions patró de 100 µg/mL de cada SA, dissolent-les en aigua, que van ser utilitzades en els estudis d'optimització, mentre que les mostres de llet es van adquirir en un supermercat. Aquestes es van diluir, addicionar amb les SAs, i injectar en el sistema cromatogràfic sense cap tractament previ excepte la seua derivatització i posterior filtració. Les dissolucions patró i les mostres de llet es van conservar a 4 °C fins ser analitzades. La fase mòbil es va preparar utilitzant SDS tamponat amb dihidrogenfosfat dissòdic 0.01 M a pH 7, i posteriorment es va afegir la quantitat adequada d'un dels tres alcohols estudiats (1-propanol, 1-butanol, o 1-pentanol) per aconseguir la concentració desitjada.

7.4.4. Formació dels azocolorants de les sulfamides

Per a la derivatització, es van prendre alíquotes de diferents volums de les dissolucions de SAs (preparades en aigua o addicionades en llet), i es van introduir en un aforat de 25 mL, junt amb 10 mL d'una dissolució 0.05 M SDS–0.15 M HCl, i 1 mL de nitrit sòdic 0.1 M. Després de 5 min, es va destruir l'excés de nitrit per reacció amb 1 mL d'àcid sulfàmic 0.3 M. Transcorreguts 10 min més, es van acoblar els ions diazoni amb 0.5 mL de NED 0.03 M per formar els azocolorants, i finalment, es va aforar amb aigua. Els azocolorants es van formar immediatament i van ser estables almenys durant 1 mes, a excepció de la sulfacetamida. La degradació d'aquest compost es va observar mitjançant la disminució de l'àrea del seu pic cromatogràfic i l'aparició d'un segon pic. Per aquesta raó, l'azocolorant de la sulfacetamida es va injectar sempre com a màxim 1 hora després de la seua preparació. En aquestes condicions només es va observar un pic.

7.5. Resultats i discussió

7.5.1. Estratègia d'optimització i selecció de la fase mòbil

Els temps de retenció dels azocolorants van ser massa elevats en fases mòbils que contenien només SDS. Per això, es va afegir un dissolvent orgànic per incrementar la força d'elució. Es va comparar l'efecte que produïen sobre la retenció dels azocolorants els alcohols 1-propanol, 1-butanol, i 1-pentanol, observant-se que el pentanol i, en menor extensió el butanol, disminuïen excessivament els temps de retenció. El propanol es queda en la fase aquosa, mentre que el butanol i el pentanol modifiquen l'estructura de les micel·les. Finalment, es va seleccionar el propanol ja que va permetre un millor control de la força d'elució. A més quan es van utilitzar pentanol i butanol, es va observar un solapament de diversos antibiòtics, mentre que el propanol va permetre la completa resolució de les sis SAs. Tradicionalment, s'ha utilitzat aquest alcohol per augmentar la força d'elució de les fases mòbils micel·lars pures.

La fase mòbil òptima per a la separació dels azocolorants es va obtenir aplicant un procediment interpretatiu, que fa ús dels temps de retenció i dels paràmetres de forma dels pics cromatogràfics obtinguts en diverses fases mòbils, a concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic adequadament distribuïdes en l'espai dels factors (constituït per les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic). En aquest estudi, es van injectar en el sistema cromatogràfic els azocolorants de les sis SAs, i s'elüïren amb les següents fases mòbils a pH 7 que contenien SDS (M) / propanol (% , v/v): 0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.1/2.5, 0.1/7.5, 0.125/5, 0.15/2.5, 0.15/7.5, 0.15/12.5. Es van mesurar els factors de retenció (k), eficàcies cromatogràfiques (N) i factors d'asimetria (B/A , sent B i A les distàncies entre el centre i la cua, o el centre i l'inici del pic cromatogràfic, respectivament, mesurats al 10% de l'alçada del pic). Aquestes dades es van utilitzar posteriorment en un model matemàtic per modelitzar la retenció (equació 7.1), i un procediment d'optimització interpretativa per predir la resolució per a les sis SAs [19].

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}} [M] \quad (7.1)$$

on φ i $[M]$ són la fracció volumètrica del dissolvent orgànic i la concentració molar del tensioactiu que es troba en forma de micel·les, respectivament; K_{AS} i K_{AM} descriuen el repartiment del solut entre la fase aquosa i la fase estacionària o la micel·la, respectivament, K_{AD} i K_{MD} tenen en compte el desplaçament dels equilibris de repartiment produït per l'addició del dissolvent orgànic. Aquesta equació també s'ha utilitzat en els capítols 4–6.

Considerant el criteri de màxima resolució i mínim temps d'anàlisi, la fase mòbil òptima seleccionada va ser 0.08 M SDS–8.5% (v/v) propanol–pH 7. Els valors dels paràmetres cromatogràfics per a aquesta fase mòbil es mostren en la taula 7.1.

Taula 7.1. Paràmetres cromatogràfics per als azocolorants de les sis SAs eluïts amb la fase mòbil òptima.

Compost	t_R (min)	k	N	B/A
Sulfacetamida	4.5	1.7	2300	1.2
Sulfaguanidina	7.0	3.4	1600	1.1
Sulfamerazina	9.9	5.2	1700	1.1
Sulfametizole	5.0	2.1	1800	1.1
Sulfametoxazole	13.2	7.3	1700	1.3
Sulfatiazole	11.6	6.5	1000	1.0

7.5.2. Comportament de la senyal de fons de la llet

Si s'injecta una mostra de llet que no conté cap SA en la fase mòbil òptima (0.08 M SDS–8.5% propanol–pH 7), i es monitoritza a 260 nm (longitud d'ona de màxima absorció de les SAs sense derivatitzar), el cromatograma obtingut mostra diversos pics per davall de 4 minuts corresponents als principals components de la llet, incloent les proteïnes (figura 7.3a) [37]. D'altra banda, el cromatograma de la mateixa mostra de llet derivatitzada, si es monitoritza a 490 nm mostra tres xicotets pics a 1.5, 2.0 i 3.6 minuts (figura 7.3b). Cal ressenyar que s'ha realitzat un canvi d'escala en la figura 7.3b respecte a la figura 7.3a perquè els pics pogueren observar-se. Aquests corresponen a diversos compostos endògens de la llet que experimenten la reacció de derivatització, però allò important és que no interfereixen en la determinació de les SAs. La figura 7.3c mostra un cromatograma de llet derivatitzada addicionada amb les sis SAs en una concentració de 25 ng/mL.

7.5.3. Validació del mètode

Es va seguir la guia de validació *International Conference on Harmonisation* (ICH) [38]. Es van construir rectes de calibratge per a les SAs en els següents intervals de concentració: 0.2–20 µg/mL per a sulfacetamida, sulfamerazina, sulfametizole, i sulfametoxazole, i 0.2–10 µg/mL per a sulfaguanidina i sulfatiazole, a partir d'injeccions per triplicat de 9 i 8 dissolucions, respectivament, a concentracions creixents ($R^2 > 0.9999$) i es van mesurar les àrees dels pics cromatogràfics.

Es van calcular els límits de detecció (LODs) i de quantificació (LOQs) aplicant els criteris $3s$ i $10s$, respectivament, a partir de la desviació estàndard d'injeccions per decuplicat de mostres de llet que contenen una quantitat molt xicoteta de cada SA. En la taula 7.2 es mostren les característiques analítiques significatives obtingudes per a les SAs estudiades. Els LODs van estar en l'interval 0.7–0.9 ng/mL, valors que són inferiors

als límits màxims residuals establits per la Comunitat Europea [5], i són comparables o fins i tot millors que els obtinguts en altres mètodes [4, 17, 37].

Les precisions intra i interdia, expressades com a desviació estàndard relativa (RSD, %), es mostren en la taula 7.3. Aquestes es van determinar a tres concentracions (una baixa, una altra intermèdia, i una altra alta), d'acord amb el rang establert en les rectes de calibratge de cadascuna de les SAs. La precisió intradia es va calcular mesurant les àrees dels pics cromatogràfics obtinguts després de 10 injeccions consecutives de les tres dissolucions indicades anteriorment en el mateix dia, mentre que els valors interdia es van prendre durant 10 dies en un període de 3 mesos, a les tres mateixes concentracions. Els valors de precisió intradia van oscil·lar entre 0.4–2.7%, i els corresponents a la precisió interdia entre 0.3–3.7%. Aquests valors indiquen que la variabilitat entre les dades és molt xicoteta a les tres concentracions estudiades.

Taula 7.2. Característiques analítiques significatives obtingudes en la determinació de les sis SAs.

Compost	$a \pm SD^a$	$b \pm SD^a$	n	R^2	LOD (ng/mL) ^b	LOQ (ng/mL) ^b
Sulfacetamida	109.8 ± 0.3	-3.3 ± 2.4	9	0.9999	0.8	2.7
Sulfaguanidina	124.54 ± 0.11	-5.3 ± 0.6	8	0.9999	0.7	2.4
Sulfamerazina	96.10 ± 0.18	1.2 ± 1.5	9	0.9999	0.9	3.1
Sulfametizole	109.93 ± 0.07	-4.9 ± 0.6	9	0.9999	0.8	2.7
Sulfametoxazole	113.03 ± 0.15	0.8 ± 1.2	9	0.9999	0.8	2.7
Sulfatiazole	121.83 ± 0.12	-4.1 ± 0.6	8	0.9999	0.7	2.5

^a Paràmetres de calibratge: Àrea = $a C$ (ng/mL) + b ; SD = desviació estàndard ; R^2 = coeficient de determinació.

^b Límits de detecció i quantificació en llet obtinguts a partir de 10 rèpliques a una concentració baixa de SAs

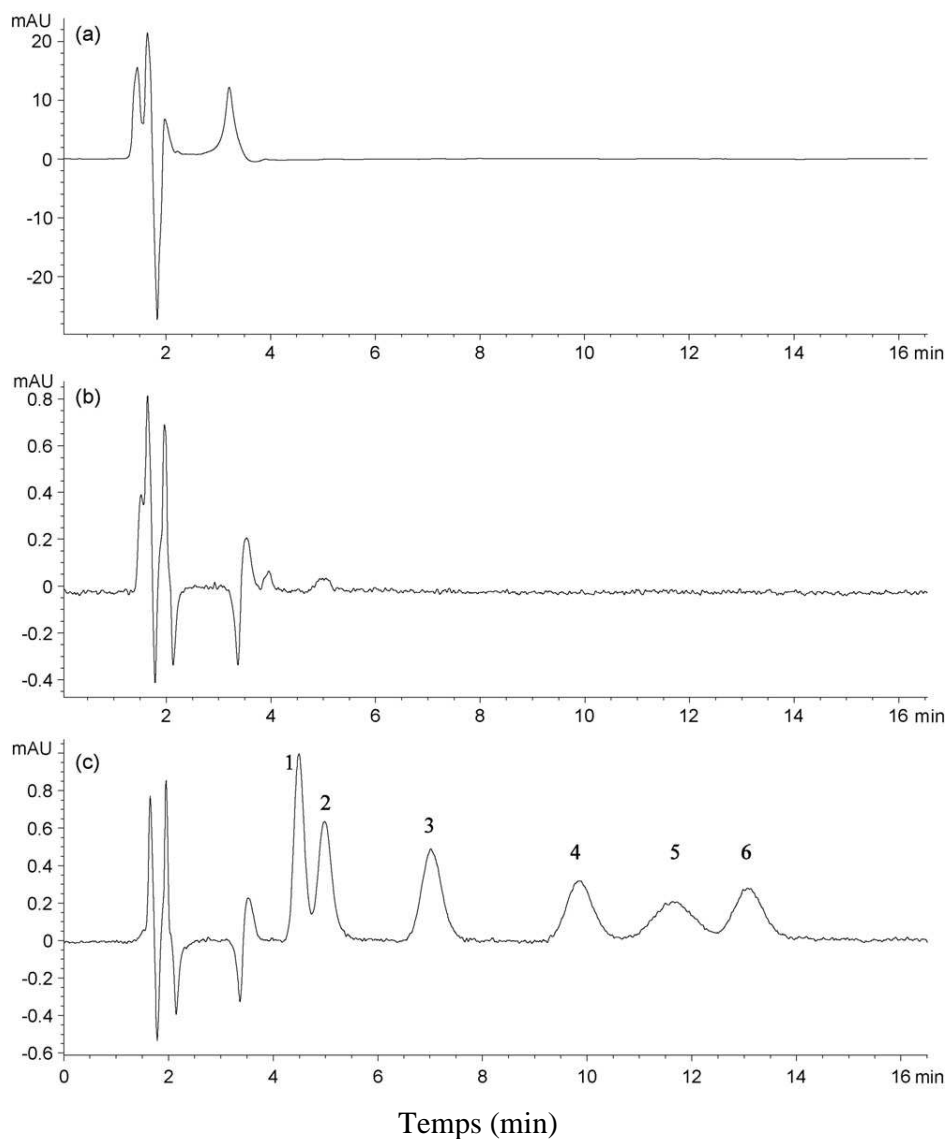


Figura 7.3. Cromatogrames de: (a) blanc de llet sense derivatitzar ($\lambda = 260$ nm), (b) blanc de llet sotmès a derivatització ($\lambda = 490$ nm), i (c) llet addicionada amb 25 ng/mL de cadascuna de les SAs i sotmesa a derivatització. Les SAs i els seus temps de retenció (t_R , min) són: (1) sulfacetamida, 4.5; (2) sulfametizole, 5.0; (3) sulfaguanidina, 7.0; (4) sulfamerazina, 9.9; (5) sulfatiazole, 11.6; i (6) sulfametoxazole, 13.2.

Taula 7.3. Precisió intra i interdia per a les sis SAs (RSD, %).

Compost	Intradia			Interdia		
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₁	c ₂	c ₃
Sulfacetamida	2.3	1.6	1.1	1.6	0.5	0.3
Sulfaguanidina	1.9	0.9	0.8	2.5	1.1	0.4
Sulfamerazina	1.9	0.4	1.0	3.1	1.0	0.3
Sulfametizole	1.5	0.7	0.8	3.7	0.6	0.3
Sulfametoxazole	1.7	0.7	0.5	2.1	0.8	0.6
Sulfatiazole	2.7	0.9	0.5	2.7	0.8	1.4

c₁, c₂ i c₃ són 0.4, 6 i 17.5 µg/mL, respectivament, per a sulfacetamida, sulfamerazina, sulfametizole, i sulfametoxazole; i 0.4, 6 i 10 µg/mL, respectivament, per a sulfaguanidina i sulfatiazole.

7.5.4. Determinació en mostres de llet adicionades

S'addicionaren mostres de llet amb SAs a tres concentracions diferents per avaluar la recuperació del mètode. En la taula 7.4 es mostren les recuperacions obtingudes a partir de triplicats de deu mostres que contenen les següents concentracions d'antibiòtics: 0.4, 6, i 17.5 µg/mL per a sulfacetamida, sulfamerazina, sulfametizole, i sulfametoxazole, respectivament, i 0.4, 6 i 10 µg/mL per a sulfaguanidina i sulfatiazole, respectivament. Les recuperacions van ser bones (83.7–103.0%), la qual cosa indica que el procediment de preparació de les mostres és adequat per a l'anàlisi de SAs en llet.

Taula 7.4. Recuperació de SAs en mostres de llet adicionades (n = 10) a tres concentracions diferents.

Compost	Recuperació (%) ^a		
	c ₁	c ₂	c ₃
Sulfacetamida	99.6 ± 1.9	97.3 ± 0.7	94.9 ± 1.0
Sulfaguanidina	95 ± 6	90 ± 3	83.7 ± 1.6
Sulfamerazina	99.5 ± 0.8	98.5 ± 1.4	103.0 ± 0.7
Sulfametizole	101.4 ± 0.7	91.7 ± 1.5	97.7 ± 1.2
Sulfametoxazole	93.0 ± 1.7	95.5 ± 1.4	95 ± 4
Sulfatiazole	95 ± 4	93.76 ± 0.18	100.6 ± 1.6

^a mitjana ± SD (n = 3). c₁, c₂ i c₃ son 0.4, 6 i 17.5 µg/mL per a sulfacetamida, sulfamerazina, sulfametizole, i sulfametoxazole, respectivament, i 0.4, 6 i 10 µg/mL per a sulfaguanidina i sulfatiazole, respectivament.

7.6. Conclusions

El mètode proposat en aquest capítol ofereix diversos avantatges. La formació d'azocolorants elimina el soroll de fons que mostra la matriu de llet, la qual cosa millora la selectivitat de les determinacions quan s'efectua la injecció directa d'aquestes en el cromatògraf. Malgrat que l'etapa de derivatització consumeix temps, l'estabilitat dels azocolorants permet el tractament simultani d'un gran nombre de mostres, que poden ser analitzades al llarg d'una jornada de treball. Aquest mètode no requereix un procediment complex de tractament de la mostra, com per exemple una extracció prèvia, ni tampoc grans volums de mostra ni de dissolvents orgànics. Els resultats indiquen que el procediment descrit és útil per al seguiment i quantificació de les sis SAs estudiades en llet. El temps total d'anàlisi és inferior a 16 min, amb LODs i LOQs que són menors o semblants als valors descrits en la literatura. Finalment, es pot concloure que el mètode d'MLC desenvolupat és simple, té un baix nivell de toxicitat i un baix risc de contaminació per al medi ambient pel reduït ús de dissolvents orgànics.

7.7. Referències

1. D.E. Dixon Hollan, S.E. Katz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1991) 784.
2. C. Cavaliere, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 558.
3. M.R.S. Futh, S.Y. Chu, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 215.
4. A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259.
5. Establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Council Regulation No. 2377/90 of EEC.
6. 22nd FAO Regional Conference for Europe, Juliol 2000.
7. C. Hartig, T. Storm, M. Jekel, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 163.
8. N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 898 (2000) 185.
9. N. Furusawa, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 235.

10. G. Stoev, A. Michailova, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 37.
11. Y. Wen, M. Zhang, Q. Zhao, Y.Q. Feng, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 8468.
12. G. Cargnan, K. Carrier, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1991) 479.
13. J.A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 127.
14. M.T. Ackermans, J.L. Beckers, F.M. Everaerts, H. Hoogland, M.J.H. Tomassen, *J. Chromatogr. A* 596 (1992) 101.
15. A.L. Bricio Santos, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 26 (2005) 1567.
16. C.E. Lin, W.C. Lin, Y.C. Chen, S.W. Wang, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 37.
17. N. Furusawa, K. Kishida, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 1031.
18. D.W. Armstrong, F. Nome, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1662.
19. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
20. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Gil Agustí, M. Capella Peiró, D. Bose. *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
21. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 187.
22. J.R. Torres Lapasió, *Michrom Software*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
23. A. Martinavarro Domínguez, M.E. Capella Peiró, M. Gil Agustí, J. Marcos Tomas, J. Esteve Romero, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1696.
24. M.E. Capella Peiró, D. Bose, A. Martinavarro Domínguez, M. Gil Agustí, J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 241.
25. M.E. Capella Peiró, M. Gil Agustí, A. Martinavarro Domínguez, J. Esteve Romero, *Anal. Biochem.* 309 (2002) 261.
26. M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, A. Martinavarro Domínguez, J. Esteve Romero, *Chromatographia* 57 (2003) 51.

27. J. March, *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and Structure*, 5a ed., Wiley-Interscience, Nova York, EUA, 2001.
28. L.G. Wade Jr., *Organic Chemistry*, 4a ed., Prentice Hall, Nova Jersey, EUA, 1999.
29. M.C. García Álvarez-Coque, E.F. Simó Alfonso, G. Ramis Ramos, J. Esteve Romero, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 237.
30. E.F. Simó Alfonso, G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, J. Esteve Romero, *J. Chromatogr. B* 670 (1995) 183.
31. J. Esteve Romero, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 29.
32. G. Ramis Ramos, J.S. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 223 (1989) 327.
33. J. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, *Talanta* 38 (1991) 1285.
34. J. Esteve Romero, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, *Anal. Chim. Acta* 235 (1990) 317.
35. J. Esteve Romero, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, *Talanta* 40 (1993) 1711.
36. S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, E.F. Simó Alfonso, J. Esteve Romero, *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 215.
37. R.D. Caballero, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 117.
38. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005).

Capítol 8

Control de quinolones en mostres de llet i ou mitjançant cromatografia líquida utilitzant fases mòbils que contenen un tensioactiu

8.1. Resum

En aquest capítol es presenta un procediment cromatogràfic senzill que fa ús d'una fase mòbil micel·lar per a la determinació en mostres de llet i ou de quatre quinolones (danofloxacina, difloxacina, flumequina, i marbofloxacina). En el mètode que es proposa, no va ser necessària cap extracció per precipitar les proteïnes de les matrius, ja que aquestes són solubilitzades per les micel·les. Les úniques etapes de pretractament requerides abans de la injecció de les mostres en el sistema cromatogràfic van ser: homogeneïtzació, dilució i filtració. Es va obtenir una resolució adequada de les quinolones mitjançant un procediment quimiomètric en què en un primer pas es modelitza la retenció utilitzant els factors de retenció dels compostos obtinguts en només cinc fases mòbils. Després, es va aplicar un criteri d'optimització que considera la posició i forma dels pics cromatogràfics. La separació analítica es va dur a terme amb una columna C18, una fase mòbil micel·lar híbrida de 0.05 M dodecilsulfat sòdic–10% (v/v) butanol i 0.5% (v/v) trietilamina tamponada a pH 3 i detecció fluorimètrica. Les quinolones van ser eluïdes en menys de 15 minuts sense observar-se cap interferència per part de les proteïnes o altres compostos endògens de les matrius d'aliments. Es van calcular una sèrie de paràmetres rellevants per a la validació, per exemple, límit de decisió (CC_{α}), capacitat de detecció (CC_{β}), repetibilitat, reproductibilitat, recuperacions i robustesa, seguint les directrius de la Decisió de la Comissió Europea 2002/657/CE. Finalment, el mètode proposat es va aplicar en la quantificació de les quatre quinolones estudiades en matrius de llet i ou.

8.2. Introducció

Els medicaments administrats a animals s'han convertit en una part integral de la producció ramadera i exerceixen un paper important en el seu benestar, principalment en la prevenció de malalties, cura d'infeccions, control del risc de transmissió de malalties als éssers humans i l'augment de la capacitat productiva dels animals. L'ús rutinari d'aquest tipus de medicaments amb aquesta finalitat pot originar la presència de residus en productes alimentaris d'origen animal si no es respecten els temps adequats en l'eliminació dels antibiòtics, la qual cosa pot induir la resistència dels patògens als antibiòtics utilitzats en humans [1, 2]. Els programes de control d'aliments tenen com a objectiu fer complir la legislació sobre residus dels medicaments en productes d'origen animal i depenen en gran mesura de la disponibilitat de mètodes ràpids i precisos per a la detecció analítica. Per tal de protegir els consumidors de l'exposició a nivells residuals que podrien resultar un risc per a la salut, la Unió Europea ha introduït una legislació relativa a l'autorització de medicaments veterinaris i ha establert nivells màxims residuals (*maximum residue limit*, MRL) d'aquests fàrmacs en diferents teixits d'origen animal de consum humà [3, 4]. Per tant, hi ha una necessitat contínua de desenvolupar nous mètodes analítics fiables per determinar el compliment de les regulacions tant nacionals com internacionals en totes les àrees de qualitat i seguretat alimentària.

Les quinolones són un grup d'agents antibacterians estructuralment relacionats i d'ús comú en medicina i veterinària. Els derivats piperazinil 6-fluorats, les fluoroquinolones, ofereixen una àmplia gamma d'activitats antibacterianes i han sigut cada vegada més utilitzades en veterinària a causa de la seua eficàcia en el tractament d'infeccions bacterianes [5]. Els antibiòtics són essencials per al control de mastitis i altres problemes bacterians en els ramats [6, 7], i el seu pas a la llet pot causar grans problemes en productes lactis. Aquesta intolerància dels residus d'antibiòtics es deu al fet que hi ha persones adultes que tenen hipersensibilitat als antibiòtics, reaccions al·lèrgiques, i fins i tot la ingestió d'aquests residus pot ocasionar-los la mort [6]. A més, l'ús de quinolones en gallines s'ha prohibit en la Unió Europea [4] a causa de la possibilitat que els seus

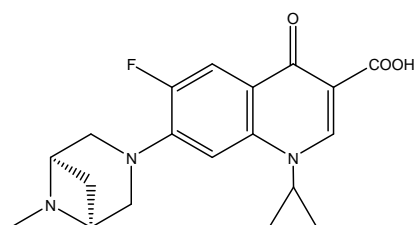
residus antimicrobians es transferisquen i es depositen en els ous destinats al consum humà.

La determinació de les quinolones en mostres d'aliments requereix una etapa d'extracció de l'analit de la matriu, seguit de diferents etapes de neteja com ara l'extracció líquid-líquid (*liquid-liquid extraction*, LLE) [8, 9], extracció en fase sòlida (*solid-phase extraction*, SPE) [10, 11], la diàlisi [12] i l'extracció amb fluids supercrítics (*supercritical fluid extraction*, SFE) [13]. Recentment, Kinsella *et al.* van realitzar una revisió exhaustiva sobre les tendències actuals en la preparació de mostres per aïllar medicaments veterinaris i promotors del creixement dels aliments. La cromatografia de flux turbulent acoblada a un tàndem d'espectrometria de masses (*turbulent flow chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, TFC-LC-MS/MS) és una tècnica que elimina les etapes de neteja que tant de temps consumeixen, incrementa la productivitat i redueix el consum de dissolvent sense perjudicar-ne la sensibilitat o productivitat [14]. En aquest sentit, Stolker *et al.* han desenvolupat un mètode que automatitza el procediment d'extracció [15]. En relació amb la tècnica de separació, l'electroforesi capil·lar (*capillary electrophoresis*, CE) i la cromatografia líquida d'alta resolució (*high performance liquid chromatography*, HPLC) són les tècniques més utilitzades. La CE [16, 17] s'ha convertit en una tècnica de separació de gran potencial atès que els temps d'anàlisi són menors que aquells que s'obtenen en l'HPLC, i a més a més són necessaris menors volums dels reactius i de les mostres. No obstant això, a causa del baix volum de mostra requerit per a la injecció, la sensibilitat obtinguda no és tan bona, per la qual cosa l'HPLC continua sent la tècnica més usada. Recentment s'han publicat molts estudis sobre l'anàlisi multi-residu de quinolones en llet [18–24] i ous [24–30]. La majoria dels mètodes de l'HPLC utilitzen detecció UV [18, 21, 24, 25], fluorescència [18, 20, 26], o espectroscòpia de masses [18, 19, 22–24, 27–30].

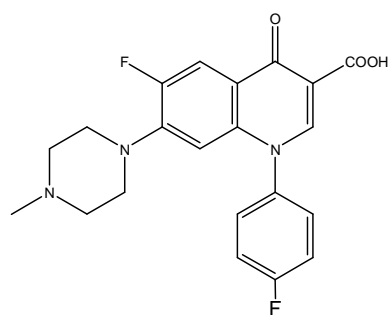
La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC), que fa ús d'una dissolució de tensioactiu com a fase mòbil a una concentració superior a la micel·lar crítica, és una alternativa a l'HPLC convencional. L'MLC permet analitzar

mostres biològiques o d'aliments sense haver d'eliminar les proteïnes i altres substàncies que interfereixen i, per tant, redueix el cost i el temps d'anàlisi considerablement. Aquesta tècnica permet l'elució simultània d'analits hidrofòbics i hidrofílics [31] sense ser necessari un gradient d'elució. El comportament estable i reproduïble de les fases mòbils micel·lars permet la predicció exacta de la retenció dels soluts fent ús d'un model que també pot ser utilitzat per optimitzar la separació de mesclures de soluts [29]. A més, una de les principals aplicacions de l'MLC és la possibilitat de la injecció directa de la mostra gràcies a la capacitat que tenen els agregats micel·lars per dissoldre les proteïnes i altres compostos de la matriu.

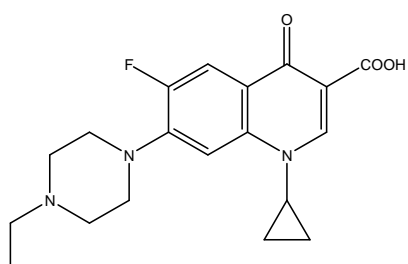
En aquest capítol es presenta un mètode senzill, selectiu i sensible de cromatografia líquida amb detecció fluorescent per a la determinació simultània de quatre fluorquinolones: danofloxacina, difloxacina, flumequina i marbofloxacina (figura 8.1) en mostres d'aliments (llet i ou), utilitzant una fase mòbil que conté un tensioactiu. D'acord amb el Regulació de la Unió Europea [4], els MRL de les quinolones estudiades en llet bovina, ovina i caprina són de 30 µg/kg per a danofloxacina, 50 µg/kg per a flumequina, i 75 µg/kg per a marbofloxacina. Atès que aquesta regulació de la Unió Europea no estableix l'MRL per a difloxacina, aquest va ser seleccionat com 100 µg/kg. Les quinolones estan prohibides en els ous d'aus de corral, i per tant no s'ha establert cap valor d'MRL. En aquest cas, es va decidir mantenir els mateixos valors d'MRL establerts en la llet. Les mostres van ser injectades directament en el sistema cromatogràfic després de la corresponent dilució i filtració. El mètode proposat es va aplicar per a la determinació d'aquests antibiòtics en un gran nombre de mostres de llet i ous adquirides en diferents supermercats.



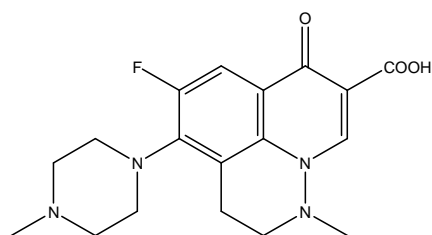
Danofloxacin



Difloxacin



Flumequinone



Marbofloxacin

Figura 8.1. Estructures de les quatre quinolones estudiades.

8.3. Part experimental

8.3.1. Reactius

Els antibiòtics flumequina (FLU) i marbofloxacina (MAR) es van comprar a Sigma (St. Louis, MO, EUA). Difloxacina (DIF) i danofloxacina (DAN) van ser adquirits de Fluka (Buchs SG, Suïssa). Dodecilsulfat sòdic (SDS) i l'hidròxid de sodi es van adquirir de Merck (Darmstadt, Alemanya). Dihidrogenfosfat de sodi, 1-propanol i 1-butanol es van obtenir de Scharlab (Barcelona). Àcid clorhídric, metanol, etanol i trietilamina es van obtenir de J.T. Deventer Baker (Països Baixos). Es va utilitzar aigua destil·lada desionitzada en la preparació de totes les dissolucions (Millipore SAS, Molsheim, França). Els filtres de niló es van obtenir d'una banda de Sartorius-Stedim (Goettinge, Alemanya) i d'una altra de Micron separacions (Westboro, MA, EUA). La majoria de les mostres de llet bovina i caprina, així com les mostres d'ous van ser comprades en diferents supermercats.

8.3.2. Instrumentació i condicions cromatogràfiques

Es va utilitzar el mateix cromatògraf descrit en el capítol 5 (model 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), proveït d'una bomba quaternària, un mostrejador automàtic, un compartiment termostatitzat per a la columna, i un detector de fluorescència. El control instrumental i l'adquisició dels senyals analítics es van realitzar mitjançant un PC connectat al cromatògraf a través d'una estació de dades d'Agilent (Rev. B.03.01). Les dades cromatogràfiques van ser tractades amb el programari *Michrom* [32], incloent la mesura dels pics i l'obtenció de la composició de la fase mòbil òptima.

La balança analítica, el pH-metre, l'agitador vòrtex, i la unitat d'ultrasons també van ser els mateixos que els descrits en els capítols anteriors.

Es va utilitzar una columna analítica Kromasil C18 (150 mm × 4.6 mm de diàmetre intern, i 5 µm de grandària de partícula) (Scharlab) per a la separació de les quinolones estudiades. La detecció per fluorescència es va realitzar aplicant el següent programa als temps i longituds d'ona d'excitació/emissió indicats: 0–9.30 min, 260/366 nm per a FLU, i 9.30–20 min: 280/450 nm per a DAN, DIF i MAR. El flux de la fase mòbil va ser d'1 mL/min, el volum d'injecció 20 µL i la temperatura de la columna es va mantenir a 25 °C. La fase mòbil utilitzada va ser 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% trietilamina tamponada a pH 3 amb 0.01 M NaH₂PO₄. La fase mòbil es va filtrar a través d'una membrana de niló 0.45 µm (Sartorius-Stedim).

8.3.3. Preparació de dissolucions estàndard i fases mòbils

Les fases mòbils micel·lars es van preparar pesant les quantitats apropiades d'SDS i dihidrogenfosfat sòdic. Aquests reactius es van dissoldre en aigua destil·lada desionitzada i es va afegir un 0.5% (v/v) de trietilamina, ajustant tot seguit el pH al valor desitjat. Després es va afegir butanol per aconseguir la concentració desitjada de dissolvent orgànic i finalment es va aforar amb aigua.

Es van preparar dissolucions patró de les quinolones (DAN, DIF, FLU i MAR) en una concentració de 10 µg/mL, dissolent les substàncies pures en un 5% d'etanol amb l'ajuda d'un bany d'ultrasons, i finalment aforant-les amb una dissolució 0.05 M SDS–pH 3. Aquestes dissolucions van ser emmagatzemades a 4 °C fins el seu ús. Les dissolucions patró de treball es van preparar a diari a partir de dilucions adequades de les dissolucions patró concentrades. Totes les dissolucions es van filtrar directament en els vials a través de filtres de niló 0.45 µm (Micron separacions) abans de l'anàlisi.

8.3.4. Preparació de mostres de llet i ou

Les mostres de llet i ou es van homogeneïtzar i després es van prendre alíquotes (5 mL de llet líquida i 10 mL d'ou) que es van aforar a 25 mL amb una dissolució 0.05 M SDS-pH 3. La dissolució final va ser agitada contínuament durant 2 min. A continuació, el sobrenadant es va filtrar a través de filtres de xeringa de niló 0.45 µm (Micron separacions) per a les mostres de llet, mentre que es va utilitzar una bomba de buit amb filtres de niló de 0.45 µm per a les mostres d'ou (Sartorius-Stedim). Les dissolucions filtrades es van col·locar directament en els vials de l'automostrejador.

8.3.5. Validació del mètode

El mètode va ser validat per complir els criteris especificats per la Decisió de la Comissió Europea 2002/657/CE [33]. En els estudis de validació es van emprar mostres de llet i ou addicionades. Es van determinar els següents paràmetres: selectivitat, linealitat, límit de decisió (CC_{α}), capacitat de detecció (CC_{β}), límits de detecció i quantificació, recuperacions, exactitud i precisió. També es va incloure l'estudi de la robustesa. Cal puntualitzar que els valors dels paràmetres estudiats no depenen de la matriu analitzada, la qual cosa es va comprovar analitzant diferents mostres de llet i ou.

8.4. Resultats i discussió

8.4.1. Fluorescència de les quinolones

Es van obtenir els espectres d'excitació i d'emissió de les quinolones en dissolucions d'SDS tamponades a pH 3. Es va trobar un màxim d'excitació adequat per a totes les quinolones a 280 nm, mentre que el màxim d'emissió es va situar a 445 ± 60 nm. Les longituds d'ona d'excitació (nm) i d'emissió (nm) per a cada quinolona van ser: 280/450 per a DAN, 280/450 per a DIF, 280/366 per a FLU, i 280/514 per a MAR. Finalment, les

longituds d'ona seleccionades per a la detecció van ser $\lambda_{\text{exc}} = 260$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 366$ nm per a FLU i, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm per a DAN, DIF i MAR.

8.4.2. *Optimització de les condicions cromatogràfiques*

a) *Selecció del pH*

En els medis micel·lars, els valors de les constants de dissociació poden canviar respecte als corresponents valors en aigua pura. Diversos estudis han demostrat el canvi que experimenten aquests valors d'alguns compostos en determinats tensioactius catiónics, aniònics i no iònics [34]. La variació del pH de la fase mòbil contribueix a la capacitat de separació dels compostos que tenen valors intermedis de constants de dissociació. Les diferències entre aquests valors s'han atribuït a les propietats del dissolvent en les fases i interfases (entenen com a interfase la separació que hi ha entre la pseudofase aquosa i la pseudofase micel·lar), que inclou una contribució del potencial de la superfície micel·lar en el cas de les micel·les carregades. Els tensioactius aniònics en dissolucions micel·lars incrementen l'estabilitat de les espècies protonades dels compostos i, en conseqüència, les seues constants de protonació.

L'estructura de les quinolones estudiades posseeix grups àcids i bàsics (figura 8.1) amb valors de constants de dissociació $pK_{a1} \approx 5.5-6.6$ i $pK_{a2} \approx 7.2-8.9$ [35]. Les quinolones existeixen en la seua forma catiónica a pH àcid, en la seua forma aniònica a pH bàsic, i en la forma zwitteriònica a pH neutre. La retenció de les quinolones disminueix quan augmenta el pH de la fase mòbil, i elueixen en el volum mort a pH 7. Es va obtenir la millor resolució, així com temps de retencions adequats per a les quatre quinolones a pH 3, per la qual cosa aquest va ser finalment seleccionat per a l'anàlisi de les quatre quinolones.

b) Comportament cromatogràfic de les quinolones

La retenció de les quinolones en una columna C18 amb fases mòbils que sols contenen SDS (sense dissolvent orgànic) va ser relativament elevada i va estar en consistència amb els valors dels seus coeficients de repartiment octanol-aigua, que oscil·len entre 0.89 i 1.6 [36, 37]. Per tant, va ser necessària l'addició d'un dissolvent orgànic per reduir els temps de retenció. L'ús de fases mòbils micel·lars híbrides a concentracions variables de tensioactiu i dissolvent orgànic generalment comporta canvis en els factors de retenció (k), les eficàcies (N) i les asimetries (B/A) dels pics cromatogràfics. Un control adequat de les concentracions d'ambdós additius és necessari per aconseguir cromatogrames amb una bona resolució i amb una força d'elució suficient. En aquest cas, es van considerar propanol, butanol i pentanol. És important tenir en compte que la selecció de l'alcohol està directament relacionada amb la polaritat dels compostos en estudi, i per tant, es va preferir l'ús de propanol o butanol perquè presentaven una força d'elució moderada. En eluir les quinolones amb aquests alcohols, s'obté que el propanol dona millors eficàcies però la retenció és major en comparació amb el butanol. D'altra banda, els pics dels compostos se separen satisfactòriament amb temps de retenció adequats quan s'empra butanol, i per aquesta raó, es van utilitzar fases mòbils d' SDS-butanol a pH 3 per a l'optimització. Habitualment, s'afegeix trietilamina (TEA) a les fases mòbils aquo-orgàniques convencionals per reduir la cua dels pics de compostos bàsics a valors de pH àcids (2.5–4.0), així com millorar-ne l'eficàcia. Tanmateix, els temps de retenció també canvien en presència de l'amina, els quals disminueixen per a tots els compostos. Tenint això en compte, es va considerar adequat afegir TEA per a la determinació de les quinolones. En absència de TEA, els factors d'asimetria (B/A) dels compostos va ser superior a 2.5, és a dir, els pics cromatogràfics eren molt asimètrics, mentre que en afegir TEA, els pics resultaren pràcticament simètrics. El procés d'optimització es va dur a terme amb un 0.5% de TEA en les fases mòbils. Aquesta quantitat tan menuda, sols modifica lleugerament la retenció de les

quinolones. La concentració de TEA seleccionada proporciona unes asimetries, eficàcies i retencions adequades.

c) *Selecció de la fase mòbil*

En cromatografia líquida, les estratègies d'optimització d'interpretativa poden ser més eficaces i fiables que els mètodes seqüencials. Aquestes estratègies poden ser assistides mitjançant una simulació per ordinador que pot imitar la metodologia seguida pels cromatografistes experimentats, però en menys temps i esforç. La fase mòbil òptima per a l'anàlisi es va seleccionar fent ús del programari *Michrom* [32]. Aquest programari permet l'observació gràfica dels canvis en els cromatogrames quan l'usuari varia progressivament tant la concentració de dissolvent orgànic com la del tensioactiu. El model matemàtic utilitzat per descriure el comportament de retenció dels compostos eluïts va ser el mateix descrit en els capítols 4–7 (equació 7.1) [31]. La determinació dels paràmetres de l'equació 7.1 requereix les dades de retenció obtingudes a partir d'un disseny experimental que ha d'incloure com a mínim cinc fases mòbils. Els errors de predicció que es van obtenir van ser menors del 5%.

La descripció de la forma del pic (necessari per a la simulació de cromatogrames amb pics asimètrics) es va realitzar amb un model gaussià modificat. En aquest model, una equació lineal substitueix la desviació estàndard de la corba de Gauss [38]:

$$h(t) = H e^{(-1/2)(|t-t_R|/|s_0+s_1(t-t_R)|)^2} \quad (8.1)$$

on H és l'alçada del pic, t_R el temps de retenció, s_0 una mesura de l'amplada del pic en el màxim, i s_1 un factor que quantifica la distorsió de pic. Els coeficients d' s_0 i s_1 es van calcular mitjançant la interpolació de les eficàcies i els factors d'asimetria obtinguts en les fases mòbils del disseny experimental dels soluts.

El disseny experimental utilitzat per a les quatre quinolones va consistir en cinc fases mòbils, quatre ubicades en els vèrtexs d'un espai factorial rectangular i la cinquena en el centre. Els límits de les concentracions per a SDS i butanol estan compresos en els intervals de 0.05–0.15 M i 2–10%, respectivament. Aquestes concentracions es van seleccionar considerant que s'han d'evitar temps de retenció excessius o una elució dels compostos pròxima al temps mort. La fase mòbil òptima per a l'anàlisi de les quinolones s'ha d'obtenir considerant un criteri de separació completa (resolució màxima), en un temps d'anàlisi adequat.

La figura 8.2 mostra el diagrama de la resolució global. L'examen de la superfície de resposta posa de manifest la complexitat de la separació de la mescla. La resolució va ser molt baixa en quasi tot l'espai de les variables considerat, a causa del solapament freqüent entre dos o més dels compostos. A més a més, cal assenyalar que es va produir una inversió en l'ordre d'elució dels compostos en tot l'espai en variar les concentracions de tots dos factors, tensioactiu i dissolvent orgànic, la qual cosa dificulta l'obtenció de la composició de la fase mòbil òptima (p.ex., FLU i MAR d'una banda, i DAN i DIF d'altra, van canviar el seu ordre d'elució a altes concentracions de tensioactiu i baixes concentracions de dissolvent orgànic). Aquests canvis en l'ordre d'elució va donar lloc a nombrosos solapaments entre pics en tot l'espai de factors i, per tant, a una roïna resolució. Sols es va aconseguir una resolució satisfactòria en una regió estreta de concentracions d'SDS entre 0.05–0.057 M, i 4.4–10% de butanol. La fase mòbil seleccionada va ser 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% TEA on les quinolones es resolen en menys de 15 min. Els paràmetres cromatogràfics obtinguts (t_R , k , N i B/A) en aquesta fase mòbil van ser: 10.7, 5.6, 2400 i 1.4 per a DAN, 13.0, 7.0, 1900 i 1.6 per a DIF, 7.2, 3.4, 1300 i 1.6 per a FLU, i 9.4, 4.8, 2600 i 1.3 per a MAR. Es va comprovar la capacitat de predicció de l'estratègia interpretativa mitjançant la comparació dels cromatogrames predit i experimental per a una mescla de les quatre quinolones eluïdes en la fase mòbil òptima, tot trobant-se uns resultats satisfactoris (figura 8.3).

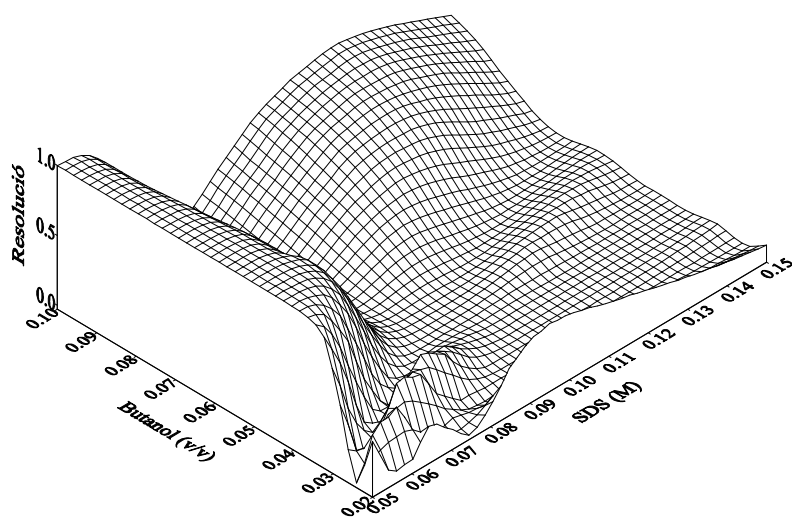
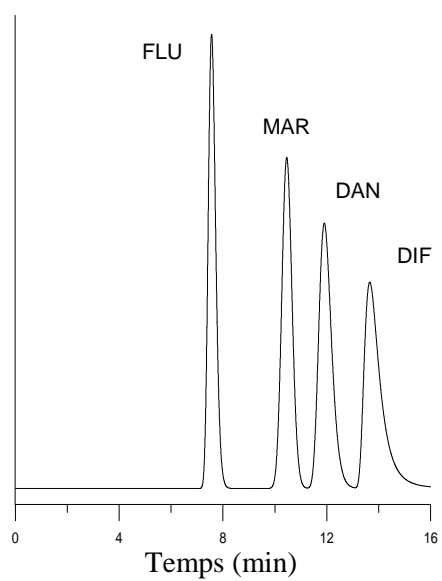


Figura 8.2. Diagrama de resolució global.

(a)



(b)

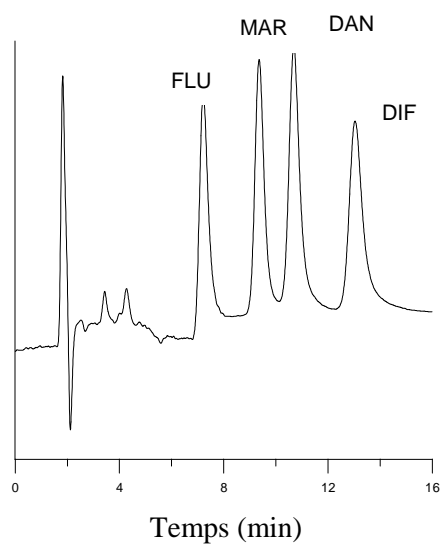


Figura 8.3. Cromatogrames predit (a) i experimental (b) d'una mescla de DAN (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DIF (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FLU (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i MAR (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Fase mòbil: 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% TEA–pH 3.

8.4.3. Validació del mètode

Es va realitzar la validació seguint les directrius de la Decisió de la Comissió Europea 2002/657/CE [33].

a) *Selectivitat*

La selectivitat es va determinar observant l'absència de qualsevol interferència que poguera aparèixer als temps de retenció dels antibiòtics estudiats, com es pot veure en els cromatogrames dels blancs de les figures 8.4 (superior) i 8.5 (superior). Per validar la selectivitat, es van analitzar 10 blancs de diferents llets i ous sense addicionar. En aquestes mostres, la corresponent banda de proteïnes i un gran nombre de pics desconeguts van aparèixer abans dels temps de retenció de les quinolones, i a més a més van estar suficientment separats dels mateixos per evitar qualsevol solapament. També es van addicionar agents estabilitzants (etanol) i altres quinolones utilitzades en els tractaments d'espècies bovina, ovina i caprina (àcid oxolínic i sarafloxacina) als seus corresponents valors d'MRL (100 i 30 µg/kg, respectivament) en mostres de llet i ou per avaluar la seua possible interferència en el mètode. Cap dels compostos va eluir al temps de retenció de les quinolones estudiades.

b) *Linealitat*

La linealitat del mètode d'anàlisi va ser estudiada en set concentracions diferents (injectant cadascuna per sextuplicat): límit de quantificació (LOQ), $0.5 \times \text{MRL}$, $1 \times \text{MRL}$, $1.5 \times \text{MRL}$, $2 \times \text{MRL}$, $4 \times \text{MRL}$, i $6 \times \text{MRL}$ en mostres de llet i ou (amb factors de dilució d'1:5 i 1:10, respectivament), per cobrir tot el rang de treball. Els paràmetres de calibratge (pendent i ordenada en l'origen) es van obtenir mitjançant la representació de l'àrea del corresponent pic de les quinolones en funció de la seua concentració fent ús de l'anàlisi de regressió lineal per mínims quadrats. Els paràmetres ajustats es mostren en la taula 8.1. Els coeficients de determinació (R^2) van ser sempre superiors a 0.993.

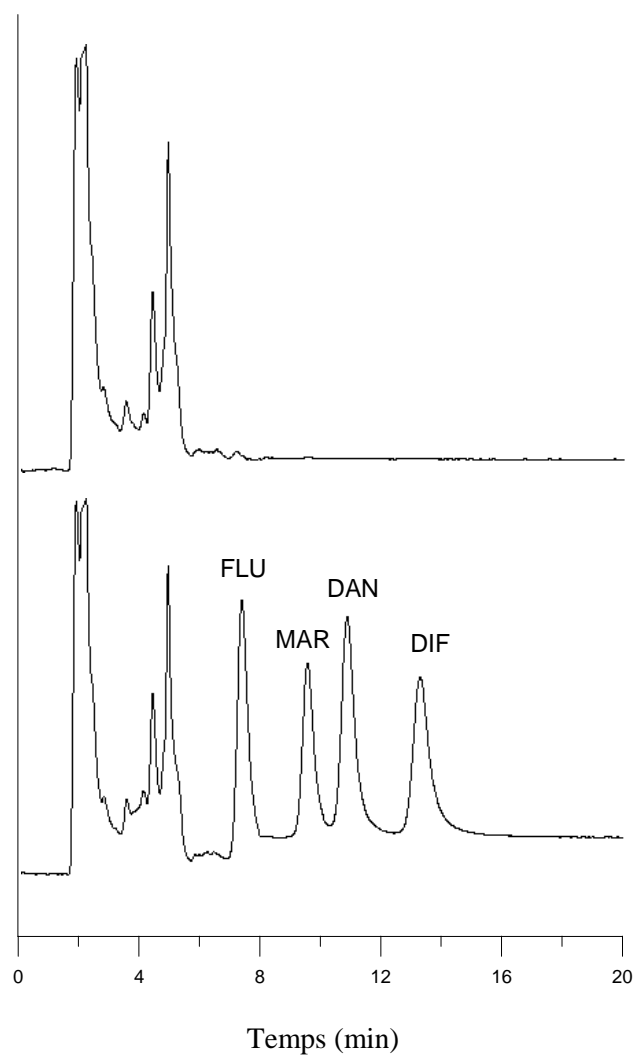


Figura 8.4. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra de llet addicionada ($1.5 \times \text{MRL}$) (inferior). Fase mòbil: 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% TEA–pH 3.

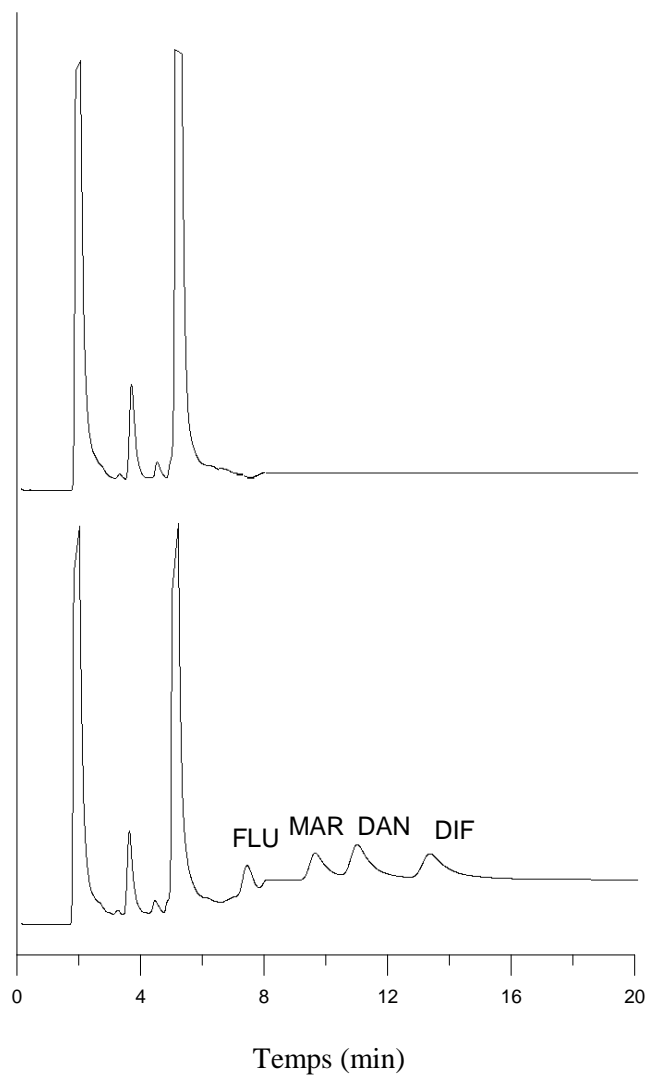


Figura 8.5. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra d'ou addicionada (MRL) (inferior). Fase mòbil: 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% TEA–pH 3.

c) Límits de detecció i quantificació

El límit de detecció (LOD) per a les quatre quinolones en mostres de llet i ou es va calcular amb el criteri $3s$, mentre que el límit de quantificació (LOQ) va ser seleccionat com la concentració més baixa utilitzada en la corba de calibratge. Si es té en compte que els MRL establits per a les quinolones en llet estan compresos entre 30 µg/kg per a DAN i 100 µg/kg per a DIF, el mètode proposat és prou sensible per a l'anàlisi dels antibiòtics estudiats en aquest tipus de mostres atès que els valors dels LOD i LOQ (taula 8.1) són més menuts que els MRLs establits per a aquests compostos en la Regulació de la Unió Europea 2377/90 [4].

d) Límit de decisió i capacitat de detecció

La Decisió Europea 2002/657/CE [33] en relació amb el funcionament dels mètodes analítics i la interpretació dels resultats, recomana calcular dos límits estadístics, CC_{α} (límit de decisió) i CC_{β} (capacitat de detecció), que avaluen les concentracions crítiques per damunt d'aquelles que el mètode és capaç de distingir més fiablement i quantificar una substància considerant la variabilitat del mètode i el risc estadístic de prendre una decisió equivocada. CC_{α} és el límit en el qual i per damunt del qual es pot concloure que una mostra no és compatible amb una probabilitat d'un error α , mentre que CC_{β} s'ha definit com el mínim contingut de la substància que pot ser detectat, identificat o quantificat en una mostra amb una probabilitat d'error β . Els valors de CC_{α} es van determinar a partir de l'anàlisi de blancs adicionats amb les quinolones a les respectives concentracions d'MRL. Els valors de CC_{α} van ser calculats com la mitjana de les concentracions trobades més 1.64 vegades la desviació estàndard (SD) corresponent (p.ex., $CC_{\alpha} = C_{\text{trobadada}} + 1.64 \cdot SD$). D'altra banda, els valors de CC_{β} es van obtenir com els nivells CC_{α} més 1.64 vegades la desviació estàndard corresponent. Es va realitzar un anàlisi estadístic de CC_{α} i CC_{β} a un nivell de confiança del 95% analitzant un mínim de 20 blancs per matriu adicionada. La taula 8.1 resumeix els valors CC_{α} i CC_{β} obtinguts per a cada quinolona en les mostres de llet i ou per a les concentracions de LOQ i MRL.

Taula 8.1. Dades de la regressió lineal, límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ), límits de decisió (CC_α) i capacitats de detecció (CC_β) calculats per als LOQ i MRL de les quinolones.

Analit	DAN	DIF	FLU	MAR
Rang lineal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.5–180	1–600	6–300	4–450
$a \pm SD^a$	22.3 ± 0.7	3.46 ± 0.19	0.179 ± 0.014	0.215 ± 0.007
$b \pm SD^a$	-87 ± 8	-56 ± 17	-2.0 ± 1.0	-0.5 ± 0.3
R^2	0.9930	0.9936	0.9958	0.9968
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.03	0.13	1.8	1.2
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.5	1	6	4
CC_α ($\mu\text{g}/\text{kg}$) LOQ	0.514 ± 0.014	1.07 ± 0.07	6.6 ± 0.6	4.6 ± 0.6
CC_α ($\mu\text{g}/\text{kg}$) MRL	30.18 ± 0.18	100.7 ± 0.7	51.9 ± 1.9	76.3 ± 1.3
CC_β ($\mu\text{g}/\text{kg}$) LOQ	0.529 ± 0.016	1.20 ± 0.12	6.9 ± 0.3	5.4 ± 0.8
CC_β ($\mu\text{g}/\text{kg}$) MRL	31.1 ± 0.9	102.6 ± 1.9	54.1 ± 2.2	79 ± 3

^a Paràmetres de calibratge: Àrea = $a C$ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) + b ; SD = desviació estàndard ; R^2 = coeficient de determinació.

e) Precisió i exactitud

Per avaluar la precisió intradia, es van preparar i analitzar tres grups de concentracions ($0.5 \times \text{MRL}$, $1 \times \text{MRL}$, i $1.5 \times \text{MRL}$). L'anàlisi intradia es va determinar a partir de la injecció d'aquestes tres dissolucions sis vegades en el mateix dia.

Per estudiar la reproductibilitat del mètode (repetitivitat entre dies), es va seguir el mateix procediment experimental durant cinc dies consecutius utilitzant les mateixes concentracions indicades anteriorment (mesurant sis mostres per dia, i analitzant-les per quintuplicat). La precisió (expressada com a percentatge de la desviació estàndard relativa, RSD) i l'exactitud (expressada com l'error relatiu, Er) es resumeixen en la taula 8.2. El mètode va resultar ser precís i exacte atès que els valors d'RSD (%) i Er (%) van ser inferiors al 8.2%.

Taula 8.2. Precisió i exactitud intra ($n = 6$) i interdia (en un període de cinc dies consecutius) per a la determinació de quinolones.

Analit	Concentració addicionada ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Trobada (mitjana \pm SD) ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Intradia	
			Exactitud Er (%)	Precisió RSD (%)
DAN	15	15.90 ± 0.10	6.0	0.6
	30	27.59 ± 0.11	8.0	0.4
	45	46.7 ± 1.1	3.8	2.4
DIF	50	51.5 ± 0.4	3.0	0.8
	100	100.9 ± 1.1	0.9	1.1
	150	137.4 ± 1.7	8.4	1.2
FLU	25	26.9 ± 1.1	7.6	4.1
	50	52.6 ± 0.6	5.2	1.1
	75	79.4 ± 1.4	5.9	1.8
MAR	37.5	34.8 ± 0.7	7.2	2.0
	75	72.8 ± 2.5	2.9	3.4
	112.5	121.6 ± 1.0	8.1	0.8

Taula 8.2. (continuació).

Analit	Concentració addicionada ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Interdia		
		Trobada (mitjana \pm SD) ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Exactitud Er (%)	Precisió RSD (%)
DAN	15	16.15 \pm 0.21	7.7	1.3
	30	27.9 \pm 0.8	7.0	2.9
	45	47.0 \pm 0.6	4.4	1.3
DIF	50	49 \pm 4	2.0	8.2
	100	99 \pm 6	1.0	6.1
	150	139.9 \pm 2.3	6.7	1.6
FLU	25	26.3 \pm 1.1	5.2	4.2
	50	51.6 \pm 2.2	3.2	4.3
	75	79.6 \pm 1.4	6.1	1.8
MAR	37.5	34.8 \pm 2.1	7.2	6.0
	75	70 \pm 3	6.7	4.3
	112.5	118 \pm 6	4.9	5.1

f) Robustesa

La robustesa d'un mètode analític és la mesura de la seua capacitat per romandre inalterat front a xicotetes, però deliberades variacions en els paràmetres del mètode, i indica la seua fiabilitat durant el seu ús quotidià. El primer pas en una prova de robustesa [39] és identificar els factors crítics que s'espera que influïsquen en el resultat del mètode. Normalment, en cromatografia líquida, es pot esperar que influïsquen aproximadament uns 50 factors en el mètode. No obstant, s'espera que només un xicotet grup d'aquests siga crític (per causar un efecte significatiu amb canvis xicotets). En aquest cas, es van seleccionar cinc factors per ser examinats en la prova de robustesa: a) concentració d'SDS, b) percentatge de butanol, c) pH del tampó usat en la fase mòbil, d) flux de la fase mòbil, i e) percentatge de TEA. L'efecte d'aquests factors s'interpreta, en aquest cas, com la desviació que duu a terme en la resposta dels valors modificats (−0.005 a +0.005 per a la concentració d'SDS; −0.05 a +0.05 per a TEA; i −0.1 a +0.1 per a la resta de paràmetres) en relació amb el nivell nominal (codificat com 0), i s'estima mitjançant la desviació estàndard relativa (taula 8.3).

Per estimar la robustesa del mètode, es van injectar en el sistema cromatogràfic sis rèpliques de les dissolucions estàndard de cada quinolona a la concentració del seu MRL per als nivells nominals i els nivells modificats de les variables estudiades. Per obtenir una visió més completa del mètode, cal mesurar qualsevol paràmetre útil. En HPLC, els paràmetres més rellevants són l'alçada i l'àrea dels pics, el temps de retenció i la resolució [39]. En aquest cas, es va avaluar l'efecte dels factors seleccionats sobre l'àrea del pic i el temps de retenció per a tots els analits, observant-se diferències insignificants en les àrees dels pics i una menor variabilitat en els temps de retenció. Els resultats, que es mostren en la taula 8.3, indiquen que els factors seleccionats romanen suficientment inalterats per les xicotetes variacions d'aquests paràmetres (RSD < 6%). Com calia esperar, el flux de la fase mòbil i la variació de la concentració d'SDS tenen una major influència en la retenció dels compostos estudiats (RSD < 10%), a diferència dels altres paràmetres.

g) Anàlisi de llet i ou

El mètode desenvolupat es va aplicar a la determinació de les quatre quinolones en mostres addicionades de llet i ou, la majoria de les quals es van obtenir en supermercats. Els ous de gallina van ser donats per una persona particular.

Les mostres s'addicionaren a tres concentracions de les quinolones: $0.5 \times \text{MRL}$, $1 \times \text{MRL}$, i $1.5 \times \text{MRL}$, injectant-se sis rèpliques de cada concentració. Les recuperacions es van calcular comparant els resultats analítics de les quinolones addicionades en mostres de llet i ou, amb estàndards preparats a la mateixa concentració. Els resultats obtinguts (taula 8.4) mostren unes recuperacions satisfactòries per a tots els compostos (94.3–113.7%). Les figures 8.4 (inferior) i 8.5 (inferior) mostren dos cromatogrames corresponents a diferents anàlisis cromatogràfiques de mostres addicionades de llet i ou amb les quatre quinolones, respectivament, i analitzades amb la fase mòbil òptima. Aquests resultats indiquen que el mètode cromatogràfic proposat pot aplicar-se a un programa de control de residus dels antibiòtics. No es van trobar proves de la presència de residus de les quinolones en cap de les mostres reals analitzades.

Taula 8.3. Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	DAN		DIF	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)					
0.045	-0.005	11.4	589.8	14.1	281.9
0.05	0	10.8	545.2	13.2	287.1
0.055	+0.005	9.9	616.7	11.9	253.1
Mitjana ± SD		10.7 ± 0.8	580 ± 40	13.1 ± 1.1	274 ± 18
RSD (%)		7.5	6.9	8.4	6.6
B: butanol (% v/v)					
9.9	-0.1	10.8	591.2	13.2	263.1
10.0	0	10.8	545.2	13.2	287.1
10.1	+0.1	10.4	592.1	11.4	290.6
Mitjana ± SD		10.6 ± 0.3	580 ± 30	12.6 ± 1.1	280 ± 15
RSD (%)		2.8	5.2	8.7	5.4
C: pH					
2.9	-0.1	10.8	576.8	13.6	288.4
3	0	10.8	545.2	13.2	287.1
3.1	+0.1	11.1	571.6	11.9	292.6
Mitjana ± SD		10.6 ± 0.3	564 ± 17	12.9 ± 0.9	289 ± 3
RSD (%)		2.8	3.0	7.0	1.0
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	10.9	533.8	13.2	267.4
1	0	10.8	545.21	13.2	287.1
1.1	+0.1	9.6	500.9	11.7	276.5
Mitjana ± SD		10.4 ± 0.7	527 ± 23	12.7 ± 0.8	277 ± 10
RSD (%)		6.7	4.4	6.3	3.6
E: TEA (% v/v)					
0.45	-0.05	11.2	597.3	13.8	278.6
0.5	0	10.8	545.21	13.2	287.1
0.55	+0.05	10.5	607.4	12.9	313.5
Mitjana ± SD		10.8 ± 0.4	580 ± 30	13.3 ± 0.5	293 ± 18
RSD (%)		3.7	5.2	3.8	6.1

Taula 8.3. (continuació).

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	FLU		MAR	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)					
0.045	-0.005	7.1	11.0	10.6	15.9
0.05	0	7.1	11.7	9.5	14.5
0.055	+0.005	6.4	11.8	8.8	15.0
Mitjana ± SD		6.9 ± 0.4	11.5 ± 0.4	9.6 ± 0.9	15.1 ± 0.7
RSD (%)		5.8	3.5	9.4	4.6
B: butanol (% v/v)					
9.9	-0.1	7.5	11.1	9.6	15.1
10.0	0	7.1	11.7	9.5	14.5
10.1	+0.1	6.5	11.6	9.3	15.2
Mitjana ± SD		7.0 ± 0.5	11.5 ± 0.3	9.47 ± 0.15	14.9 ± 0.4
RSD (%)		7.1	2.6	1.6	2.7
C: pH					
2.9	-0.1	7.2	11.6	9.6	13.8
3	0	7.1	11.7	9.5	14.5
3.1	+0.1	6.3	12.1	9.0	15.0
Mitjana ± SD		6.9 ± 0.4	11.8 ± 0.3	9.4 ± 0.3	14.4 ± 0.6
RSD (%)		5.8	2.5	3.2	4.2
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	7.3	12.3	10.6	16.3
1	0	7.1	11.7	9.5	14.5
1.1	+0.1	6.1	11.7	8.7	16.0
Mitjana ± SD		6.8 ± 0.6	11.9 ± 0.4	9.6 ± 0.9	15.6 ± 1.0
RSD (%)		8.8	3.4	9.4	6.4
E: TEA (% v/v)					
0.45	-0.05	6.7	11.9	9.7	14.7
0.5	0	7.1	11.7	9.5	14.5
0.55	+0.05	6.6	12.0	9.19	13.2
Mitjana ± SD		6.8 ± 0.3	11.87 ± 0.17	9.5 ± 0.3	14.1 ± 0.8
RSD (%)		4.4	1.4	3.2	5.7

Taula 8.4. Recuperacions (%) de diferents tipus de llets comercials* i ous addicionats amb les quatre quinolones a tres concentracions diferents (n = 6).

Nom	Conc. Addic. (µg/Kg)	DAN (µg/Kg)			DIF (µg/Kg)		
		15	30	45	50	100	150
	Proveïdor						
Llet de cabra	S.C.A. Ganadera del Valle de los Pedroches (Còrdova)	108	100.7	100.8	108.8	107.3	108.3
Llet semidesnatada	Lactiber Corporación Alimentaria S.L. (Piélagos)	102.3	108.7	104.7	106.2	99	110.4
Llet desnatada	Puleva Food S.L. (Granada)	106.9	96.7	106.3	98.8	101	109.3
Llet sencera		110.8	101.5	105.6	103.8	100.5	106.7
Llet desnatada fresca	Lactiber Corporación Alimentaria S.L. (Piélagos)	107	97.2	107.5	107.4	99.6	107.3
Llet semidesnatada fresca		101.2	102.4	109.5	100.6	98.8	103.9
Llet sencera fresca		103.3	101.4	110.7	101.4	101.8	102.5
Llet Omega 3		101.3	98.7	108.9	101	99	98.5
Llet desnatada	Grupo Leche Pascual (Burgos)	104	98.9	109.3	98.8	103.7	102
Llet Peques 3	Puleva Food S.L.	106	100.3	108	100.8	94.7	98.7
Llet Cre +1	Nestlé España. S.A. (Barcelona)	103.3	104	104.5	102.8	97.2	101.3
Llet condensada	El Castillo (Pontevedra)	100	110.7	107.6	99.8	94.3	102

* Tret que s'indique el contrari, totes les mostres de llet són de llet bovina.

Taula 8.4. (continuació).

Nom	Conc. Addic. (µg/Kg)	DAN (µg/Kg)			DIF (µg/Kg)		
		15	30	45	50	100	150
	Proveïdor						
Ou de qualitat no. 1	Codornices Guillén S.L. (Quart de Poblet)	107.3	106.7	108.9	106	101.9	102.7
Ou de qualitat no. 3	Huevos Guillén S.L. (Quart de Poblet)	108.2	98.7	103.3	101.6	101.5	100.5
Ou de gallina fresc	Regal	100.3	99	108.9	99.4	100.7	106
Ou de Codorniu	Codornices Guillén S.L.	113.7	101.7	107.3	100.2	101.2	104.4
		FLU (µg/Kg)			MAR (µg/Kg)		
		25	50	75	37.5	75	112.5
Llet de cabra	S.C.A. Ganadera del Valle de los Pedroches	97.2	106.4	109.6	96.5	100.5	109.3
Llet semidesnatada	Lactiber Corporación Alimentaria S.L.	109.6	100	109.3	97.1	97.3	106.6
Llet desnatada	Puleva Food S.L.	98.8	101.6	101.5	100.3	99.2	107.6
Llet sencera		103.2	99	106.9	104.8	105.6	99.7
Llet desnatada fresca	Lactiber Corporación Alimentaria S.L.	99.2	96	100.4	100.5	106.8	107.4
Llet semidesnatada fresca		106.1	103	107.1	103.7	99.5	106.7
Llet sencera fresca		108.2	108.2	107.1	104.3	99.2	109.6
Llet Omega 3		98.6	97.2	100.4	98.4	101.3	106.6

Taula 8.4. (continuació).

Nom	Conc. Addic. (µg/Kg)	FLU (µg/Kg)			MAR (µg/Kg)		
		25	50	75	37.5	75	112.5
	Proveïdor						
Llet desnatada	Grupo Leche Pascual	107.2	98.2	97.3	103.2	103.7	104
Llet Peques 3	Puleva Food S.L.	98.4	97.1	98.3	97.5	98.1	99.5
Llet Cre +1	Nestlé España. S.A.	98.8	107	104	103.2	101.7	104.4
Llet condensada	El Castillo	102.9	103	108.4	98.4	102.3	108.4
Ou de qualitat no. 1	Codornices Guillén S.L.	100.4	106	106.4	97.9	99.3	104.9
Ou de qualitat no. 3	Huevos Guillén S.L.	106.4	106.2	109.5	98.4	99.1	109
Ou de gallina fresc	Regal	103.6	104.4	105.5	101.1	100.7	105.1
Ou de Codorniu	Codornices Guillén S.L.	102.9	105.6	105.7	97.3	101.3	102.2

8.5. Conclusions

El procediment proposat pot ser aplicat en l'àrea de control de qualitat d'aliments per determinar el contingut de quinolones en mostres de llet i ou, atès que permet la determinació simultània dels residus de les quinolones estudiades en aquest tipus de mostres amb una alta sensibilitat. Uns dels avantatges d'aquest procediment és la possibilitat d'injectar mostres de llet i ou directament en el sistema cromatogràfic sense cap altre tractament previ tret de la filtració, evitant així les tedioses extraccions de les matrius. La validació d'acord amb el Regulació EC2377/90 ofereix resultats satisfactoris en termes de sensibilitat, linealitat, precisió, recuperació i robustesa en el nivell de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Cal destacar que l'ús de fases mòbils micel·lars garanteix diversos avantatges del procediment, com la baixa toxicitat, inflamabilitat, la biodegradabilitat i l'abaratiment de costos.

8.6. Referències

1. S.A. McEwen, P.J. Fedorka-Cray, *Clin. Infect. Dis.* 34 (Suppl. 3) (2002) S93.
2. A.E. Van den Bogaard, E.E. Stobberingh, *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 327.
3. The White Paper on Food Safety, European Commission, Brussel·les, Bèlgica, 2000.
http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_en.pdf.
4. Official Journal of the European Union, L224 991 Agost 1990, Council Regulation 2377/90/EC del 26 de Juny de 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Brussel·les, Bèlgica, 1990.

5. S. Impens, H.F. De Brabander, K. De Wasch, L. Van Ginkel, R. Stephany, R. Schilt, N. Van Eeckout, C. Van Peteghem, Conference on residues of veterinary drugs in food. Proceedings of Euroresidue IV. Veldhoven, Països Baixos, p. 622, 2000.
6. G.M. Jones, E.H. Seymour, *J. Dairy Sci.* 71 (1988) 1691.
7. S.P. Oliver, J.L. Maki, H.H. Dowlen, *J. Food Prot.* 53 (1990) 693.
8. I. García, L. Sarabia, M.C. Ortiz, J.M. Aldama, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 190.
9. E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sanders, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1179.
10. J.F. Huang, B. Lin, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1228.
11. A.L. Cinquina, P. Roberti, L. Giannetti, F. Longo, R. Draisci, A. Fagiolo, N.R. Brizioli, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 221.
12. M. Lolo, S. Pedreira, C. Fente, B.I. Vázquez, C.M. Franco, A. Cepeda, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2849.
13. J.H. Shim, J.Y. Shen, M.R. Kim, C.J. Lee, I.S. Kim, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7528.
14. B. Kinsella, J. O'Mahony, E. Malone, M. Moloney, H. Cantwell, A. Furey, M. Danaher, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7977.
15. A.A.M. Stolker, R.J.B. Peters, R. Zuiderent, J.M. DiBussolo, C.P.B. Martins *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2841.
16. Y. Wang, W.R.G. Baeyens, C. Huang, G. Fei, L. He, J. Ouyang, *Talanta* 77 (2009) 1667.
17. F.J. Lara, A.M. García Campaña, F. Ales Barrero, J.M. Bosque Sendra, L.E. García Ayuso, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7665.
18. M.P. Hermo, E. Nemetlu, S. Kır, D. Barrón, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 98.

19. M.M. Aguilera Luiz, J.L. Martínez Vidal, R. Romero González, A. Garrido Frenich, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 10.
20. A.V. Herrera Herrera, J. Hernández Borges, M.A. Rodríguez Delgado, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7281.
21. H.H. Chung, J.B. Lee, Y.H. Chung, K.G. Lee, *Food Chem.* 113 (2009) 297.
22. Q. Tang, T. Yang, X. Tan, J. Luo, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4535.
23. D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8217.
24. H. Zhang, Y. Ren, X. Bao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 367.
25. E.A. Christodoulou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 246.
26. M.K. Hassouan, O. Ballaquestros, J. Taoufiki, J.L. Vílchez, M. Cabrera Aguilera, A. Navalón, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 625.
27. J. Shen, H. Li, H. Jiang, D. Zhou, F. Xu, J. Li, S. Ding, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1499.
28. S. Bogialli, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Laganà, G. Tramontana, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 794.
29. R.J.B. Peters, Y.J.C. Bolck, P. Rutgers, A.A.M. Stolker, M.W.F. Nielen, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8206.
30. A. Garrido Frenich, M. Aguilera Luiz, J.L. Martínez Vidal, R. Romero González, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 150.
31. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
32. J.R. Torres Lapasió, *Michrom Software*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
33. 2002/657/EC: Commission Decision de 12 Agost 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002) 8.
34. P.V. Jaiswal, V.S. Ijeri, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 46 (2005) 45.

35. J.A. Hernández Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 1.
36. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, EUA, 1988.
37. C.C. Hansch, in *Comprehensive Medicinal Chemistry*, ed. R. G. Sammes i J.B. Taylor, Pergamon Press, vol. 6, Oxford, Regne Unit, 1990.
38. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
39. J.A. Van Leeuwen, B.G.M. Vandeginste, G. Kateman, M. Mulholland, A. Cleland, *Anal. Chim. Acta* 228 (1990) 145.

Capítol 9

Anàlisi d'antibiòtics en peix amb fases mòbils micel·lars híbrides i detecció fluorimètrica.

Validació del mètode seguint la regulació 2002/657/EC.

9.1. Resum

En aquest capítol es va optimitzar i validar un mètode simple i sensible per a l'anàlisi simultània de cinc quinolones (àcid oxolínic, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, i sarafloxacina) en set tipus diferents de mostres de peix (daurada, gambes, llobarro, musclo, rèmol, salmó, i truita). El tractament de la mostra va consistir en la seua homogeneïtzació, extracció i filtració previ a la injecció en el sistema cromatogràfic. Cal destacar que es va obtenir un elevat rendiment en l'etapa d'extracció per a les quinolones sense observar-se cap interferència de la matriu en la determinació cromatogràfica tenint en compte que no es va fer ús de cap dissolvent orgànic en aquesta etapa. La separació analítica es va realitzar en menys de 18 minuts utilitzant una columna C18, detecció fluorimètrica i una fase mòbil micel·lar de 0.065 M dodecilsulfat sòdic-12.5% propanol-0.5% trietilamina tamponada a pH 3. Se va utilitzar un programa de detecció per fluorescència seguint els següents temps i longituds d'ona d'excitació/emissió (0-10 min: 260/366 nm, i 10-20 min: 280/450 nm). El mètode va ser validat seguint les directrius de la Decisió de la Unió Europea 2002/657/EC. Es van determinar els següents paràmetres: selectivitat, linealitat, límit de decisió (CC_a), capacitat de detecció (CC_β), límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ), recuperacions, i robustesa. El mètode es va aplicar amb bons resultats a la determinació de les quinolones estudiades en mostres de peix addicionades, obtenint-se unes recuperacions en l'interval de 87-110%.

9.2. Introducció

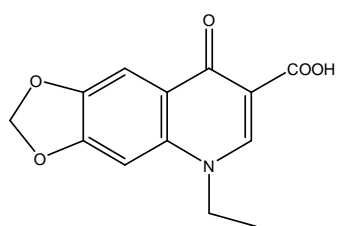
Les quinolones són un dels agents antibacterians més importants que s'utilitzen en medicina, i actuen contra ambdós bacteris, els grampositius i els gramnegatius, a través de la inhibició de la seua ADN girasa [1]. El seu principal ús és en el tractament de les malalties humanes i veterinàries, i han resultat ser molt efectives en la prevenció de malalties d'animals [2]. S'absorbeixen bé després de la seua administració oral i es distribueixen àmpliament en els teixits. Aquestes característiques fan que aquests fàrmacs siguin adequats per al seu ús en piscifactories en el tractament d'un gran nombre d'infeccions. Tanmateix, aquest ús pot originar l'aparició de residus d'aquests fàrmacs en teixits derivats d'animals tractats, fet pel qual, s'han establert uns nivells màxims permesos per a la majoria d'ells. Així, cal controlar els seus residus causats per la possibilitat d'exposició a baixos nivells d'aquests compostos que poden donar lloc al desenvolupament de resistència dels patògens humans als antibiòtics [3].

S'han publicat diferents mètodes de cromatografia líquida amb detecció fluorescent o UV per a la determinació de quinolones en fluids biològics [4], aliments [5–11] i mostres medi ambientals [12, 13]. Els equips d'última generació de cromatografia líquida d'alta resolució acoblats a un detector d'espectrometria de masses en tàndem (*high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, HPLC-MS/MS) permeten la determinació de multiresidus de les quinolones en diferents matrius [14–18]. Tanmateix, aquest equip és molt car i només uns pocs laboratoris poden disposar d'aquesta instrumentació. També s'han desenvolupat altres tècniques, com ara els mètodes per luminescència sensibilitzada de terbi (III) [19], electroforesi capil·lar [20] o cromatografia d'immunoafinitat [21].

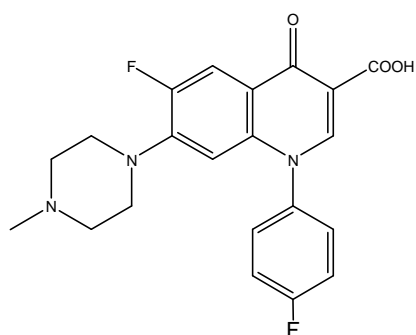
D'altra banda, un dels principals problemes en les anàlisis de multiresidus d'antibiòtics en mostres reals és que els procediments d'extracció, neteja i preconcentració dels analits de la matriu solen ser prou tediosos i complexos. La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC) [22] que utilitza

una dissolució de tensioactiu en una concentració superior a la micel·lar crítica (*critical micellar concentration*, CMC) en lloc de dissolvents aquo-orgànics com a fases mòbils, és una alternativa atractiva als mètodes convencionals d'HPLC per a la determinació de compostos en una ampla varietat de matrius (p.ex., fluids fisiològics i aliments) fent ús de la injecció directa de la mostra en el sistema cromatogràfic. L'MLC permet l'anàlisi de matrius complexes, generalment sense necessitat de realitzar una extracció, atès que les micel·les tendeixen a unir-se competitivament a les proteïnes, alliberant d'aquesta forma als fàrmacs units a les mateixes, i així les proteïnes se solubilitzen al medi micel·lar i elueixen en el front del dissolvent en lloc de precipitar en la columna. D'aquesta forma es redueix considerablement el cost i temps d'anàlisi.

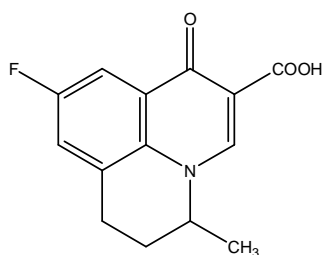
En aquest capítol s'aplica un procediment d'anàlisi multiresidual de cromatografia líquida que utilitza fases mòbils micel·lars, per a la determinació simultània de cinc quinolones (àcid oxolínic, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, i sarafloxacina) (figura 9.1) en mostres de peix. La Unió Europea ha establert en la Regulació del Consell nº 2377/90, els límits màxims residuals (*maximum residue limit*, MRL) en mostres d'origen animal [3]. D'acord amb aquesta Regulació, els valors d'MRL de les quinolones estudiades en peixos són 100 µg/kg per a l'àcid oxolínic, 300 µg/kg per a difloxacina, 100 µg/kg per a enrofloxacina, 600 µg/kg per a flumequina, i 30 µg/kg per a sarafloxacina. Per tant, es necessiten mètodes fiables per analitzar les mostres d'aliments abans de la seua venda. El mètode va ser validat seguint les directrius de la Decisió de la Comissió 2002/657/CE [23] en termes de selectivitat, linealitat, límit de decisió, capacitat de detecció, precisió i robustesa.



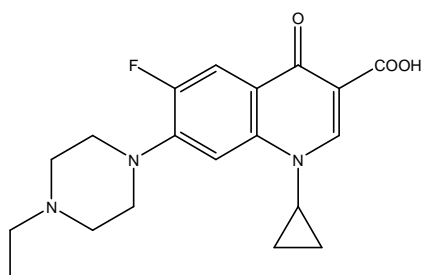
Àcid oxolínic



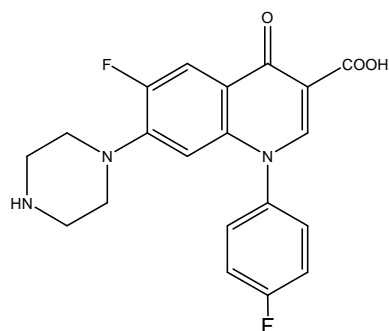
Difloxacina



Enrofloxacina



Flumequina



Sarafloxacina

Figura 9.1. Estructures de les quinolones estudiades.

9.3. Part experimental

9.3.1. *Reactius*

L'àcid oxolínic (OXO) i flumequina (FLU) van ser adquirits de Sigma (St. Louis, MO, EUA). La difloxacina (DIF), enrofloxacina (ENR), i sarafloxacina (SAR) es van comprar a Fluka (Buchs SG, Suïssa). El dodecilsulfat sòdic (SDS) i l'hidròxid de sodi es van adquirir de Merck (Darmstadt, Alemanya). El dihidrogenfosfat sòdic i propanol es van obtenir de Scharlab (Barcelona). L'àcid clorhídric, metanol, etanol i trietilamina es van obtenir de J.T. Baker (Deventer, Països Baixos). Es va utilitzar aigua ultrapura per a la preparació de dissolucions i fases mòbils (Millipore SAS, Molsheim, França). Els filtres de niló es van obtenir de Sartorius-Stedim (Goettinge, Alemanya) i de Micron Separations (Westboro, MA, EUA).

9.3.2. *Instrumentació i condicions cromatogràfiques*

Es va utilitzar el cromatògraf descrit en el capítol 8, així com la velocitat de flux (1 mL/min), el volum d'injecció (20 µL), i la temperatura de la columna (25 °C). Es va fer ús del programari *Michrom* [24] per al tractament de les dades cromatogràfiques.

La separació analítica es va dur a terme amb una columna Kromasil C18 (Scharlab) (150 mm × 4.6 mm, 5 µm de grandària de partícula). La detecció per fluorescència es va realitzar aplicant el següent programa als temps i longituds d'ona d'excitació/emissió indicats: (0–10 min: 260/366 nm per a la detecció d'OXO i FLU, i 10–20 min: 280/450 nm per a la detecció de DIF, ENR, i SAR).

Les mesures de pH, pesades analítiques, agitació i dissolució de les mostres també es van realitzar amb els mateixos equips que ja han estat detallats en capítols anteriors.

9.3.3. Preparació de dissolucions estàndard i fases mòbils

Les fases mòbils micel·lars es van preparar com es descriu en el capítol 8, però utilitzant propanol en lloc de butanol com a dissolvent orgànic.

Es van preparar dissolucions patró de cadascuna de les quinolones cada dos mesos, a una concentració de 20 µg/mL. Aquestes dissolucions es van preparar dissolent les substàncies pures en un 5% (v/v) d'etanol mitjançant un bany d'ultrasons, i després es van aforar amb una dissolució micel·lar 0.05 M SDS-pH 3. Les dissolucions patró van ser emmagatzemades a 4 °C. Les dissolucions de treball es van preparar a diari diluint les dissolucions patró concentrades. Totes les dissolucions es van filtrar amb filtres de niló de 0.45 µm (Micron separations) abans de l'anàlisi.

9.3.4. Preparació de mostres de peix

Les mostres de daurada (Grècia), gambes (Hondures), llobarro (Santa Pola), musclo, rèmol (Galícia), salmó (Noruega), i truita (La Rioja), es van adquirir en un mercat.

Les condicions òptimes d'extracció de les mostres de peix van ser les següents: en primer lloc, van ser mòltes finament amb una picadora (model MZ10, Petra Electric, Burgau, Alemanya) a 5000 rpm durant 5 min. A continuació, es van pesar 5 g que van ser homogeneïtzats i mesclats amb 50 mL d'una dissolució 0.05 M SDS-pH 3, i després es va agitar durant 1 h. A continuació, el sobrenadant es va filtrar amb una bomba de buit fent ús de filtres de niló (Sartorius-Stedim), i posteriorment es va col·locar directament en els vials de l'automostrejador.

9.3.5. Validació del mètode

La validació del mètode es va realitzar, a l'igual que en el capítol 8, fent ús dels criteris descrits en el document de la Decisió de la Comissió Europea 2002/657/CE [23].

La linealitat i la sensibilitat es van verificar injectant els analits a diferents concentracions amb l'objectiu de cobrir tot el rang de treball. El límit de detecció (LOD) es va calcular amb el criteri $3s$ utilitzant una sèrie de 10 dissolucions que contenen una baixa concentració de cada compost, mentre que el límit de quantificació (LOQ) va ser seleccionat com la concentració més baixa de la corba de calibratge [25].

També es van calcular els nous criteris introduïts per la Decisió Europea 2002/657/CE [23]: límit de decisió (CC_{α}) i capacitat de detecció (CC_{β}). CC_{α} es va obtenir a partir de la mesura d'una sèrie de blancs de les mostres addicionades a dos concentracions: LOQ i MRL. Els CC_{α} i CC_{β} es van calcular de la forma descrita en el capítol 8 (és a dir, $CC_{\alpha} = C_{MRL} + 1.64 \times SD$, i $CC_{\beta} = CC_{\alpha} + 1.64 \times SD$).

També es van estudiar l'exactitud i precisió a tres concentracions diferents injectades per sextuplicat: $0.5 \times MRL$, MRL i $1.5 \times MRL$.

9.4. Resultats i discussió

9.4.1. Estratègia d'optimització i selecció de la fase mòbil

Els compostos bàsics, com ara les quinolones, donen lloc a pics amb cues i una elevada retenció quan es realitza la seua separació cromatogràfica amb columnes de sílice. Per aquesta raó, s'utilitza una amina (generalment trietilamina, TEA) com a additiu en la fase mòbil per protegir els grups silanol de la fase estacionària quan es treballa a valors pH àcid (2.5–4.0). Les quinolones presenten dos constants de dissociació ($pK_{a1} \approx 3.4\text{--}5.7$, i $pK_{a2} \approx 7.2\text{--}8.5$) [26–29]. Per tant, existeixen principalment en forma catiònica en medi àcid, en forma aniònica en medi bàsic, i en forma

zwitteriònica en medi neutre. Els valors de pH àcid són adequats per a la seua separació atès que originen una retenció adequada. A més, la presència de TEA millora l'eficàcia dels pics.

La majoria dels procediments analítics en cromatografia líquida micel·lar requereixen l'addició d'un dissolvent orgànic que a més incrementa l'eficàcia dels pics. Generalment s'utilitza un alcohol de cadena curta, com propanol, butanol o pentanol, i cal tenir en compte que la seua selecció ha d'estar directament relacionada amb la polaritat dels compostos en estudi.

Les quinolones estudiades tenen una hidrofobicitat moderada (coeficients de repartiment octanol-aigua, $\log P_{o/w}$, que oscil·len entre 0.7–1.6). Per tant, en aquest cas es va preferir l'ús de propanol o butanol. El butanol dona lloc a millors eficàcies, però no es poden resoldre les cinc quinolones de la banda de proteïnes, i per aquesta raó, es va utilitzar propanol per dur a terme el procediment d'optimització.

L'aplicació d'un criteri d'optimització permet obtenir una fase mòbil que separe completament els compostos (resolució màxima) en un temps d'anàlisi adequat. Les estratègies interpretatives d'optimització poden ser assistides per ordinador fent ús del programari *Michrom* [24], que pot simular gràficament la metodologia seguida pels cromatografistes més experimentats amb una considerable reducció de temps i esforç. El comportament cromatogràfic dels cinc antibiòtics es va examinar mitjançant un disseny experimental que consistia en cinc fases mòbils (quatre situades en els vèrtexs d'un rectangle i la cinquena en el seu centre) tamponades a pH 3. Per tant, les quinolones es van injectar en les següents fases mòbils, SDS (M) / propanol (% , v/v): 0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.1/7.5, 0.15/2.5, i 0.15/12.5, que contien un 0.5% TEA. Els resultats corroboren el comportament habitual en MLC, és a dir, el temps de retenció (t_R) augmentava quan la concentració de tensioactiu i dissolvent orgànic disminuïa. A més a més, la resolució va augmentar en disminuir la concentració del tensioactiu [30]. El model utilitzat per a aquestes prediccions va ser el mateix dels capítols 4–8 (veure

equació 7.1). Es van obtenir errors d'ajust per a la predicció dels factors de retenció inferiors al 2.8%.

El diagrama de resolució global (figura 9.2) mostra com els valors de resolució propers a la unitat (valor màxim) s'obtenen amb fases mòbils que contenen concentracions de propanol superiors al 7.5%, i d'SDS inferiors a 0.1 M. El millor valor de resolució es va obtenir per a una composició de 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA ($R_s = 0.99997$) amb un temps d'anàlisi de 23 min. L'objectiu d'aquest mètode és la seua aplicació en anàlisis rutinàries, i per tant, cal acurtar el temps d'anàlisi tant com es puga sense perjudicar la resolució cromatogràfica, la qual cosa es va aconseguir augmentant la concentració d'SDS de 0.05 a 0.065 M. D'aquesta forma, es va reduir el temps d'anàlisi fins a 18 min mantenint una bona resolució ($R_s = 0.9998$) amb la fase mòbil 0.065 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA. La resolució a ambdues concentracions d'SDS és pràcticament la mateixa, per la qual cosa, l'última fase mòbil va ser seleccionada per dur a terme la validació del mètode. Els paràmetres cromatogràfics (t_R ; k ; N , *eficàcia*; i B/A , *factor d'asimetria*) obtinguts per a les quinolones amb la fase mòbil seleccionada van ser: DIF (14.4, 9.3, 2000, 1.3), ENR (12.3, 7.8, 2000, 1.3), FLU (8.9, 5.4, 2400, 1.2), OXO (4.1, 1.9, 1500, 1.5), i SAR (16.6, 10.9, 2200, 1.4). La figura 9.3 mostra els cromatogrames predit i experimental per a la mescla de les cinc quinolones en la fase mòbil seleccionada. La concordança entre tot dos és altament satisfactòria, verificant així la validesa de l'estratègia interpretativa utilitzada.

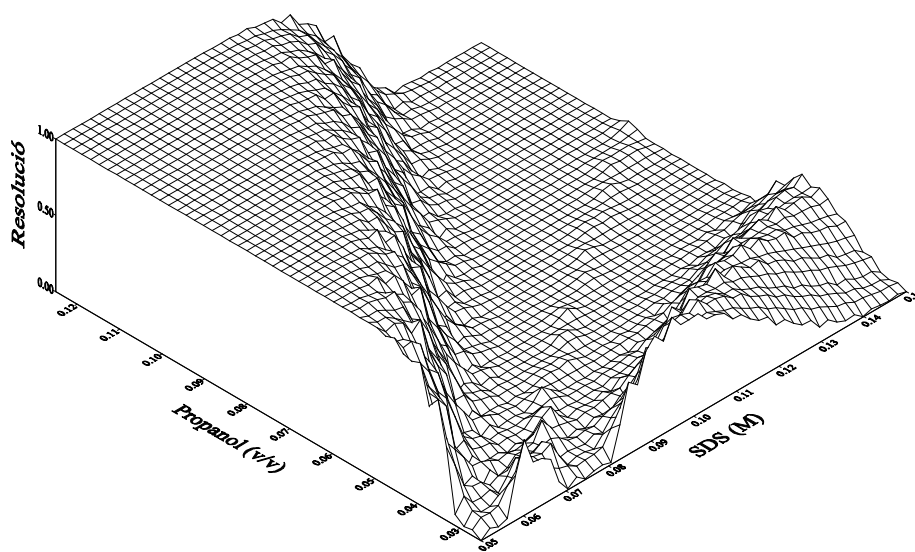


Figura 9.2. Diagrama de resolució global.

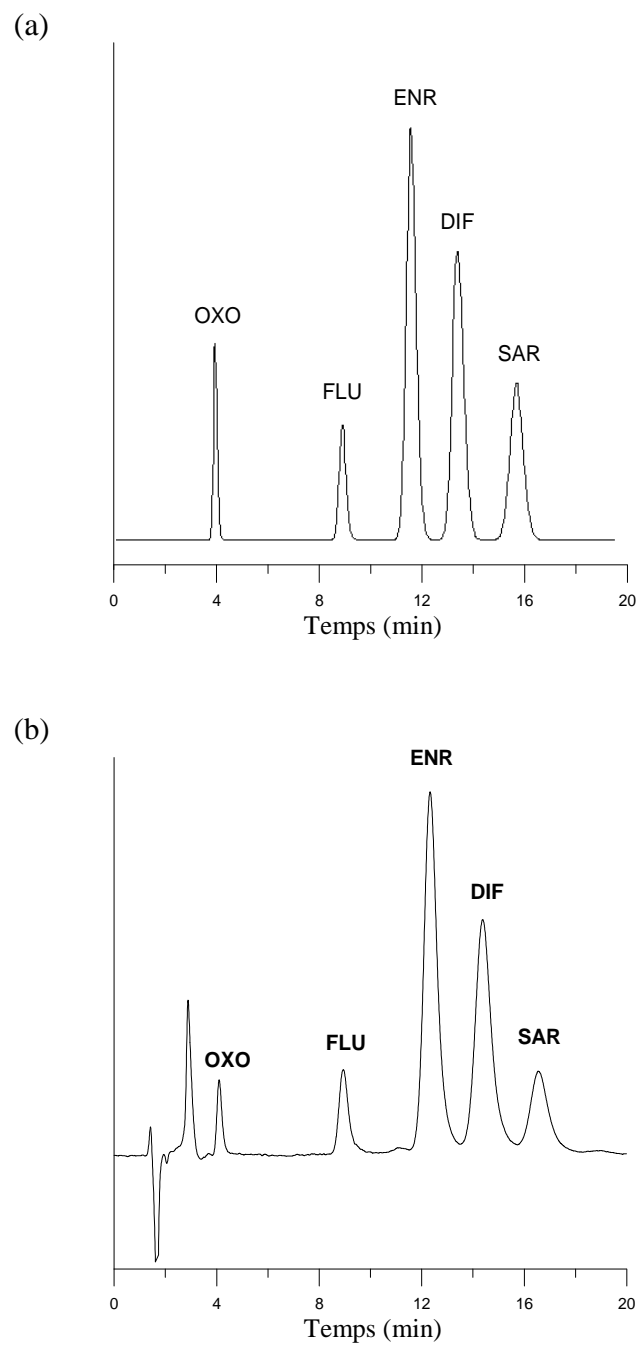


Figura 9.3. Cromatogrames predict (a), i experimental (b) obtinguts.

Fase mòbil: 0.065 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

9.4.2. Optimització de l'etapa de preparació de la mostra

L'optimització de la preparació de la mostra es va centrar en l'extracció de les cinc quinolones del peix sense fer ús de cap dissolvent orgànic. En un principi es va plantejar una preparació de la mostra on el múscul de peix es va triturar, pesar, i diluir 10 voltes amb una dissolució micel·lar 0.05 M SDS-pH 3, per a posteriorment ser agitada durant 15 min. Després es va centrifugar a 3000 rpm durant 5 min, i el sobrenadant obtingut es va diluir novament amb la dissolució micel·lar (1:10) per facilitar la seua filtració.

Finalment, es va millorar la sensibilitat quan l'extracció de les quinolones es va realitzar diluint una única vegada amb agitació continua durant 1 h. Tot seguit, el sobrenadant es va filtrar fent ús de filtres de niló i amb l'ajuda d'una bomba de buit. Amb aquest procediment s'evita la segona dilució.

9.4.3. Validació del mètode

La validació es va realitzar d'acord amb la Regulació de la Unió Europea 2002/657/CE [23]. Els paràmetres avaluats van ser: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, límit de decisió, capacitat de detecció, precisió, exactitud, recuperació i robustesa.

a) Selectivitat

En l'estudi de la selectivitat no es va observar cap interferència de compostos endògens en les mostres de peix analitzades (Figures 9.4 i 9.5). En la part inferior d'aquestes figures es representen els cromatogrames obtinguts amb la fase mòbil òptima de dos mostres de daurada i músclo, respectivament, adicionades amb les cinc quinolones. Els pics corresponents a compostos endògens de les mostres de peix no van interferir amb els dels analits.

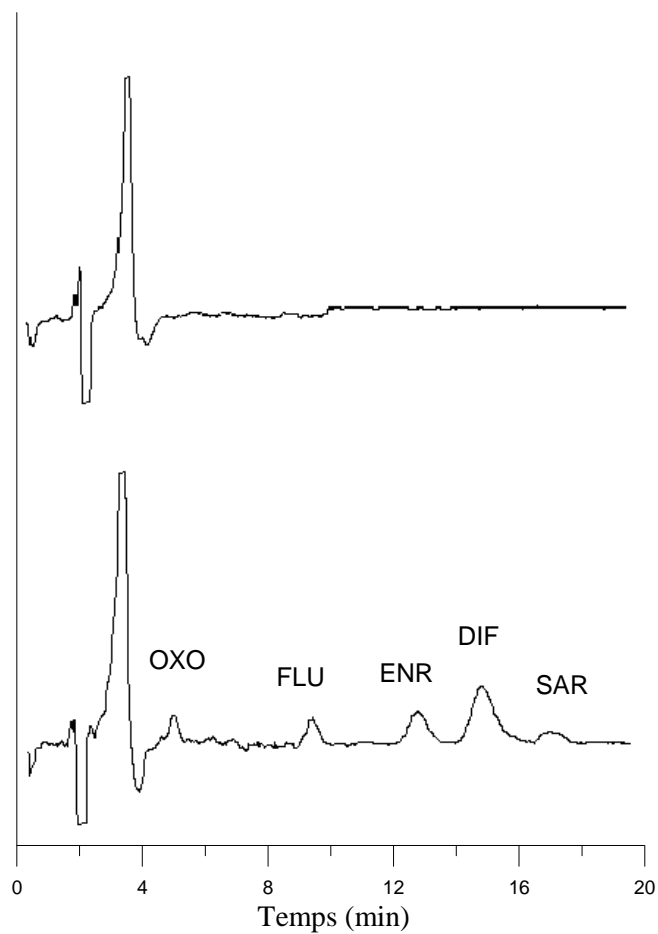


Figura 9.4. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra de daurada addicionada (inferior). Fase mòbil: 0.065 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

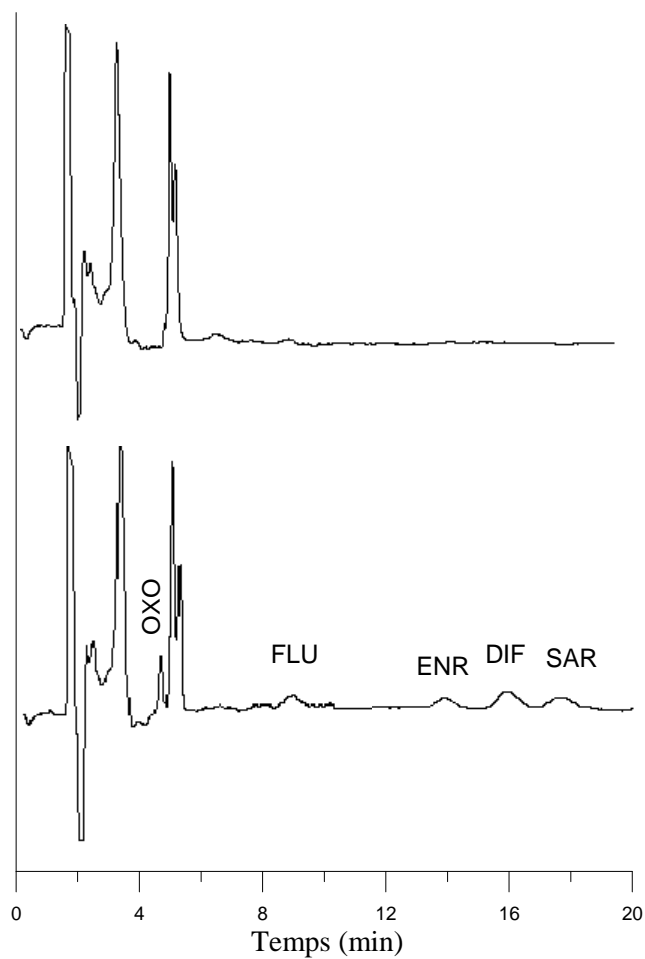


Figura 9.5. Cromatogrames del blanc (superior) i mostra de músculo addicionada (inferior). Fase mòbil: 0.065 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

b) Linealitat i sensibilitat

Les corbes de calibratge es van construir a partir de les àrees dels pics cromatogràfics obtinguts per a dotze concentracions creixents (sis rèpliques) en les diferents matrius de peix (factor de dilució 1:10) en els següents intervals: 10–1000 µg/Kg per a DIF, 5–1000 µg/Kg per a ENR, 30–1000 µg/Kg per a FLU i OXO, i 15–1000 µg/Kg per a SAR. Per estudiar la precisió dels paràmetres de calibratge, es van obtenir les corbes durant 5 dies en un període de 2 mesos preparades a partir de diferents dissolucions patró. El pendent i l'ordenada en l'origen es van determinar pel mètode d'anàlisi de regressió lineal per mínims quadrats. Els resultats obtinguts es mostren en la taula 9.1. Els coeficients de determinació (R^2) van ser sempre majors de 0.999.

El límit de detecció (LOD) es va determinar utilitzant el criteri $3s$ fent ús d'una sèrie de 10 dissolucions que contenien una baixa concentració de cada antibiòtic, mentre que el límit de quantificació (LOQ) va ser seleccionat com la concentració més baixa utilitzada en la corba de calibratge, i es va calcular amb el criteri $10s$. Els LODs i LOQs es mostren en la taula 9.1. Els resultats s'ajusten als límits establits en el Reglament EEC 2377/90 [3].

c) Límit de decisió i capacitat de detecció

Es van calcular els paràmetres CC_α (límit de decisió) i CC_β (capacitat de detecció) seguint les directrius de la regulació 2002/657/EC [23]. CC_α és el límit en el qual i per damunt del qual es pot concloure que una mostra no és conforme amb una probabilitat d'error α . CC_β és el menor contingut d'una substància que pot ser detectat, identificat o quantificat en una mostra amb una probabilitat d'error β . Per al càlcul de CC_α i CC_β , es van addicionar blancs de mostres de peix amb les quinolones a dos nivells de concentració: LOQ ($n = 20$), i MRL ($n = 20$). La taula 9.2 resumeix els valors de CC_α i CC_β obtinguts.

Taula 9.1. Dades de la regressió lineal, límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ).

Analít	$a \pm SD^a$	$b \pm SD^a$	R^2	LOD ($\mu\text{g/Kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/Kg}$)
DIF	0.064 ± 0.003	-0.014 ± 0.012	0.99994	2	10
ENR	0.0837 ± 0.0015	-0.017 ± 0.024	0.99993	1	5
FLU	0.0127 ± 0.0010	-0.018 ± 0.020	0.99959	7	30
OXO	0.0060 ± 0.0003	-0.0020 ± 0.0011	0.99949	6	30
SAR	0.0243 ± 0.0005	-0.011 ± 0.016	0.99937	3	15

^a Paràmetres de calibratge: Àrea = $a C$ ($\mu\text{g/Kg}$) + b ; SD = desviació estàndard ; R^2 = coeficient de determinació.

Taula 9.2. Valors dels errors α i β , límits de decisió (CC_α) i capacitats de detecció (CC_β) calculats al nivell de LOQ^a ($n = 20$) del mètode i al MRL^b ($n = 20$) per a les quinolones.

Anàlits	Conc. Addic. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Trobada \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Error α ($1.64 \times$ SD)	CC_α ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Conc. Afegida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Trobada \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Error β ($1.64 \times$ SD)	CC_β ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
OXO	30	30.7 ± 1.9	3.1	33.1	33.1	34 ± 3	4.9	38.0
	100	104.9 ± 1.0	1.6	101.6	101.6	110.3 ± 2.1	3.4	105.0
DIF	10	10.6 ± 0.7	1.1	11.1	11.1	10.1 ± 0.6	1.0	12.1
	300	295.1 ± 2.3	3.8	303.8	303.8	311.8 ± 2.3	3.8	307.6
ENR	5	4.5 ± 0.5	0.8	5.8	5.8	5.41 ± 0.18	0.3	6.1
	100	97.5 ± 1.7	2.8	102.8	102.8	99.3 ± 1.0	1.6	104.4
FLU	30	30.1 ± 2.3	3.8	33.8	33.8	35 ± 3	4.9	38.7
	600	603.8 ± 2.4	3.9	603.9	603.9	608.7 ± 2.1	3.4	607.3
SAR	15	15.3 ± 1.1	1.8	16.8	16.8	17.2 ± 1.5	2.5	19.3
	30	28.3 ± 1.4	2.3	32.3	32.3	31.8 ± 1.1	1.8	34.1

d) Precisió i exactitud

La precisió i exactitud intra i interdia es van determinar mitjançant l'anàlisi de les mostres de peix addicionades amb les quinolones a tres concentracions diferents: $0.5 \times \text{MRL}$, MRL i $1.5 \times \text{MRL}$, seguint la Regulació EEC 2377/90 [3]. Les anàlisis intradia es van calcular mitjançant la injecció d'aquestes tres dissolucions (sis rèpliques) en el mateix dia, mentre que l'anàlisi interdia es va obtenir com la mitjana de les sis mesures dels valors intradia obtinguts en 5 dies durant un període de 3 mesos, realitzats per diferents analistes i equips. Els resultats, expressats com a desviació estàndard relativa (RSD, precisió) i error relatiu (Er, exactitud), es mostren en la taula 9.3. El mètode va ser exacte i precís com indiquen els valors d'Er (%) i RSD (%), atès que són inferiors al 7.4% i 6.4%, respectivament.

e) Robustesa

La robustesa del mètode es va examinar injectant sis voltes ($n = 6$) una dissolució patró amb les cinc quinolones a la concentració d'MRL, i fent xicotets canvis en els paràmetres cromatogràfics (concentració de tensioactiu, percentatge de propanol, pH, flux, i percentatge de TEA). No es van observar diferències significatives ni en l'àrea dels pics ni en els seus temps de retenció quan els paràmetres comentats es van modificar. Els resultats indiquen que els factors seleccionats romanen pràcticament inalterats quan es realitzen lleugeres variacions d'aquests paràmetres (taula 9.4). La variació en el flux i en el percentatge de TEA (%) tenen una major influència en la retenció dels compostos estudiats a diferència dels altres paràmetres.

f) Anàlisi de mostres de peix

L'aplicabilitat del procediment desenvolupat s'ha estudiat en l'anàlisi de mostres de peixos adquirides en supermercats (tots ells provenien de piscifactories).

Les quinolones es van addicionar a les mostres de peix (daurada, gambes, llobarro, musclo, rèmol, salmó, i truita) amb quantitats conegudes a tres concentracions diferents ($0.5 \times \text{MRL}$, $1 \times \text{MRL}$, i $1.5 \times \text{MRL}$, sis rèpliques per a cada nivell). Les mostres addicionades van ser processades i analitzades amb el procediment desenvolupat. Els valors de les recuperacions es van calcular comparant la concentracions obtingudes amb les quantitats afegides. Les dades obtingudes (taula 9.5) mostren recuperacions satisfactòries per a les cinc fluoroquinolones, i els resultats es van obtenir en el interval 87–110%. Les Figures 9.4 (superior) i 9.5 (superior) mostren els cromatogrames obtinguts en l'anàlisi de daurada i musclo, respectivament, addicionades amb les cinc quinolones. Aquests resultats estan d'acord amb la Regulació EEC 2377/90 [3]. Els pics que podrien ser assignats a compostos endògens de les mostres de peix no interfereixen amb els dels analits. Els resultats obtinguts indiquen que el procediment desenvolupat es pot aplicar en el control de residus de quinolones.

Finalment, es va aplicar el mètode a la determinació de les quinolones estudiades en mostres reals de peix (daurada, gambes, llobarro, musclo, rèmol, salmó, i truita). La seua anàlisi no va revelar la presència de cap quinolona.

Taula 9.3. Precisió i exactitud intra (n = 6) i interdia (n = 5) dels antibiòtics estudiats.

Analit	Conc. Addic. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intradia			Interdia		
		Trobada (mitjana \pm SD) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Er (%)	RSD (%)	Trobada (mitjana \pm SD) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Er (%)	RSD (%)
DIF	150	156.8 \pm 0.7	4.5	0.4	154.2 \pm 2.1	2.8	1.4
	300	289.1 \pm 1.3	3.6	0.4	304 \pm 4	1.3	1.3
	450	445.5 \pm 0.8	1.0	0.2	452.1 \pm 0.8	0.5	0.2
ENR	50	46.3 \pm 0.9	7.4	1.9	47 \pm 3	6.0	6.4
	100	97.7 \pm 1.9	2.3	1.9	94 \pm 3	6.0	3.2
	150	152.6 \pm 1.9	1.7	1.2	150.8 \pm 2.0	0.5	1.3
FLU	300	300 \pm 3	0.0	1.0	300.7 \pm 1.5	0.2	0.5
	600	603.8 \pm 2.4	0.6	0.4	599 \pm 3	0.2	0.5
	900	907.7 \pm 2.1	0.9	0.2	905 \pm 4	0.6	0.4
OXO	50	53 \pm 3	6.0	5.7	50.1 \pm 1.7	0.2	3.4
	100	104 \pm 6	4.0	5.8	100 \pm 3	0.0	3.0
	150	154 \pm 3	2.7	1.9	155 \pm 3	3.3	1.9
SAR	15	15.9 \pm 0.6	6.0	3.8	15.6 \pm 0.4	4.0	2.6
	30	29.1 \pm 1.4	3.0	4.8	29.0 \pm 1.0	3.3	3.4
	45	42.1 \pm 0.5	6.4	1.2	43.2 \pm 1.7	4.0	3.9

Taula 9.4. Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	OXO		DIF		ENR	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)							
0.06	-0.005	4.1	0.057	11.8	0.72	13.8	1.50
0.065	0	3.8	0.058	11.2	0.76	13.2	1.55
0.07	+0.005	3.7	0.055	10.9	0.70	11.5	1.48
Mitjana ± SD		3.87 ± 0.21	0.0567 ± 0.0015	11.3 ± 0.5	0.73 ± 0.03	12.80 ± 1.2	1.51 ± 0.04
RSD (%)		5.4	2.6	4.4	4.1	9.4	2.6
B: Propanol (% v/v)							
12.4	-0.1	3.8	0.058	11.0	0.72	13.1	1.50
12.5	0	3.8	0.058	11.2	0.76	13.2	1.55
12.6	+0.1	3.7	0.055	10.4	0.70	12.0	1.48
Mitjana ± SD		3.77 ± 0.06	0.0570 ± 0.0017	10.9 ± 0.4	0.73 ± 0.03	12.8 ± 0.7	1.51 ± 0.04
RSD (%)		1.6	3.0	3.7	4.1	5.5	2.6
C: pH							
2.9	-0.1	4.0	0.058	11.4	0.71	13.5	1.60
3	0	3.8	0.058	11.2	0.76	13.2	1.55
3.1	+0.1	3.5	0.053	11.1	0.74	13.0	1.74
Mitjana ± SD		3.80 ± 0.20	0.056 ± 0.003	11.23 ± 0.15	0.737 ± 0.025	13.23 ± 0.25	1.63 ± 0.10
RSD (%)		5.3	5.4	1.3	3.4	1.9	6.1
D: Flux (mL/min)							
0.9	-0.1	4.3	0.062	12.8	0.77	14.8	1.71
1	0	3.8	0.058	11.2	0.76	13.2	1.55
1.1	+0.1	3.5	0.051	10.3	0.86	11.9	1.48
Mitjana ± SD		3.9 ± 0.4	0.057 ± 0.006	11.4 ± 1.3	0.80 ± 0.06	13.3 ± 1.5	1.58 ± 0.12
RSD (%)		10.3	10.5	11.4	7.5	11.3	7.6
E: TEA (% v/v)							
0.45	-0.05	4.4	0.052	12.3	0.73	14.4	1.55
0.5	0	3.8	0.058	11.2	0.76	13.2	1.55
0.55	+0.05	3.8	0.056	11.0	0.74	12.8	1.54
Mitjana ± SD		4.0 ± 0.3	0.055 ± 0.003	11.5 ± 0.7	0.743 ± 0.015	13.5 ± 0.8	1.547 ± 0.006
RSD (%)		7.5	5.4	6.1	2.0	5.9	0.4

Taula 9.4. (continuació).

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	FLU		SAR	
		t _R (min)	Àrea	t _R (min)	Àrea
A: SDS (M)					
0.06	-0.005	9.3	0.81	15.8	0.066
0.065	0	8.4	0.74	15.0	0.067
0.07	+0.005	8.5	0.82	14.3	0.068
Mitjana ± SD		8.7 ± 0.5	0.79 ± 0.04	15.0 ± 0.8	0.0670 ± 0.00010
RSD (%)		5.7	5.4	5.3	1.5
B: Propanol (% v/v)					
12.4	-0.1	8.4	0.74	14.8	0.063
12.5	0	8.4	0.74	15.0	0.067
12.6	+0.1	8.22	0.73	13.9	0.063
Mitjana ± SD		8.33 ± 0.12	0.737 ± 0.006	14.6 ± 0.6	0.0643 ± 0.0023
RSD (%)		1.4	0.8	4.1	3.6
C: pH					
2.9	-0.1	8.9	0.78	15.2	0.063
3	0	8.4	0.74	15.0	0.067
3.1	+0.1	8.0	0.77	14.9	0.063
Mitjana ± SD		8.4 ± 0.5	0.763 ± 0.021	15.03 ± 0.15	0.0643 ± 0.0023
RSD (%)		6.0	5.3	1.0	3.6
D: Flux (mL/min)					
0.9	-0.1	9.5	0.76	17.1	0.065
1	0	8.4	0.74	15.02	0.067
1.1	+0.1	7.6	0.73	13.9	0.062
Mitjana ± SD		8.5 ± 1.0	0.743 ± 0.015	15.3 ± 1.6	0.0647 ± 0.0025
RSD (%)		11.8	2.0	10.5	3.9
E: TEA (% v/v)					
0.45	-0.05	9.7	0.73	16.8	0.060
0.5	0	8.4	0.74	15.0	0.067
0.55	+0.05	8.2	0.77	14.7	0.064
Mitjana ± SD		8.8 ± 0.8	0.747 ± 0.021	15.5 ± 1.1	0.064 ± 0.004
RSD (%)		9.1	2.8	7.1	6.3

Taula 9.5. Recuperacions (%) de diferents tipus de peixos comercials addicionats amb les cinc quinolones a tres concentracions diferents (n = 6).

Analit	Conc. Addic. (µg/Kg)	Recuperacions (%)		
		Daurada	Gamba	Llobarro
DIF	150 ^a	109.0 ± 1.3	105.4 ± 0.5	99.8 ± 1.1
	300 ^b	106.4 ± 1.7	103.4 ± 0.3	101.7 ± 2.2
	450 ^c	106.6 ± 1.7	97.51 ± 0.23	95 ± 3
ENR	50 ^a	103.7 ± 0.9	90.5 ± 0.5	94.9 ± 0.4
	100 ^b	105.1 ± 1.0	100.6 ± 0.5	109.7 ± 0.6
	150 ^c	100.8 ± 1.4	97.5 ± 0.3	106.1 ± 1.0
FLU	300 ^a	100.26 ± 0.03	104.8 ± 0.6	90.4 ± 0.3
	600 ^b	95.2 ± 0.7	97.3 ± 0.5	95.6 ± 0.6
	900 ^c	96.1 ± 0.5	86.7 ± 0.3	87.32 ± 0.23
OXO	50 ^a	101.3 ± 0.9	104.33 ± 0.16	107.67 ± 0.19
	100 ^b	97.67 ± 0.06	92.5 ± 0.6	92.6 ± 0.6
	150 ^c	108.9 ± 0.9	103.5 ± 0.9	102.7 ± 0.3
SAR	15 ^a	106.4 ± 0.6	105.1 ± 0.5	103.4 ± 0.3
	30 ^b	104.6 ± 0.6	99.97 ± 0.17	99.9 ± 0.3
	45 ^c	104.8 ± 0.3	98.6 ± 0.7	98.5 ± 0.5

^a 0.5 × MRL, ^b 1 × MRL, ^c 1.5 × MRL.

Taula 9.5. (continuació).

Analit	Conc. Addic. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Recuperacions (%)			
		Musclo	Rèmol	Salmó	Truita
DIF	150 ^a	93.8 \pm 1.1	88.4 \pm 0.6	105.8 \pm 1.5	99.2 \pm 1.4
	300 ^b	95.8 \pm 0.5	92.7 \pm 2.3	92.5 \pm 0.9	105.9 \pm 0.8
	450 ^c	106.8 \pm 1.9	98.6 \pm 0.7	101.2 \pm 2.1	101.1 \pm 1.1
ENR	50 ^a	106.23 \pm 0.23	98.6 \pm 0.5	96.2 \pm 0.3	96.3 \pm 0.3
	100 ^b	101.8 \pm 0.6	106.3 \pm 0.8	94.14 \pm 0.05	103.9 \pm 1.6
	150 ^c	97.3 \pm 0.7	102.8 \pm 1.5	105.9 \pm 1.2	101.8 \pm 1.7
FLU	300 ^a	89.4 \pm 1.0	89.4 \pm 1.0	103.1 \pm 0.6	108.9 \pm 0.8
	600 ^b	101.9 \pm 2.3	92.1 \pm 2.3	97.44 \pm 0.18	106.6 \pm 0.3
	900 ^c	98 \pm 3	88.4 \pm 0.6	102.23 \pm 0.04	108.9 \pm 0.4
OXO	50 ^a	104.3 \pm 0.3	104 \pm 4	105.57 \pm 0.19	96.4 \pm 0.5
	100 ^b	104.50 \pm 0.15	97.7 \pm 0.5	104.05 \pm 0.18	104.9 \pm 1.0
	150 ^c	99.4 \pm 0.8	101.9 \pm 0.6	106.37 \pm 0.12	97.2 \pm 0.8
SAR	15 ^a	99.2 \pm 0.3	107.3 \pm 0.5	106.4 \pm 0.6	98.53 \pm 0.03
	30 ^b	100 \pm 0.5	100.59 \pm 0.17	104.6 \pm 0.6	104.8 \pm 0.5
	45 ^c	106.7 \pm 0.9	109.4 \pm 0.7	104.8 \pm 0.3	105.3 \pm 0.6

9.5. Conclusions

En aquest capítol, l'optimització de la preparació de la mostra s'ha centrat en l'extracció de les cinc quinolones estudiades en mostres de peix sense fer ús de cap dissolvent orgànic, la qual cosa fa que el procediment siga menys tòxic i relativament econòmic.

El procediment desenvolupat és ràpid i permet la determinació simultània dels residus de quinolones en diferents tipus de peix amb una elevada sensibilitat, així com el processament d'un gran nombre d'anàlisis amb un temps curt de preparació de les mostres, per la qual cosa resulta útil en el control de qualitat d'aliments. El procediment cromatogràfic proposat ofereix bons resultats per a la determinació de quinolones en mostres de peix en termes de selectivitat, linealitat, exactitud, recuperacions i robustesa i presenta una sensibilitat a nivell de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

9.6. Referències

1. AHFS (1988). American Hospital Formulary Service. Drug Information. American Society of Health-System Pharmacist. Bethesda, EUA.
2. D. Currie, L. Lynas, D.G. Kennedy, W.J. McCaughey, *Food Additives and Contaminants* 15 (1998) 651.
3. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 (1990). Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
<http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm>.
4. A. Espinosa Mansilla, A.M. de la Pena, D.G. Gomez, F.S. Lopez, *Talanta* 68 (2006) 1215.
5. E.A. Christodoulou, V.F. Samanidou, L.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 246.

6. J.F. Huang, B. Lin, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1228.
7. C.M. Karbiwnyk, L.E. Carr, S.B. Turnipseed, W.C. Andersen, K.E. Miller, *Anal. Chim. Acta* 596 (2007) 257.
8. M.D. Marazuela, M.C. Moreno Bondi, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 25.
9. I. Pecorelli, R. Galarini, R. Bibi, A. Floridi, E. Casciarri, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 81.
10. S.C. Su, M.H. Chang, C.L. Chang, P.C. Chang, S.S. Chou, *J. Food Drug Anal.* 11 (2003) 114.
11. J.H. Zhou, X.F. Xue, F. Chen, J.Z. Zhang, Y. Li, L.M. Wu, L.Z. Chen, J. Zhao, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 955.
12. V. Andreu, C. Blasco, Y. Pico, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 534.
13. E.M. Golet, A. Strehler, A.C. Alder, W. Giger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5455.
14. M.S. Diaz Cruz, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 637.
15. M.P. Hermo, E. Nemutlu, S. Kir, D. Barron, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 98.
16. J.A.R. Paschoal, F.G.R. Reyes, S. Rath, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 2213.
17. R. Romero Gonzalez, J.C. Lopez Martinez, E. Gomez Milan, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 142.
18. V. Samanidou, E. Evaggelopoulos, M. Trotsmuller, X.H. Guo, E. Lankmayr, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 115.
19. J.A. Hernandez Arteseros, R. Compano, R. Ferrer, M.D. Prat, *Analyst* 125 (2000) 1155.
20. D. Barron, E. Jimenez Lozano, S. Bailac, J. Barbosa, *J. Chromatogr. B* 767 (2002) 313.
21. C.K. Holtzapple, S.A. Buckley, L.H. Stanker, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2963.

-
22. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Gil Agusti, M.E. Capella Peiro, D. Bose, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
 23. Commision Decision 2002/657/EC (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm> .
 24. J.R Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
 25. FDA (2001). Guidance for Industry. Bioanalytical Method validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Rockville, MD, EUA. <www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.
 26. S. Babic, A.J.M. Horvat, D.M. Pavlovic, M. Kastelan-Macan, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1043.
 27. C.C. Hansch, in *Comprehensive Medicinal Chemistry*, ed. R.G. Sammes i J.B. Taylor, Pergamon Press, vol. 6, Oxford, Regne Unit, 1990.
 28. J.Y. Hu, W. Wang, Z. Zhu, H. Chang, F. Pan, B.L. Lin, *Environ. Sci. Technol.* 41(2007) 4806.
 29. S. Zorita, L. Martensson, L. Mathiasson, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 2760.
 30. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.

Part III

Anàlisi de compostos relacionats

*L'important no es l'objectiu del camí, sinó el camí
Qui viatja massa de pressa es perd l'essència del viatge*

L. L'Amour

Capítol 10

Anàlisi d'omeprazole i els seus principals metabolits mitjançant cromatografia líquida amb fases mòbils micel·lars híbrides

10.1. Resum

L'omeprazole, un dels fàrmacs més prescrits a nivell internacional, és un inhibidor selectiu de la secreció de l'àcid gàstric. En aquest capítol s'ha desenvolupat un procediment cromatogràfic que fa ús de fases mòbils micel·lars de dodecilsulfat sòdic i propanol tamponades a pH 7, i una columna C18 per a la determinació d'omeprazole i els seus principals metabòlits (omeprazole sulfona i 5-hidroxiomeprazole) en mostres d'orina i sèrum. La detecció es va realitzar en la regió de l'UV (305 nm), i el temps total d'anàlisi va ser d'11 min sense observar-se cap interferència de la banda de proteïnes o compostos endògens de les matrius fisiològiques. Es va obtenir una resolució adequada aplicant un procediment quimiomètric que considera el factor de retenció i la forma dels pics cromatogràfics. Els paràmetres analítics estudiats en la validació del mètode per als tres compostos van ser: linealitat ($R^2 > 0.9998$), precisió intra i interdia (RSD, %: 0.7–8.0 i 0.1–4.9, respectivament), i la robustesa. Els límits de detecció i quantificació van ser inferiors a 6 i 25 ng/mL, respectivament, mentre que les recuperacions es van obtenir en l'interval 97.6–101.9%, en el medi micel·lar, sèrum i orina. Finalment, el mètode es va aplicar amb èxit per a la determinació d'omeprazole i els seus metabòlits en mostres fisiològiques. L'omeprazole també es va analitzar en medicaments.

10.2. Introducció

L'omeprazole (OME) (figura 10.1), un benzimidazol substituït, és un inhibidor de la bomba de protons gàstrica, és a dir, l'OME inhibeix directament i de forma dependent de la dosi, l'enzim H^+/K^+ -ATPasa, el qual és el responsable de la secreció àcida gàstrica en les cèl·lules parietals gàstriques. A causa d'aquest mecanisme d'acció intracel·lular selectiu i la baixa afinitat per a altres receptors d'unió a la membrana (com els receptors H_2 histamínics, M_1 muscarínics o gastrinèrgics), l'OME s'ha assignat a una classe independent d'agents inhibidors de l'acidesa, els quals bloquegen el pas final de la producció d'àcid. S'utilitza en el tractament de la dispèpsia, úlcera pèptica, malaltia de reflux gastroesofàgic i la síndrome de Zollinger-Ellison, tots ells causats per l'àcid de l'estómac.

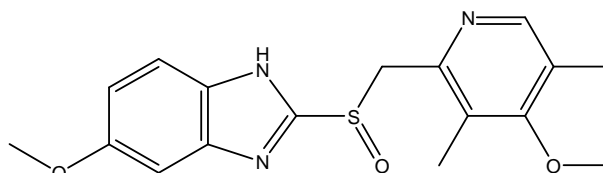
Químicament, l'OME és un compost hidròfob ($\log P_{o/w} = 2.23$), i és una base dèbil amb unes constants de dissociació $pK_a = 4.2, 9.0$ [2]. L'OME és un racemat, és a dir, pot tenir quantitats iguals dels dos enantiòmers S i R. En les condicions àcides de l'estómac, ambdós es converteixen en productes aquirals, que reaccionen amb el grup cisteïna en l'ATPasa, destruint així la capacitat de les cèl·lules parietals per produir l'àcid gàstric.

L'OME s'administra justament amb antibiòtics en el tractament d'eradicació de la infecció per *Helicobacter pylori* de l'estómac. En la pràctica mèdica, l'OME s'administra en forma de comprimits i càpsules en dosis de 20 a 120 mg diàries, i en forma de pols (omeprazole sòdic) per injecció intravenosa. La majoria dels medicaments orals de l'OME presenten un recobriment entèric a causa de la ràpida degradació del compost en el medi àcid de l'estómac.

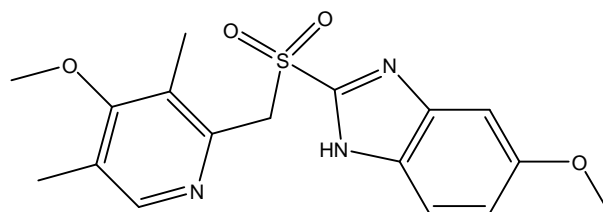
Després de l'administració oral de l'OME, aquest és ràpidament absorbit en l'intestí prim, completant-se aquest procés normalment en 3–6 hores. La ingestió simultània d'aliments no té influència en la seua biodisponibilitat. L'OME es metabolitza quasi completament pel sistema del citocrom P450, principalment en el fetge. Els metabolits que s'han identificat fins a la data són l'omeprazole sulfona (OMES)

i 5-hidroxiomeprazole (HOME) (figura 10.1), que són els més importants, mentre que sulfur d'omeprazole, carboxiomeprazole, i almenys altres tres compostos no identificats no exerceixen cap efecte en la secreció àcida. Aproximadament un 80% d'una dosi oral s'excreta en forma de metabòlits en orina i la resta es troba en els excrements. La concentració plasmàtica tòxica de l'OME s'assoleix per a un valor de 1.01 mg/L [1].

(a)



(b)



(c)

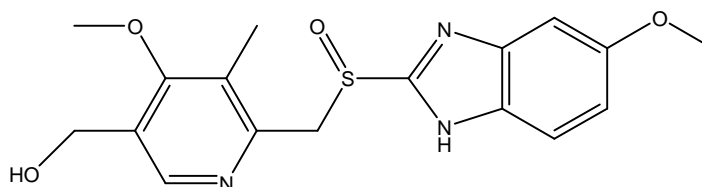


Figura 10.1. Estructures de l'omeprazole (a) i els seus metabòlits omeprazole sulfona (b), i 5-hidroxiomeprazole (c).

S'han descrit diversos mètodes per a la determinació de l'OME en productes farmacèutics i fluids biològics, incloent la cromatografia líquida d'alta resolució (*high performance liquid chromatography*, HPLC) amb detecció electroquímica o coulombimètrica [3,4], l'electroforesi capil·lar [5], l'espectrofotometria [6], la polarografia [7], i la voltametria [8].

La majoria dels mètodes descrits en la literatura fan ús de sistemes l'HPLC-UV i l'HPLC-MS (*high performance liquid chromatography mass spectrometry*) per a la determinació de l'OME en fluids biològics [9–14]. D'altra banda, algunes publicacions han descrit un mètode senzill d'HPLC per a la determinació simultània d'HOME, OME, i OMES en sèrum humà [15–22], tot i que també s'han utilitzat mètodes d'HPLC amb separació enantioselectiva [23–27]. Encara que aquests mètodes són selectius, ràpids i sensibles, no són adequats per a l'anàlisi clínica rutinària, atès que requereixen un pretractament llarg de les mostres, així com un equip econòmicament costós que no està a l'abast de tots els laboratoris. Altres investigacions s'han centrat en l'estudi de l'estabilitat o la degradació de l'OME [28–32]. La revisió publicada per Espinosa Bosch *et al.* [33] remarca que la cromatografia líquida acoblada a un tàndem d'espectrometria masses d'ionització per electroesprai (*electrospray ionization liquid chromatography mass spectrometry tandem*, ESI LC/MS-MS) presenta els següents avantatges en comparació amb els anteriors mètodes d'anàlisi: menor temps d'anàlisi, major selectivitat, i uns límits de quantificació més menuts.

Els mètodes d'HPLC aplicats a l'anàlisi de mostres de sèrum i orina generalment requereixen un elaborat pretractament de la mostra, incloent l'eliminació de les interferències i l'extracció dels analits. La cromatografia líquida micel·lar (*micellar liquid chromatography*, MLC) permet l'anàlisi de matrius complexes sense necessitat de realitzar cap etapa prèvia d'extracció, reduint d'aquesta forma el cost i el temps d'anàlisi, així com les fonts d'error [34]. Les micel·les tendeixen a unir-se competitivament a les proteïnes, alliberant els fàrmacs units a les mateixes la qual cosa permet la seua solubilització i posterior elució en el front del dissolvent evitant així que precipiten en la

columna. L'MLC ha demostrat ser una tècnica útil en la determinació de diversos grups de fàrmacs com la trazodona en sèrum [35], i altres tipus de compostos [36].

Els mecanismes de retenció en MLC (com ara, les interaccions solut-fase mòbil i solut-fase estacionària) s'han estudiat de forma exhaustiva, i s'han construït sobre una base teòrica raonable. L'MLC és un bon exemple dels beneficis d'un equilibri secundari en HPLC [34]. En l'equilibri principal té lloc el repartiment del solut entre dissolvent (aigua o la mescla aquo-orgànica) i la fase estacionària, mentre que l'equilibri secundari s'estableix amb les micel·les en la fase mòbil. Ambdós equilibris estan afectats per una sèrie de factors, com ara el tipus i la concentració de tensioactiu i additiu (p.ex., sals o modificadors orgànics), temperatura, força iònica i pH.

En aquest capítol s'ha desenvolupat i validat un mètode cromatogràfic per a la determinació simultània d'OME i els seus dos principals metabòlits en fluids biològics sense cap pretractament previ de les mostres. També es va dur a terme l'anàlisi d'OME en medicaments. El mètode ha sigut validat d'acord amb la guia *Food and Drug Administration* [37].

10.3. Part experimental

10.3.1. Reactius

L'omeprazole es va adquirir a Sigma (MO, EUA). L'omeprazole sulfona i 5-hidroxiomeprazole van ser donats per AstraZeneca (Suècia). Els reactius utilitzats per preparar les fases mòbils van ser: dodecilsulfat sòdic (SDS), hidròxid de sodi (Merck, Alemanya), dihidrogenfosfat de sodi, propanol (Scharlab, Barcelona), àcid clorhídric, metanol i etanol (J.T. Baker, Països Baixos). Tant les dissolucions dels analits com les fases mòbils es van preparar amb aigua destil·lada desionitzada (Millipore SAS, França). Els productes farmacèutics (OME Normon, OME Ratiopharm i OME Pensa) es van adquirir en una farmàcia.

10.3.2. Instrumentació

Es va utilitzar el mateix cromatògraf descrit en capítols anteriors, però amb un detector de fila de díodes. La separació analítica es va dur a terme amb una columna Kromasil C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm de grandària de partícula). Els paràmetres cromatogràfics (flux, volum d'injecció i la temperatura de la columna) van ser els mateixos que es descriuen en el capítol 9.2. Les proteïnes de les mostres de sèrum es van precipitar fent ús d'una centrífuga Centronic BL (Selecta, Barcelona). Les mesures de pH, pesades analítiques, agitació i dissolució de les mostres també es van realitzar amb els mateixos equips que ja han estat detallats en els capítols anteriors.

10.3.3. Preparació de fases mòbils, dissolucions estàndard i mostres

Les fases mòbils micel·lars es van preparar com es descriu en el capítol 8, però utilitzant propanol en lloc de butanol com a dissolvent orgànic.

Es van preparar dissolucions patró de 20 µg/mL de cada compost (HOME, OME, i OMES), dissolent cadascun d'ells en uns pocs mil·lilitres d'etanol mitjançant un bany d'ultrasons, i finalment es van aforar amb una dissolució 0.1 M SDS a pH 9.

Les mostres de sang van ser extretes a voluntaris sans i es van passar a tubs DB SST que contenien gel separador (BD Vacutainer Systems, Regne Unit), sent posteriorment centrifugades durant 5 min a 3000 rpm i a 4 °C. Tot seguit, el líquid es va separar de les proteïnes precipitades i emmagatzemat a -21 °C fins al moment del seu ús. Les mostres d'orina van ser recollides en dispositius de recollida d'orina (BD Vacutainer Systems).

Es van preparar dissolucions patró en orina i sèrum adicionades a una concentració de 20 µg/mL d'HOME, OME, i OMES, i posteriorment diluint l'orina en un factor 1:10 i el sèrum en un factor 1:5, amb una dissolució 0.1 M SDS-pH 9. Les dissolucions es van preparar diàriament i van ser protegides de la llum directa.

Les mostres biològiques dels pacients van ser injectades directament en el sistema cromatogràfic després d'haver realitzat la dilució anteriorment indicada amb 0.1 M SDS–pH 9. Totes les dissolucions i mostres es van filtrar a través de filtres de niló de 0.45 µm (Micron separacions, MA, EUA).

10.3.4. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica es va dur a terme en una columna Kromasil C18 termostatitzada a 25 °C. La composició de la fase mòbil òptima va ser 0.08 M SDS–10% (v/v) propanol, tamponada amb 0.01 M NaH₂PO₄ a pH 7. La velocitat de flux de la fase mòbil, el volum d'injecció i la longitud d'ona van ser 1 mL/min, 20 µL i 305 nm, respectivament. En aquestes condicions, el temps total d'anàlisi va ser inferior a 11 min. Els senyals analítics es van adquirir mitjançant un PC connectat al cromatògraf a través d'una estació de dades d'Agilent (Rev. A.10.01). El programari *Michrom* [38] va ser utilitzat per al tractament de les dades cromatogràfiques.

10.3.5. Determinació d'omeprazole en medicaments

Els medicaments analitzats (Normon, Pensa i Ratiopharm) van ser càpsules que contenen 20 mg d'OME i excipients. Aquestes es van pesar abans i després de buidar-les amb cura, per obtenir un pes exacte del seu contingut (n = 10). Tot seguit, es van pesar diverses porcions (equivalent a aproximadament 3 mg d'OME) i cadascuna es va sonicar en una xicoteta quantitat d'etanol (5% v/v del volum final) en un bany d'ultrasons. A continuació es va afegir una dissolució 0.1 M SDS–pH 9 per afavorir l'extracció dels compostos, i es va usar novament el bany d'ultrasons. Finalment, es va diluir amb la mateixa dissolució micel·lar per obtenir una concentració de 10 µg/mL. Els excipients no van ser solubles en el medi micel·lar, i per tant les dissolucions de la mostra es van filtrar abans de la seua injecció en el sistema cromatogràfic.

10.4. Resultats i discussió

10.4.1. Selecció de la fase mòbil i optimització cromatogràfica

En primer lloc, es va estudiar l'estabilitat de l'OME a diferents valors de pH (3, 5, 7, 9 i 11) utilitzant una fase mòbil micel·lar de 0.15 M SDS–5% propanol. La màxima estabilitat es va trobar a pH 11, mentre que a valors de pH inferiors a 7, l'OME es va descomposar molt ràpidament. No es van trobar diferències significatives entre pH 9 i 11, per tant, es va ser seleccionar pH 9 per a la preparació de les dissolucions patrò perquè l'OME i els seus metabòlits eren també bastant estables. Cal assenyalar que el pH de la fase mòbil i el de les dissolucions d'OME han de ser semblants a fi d'evitar la seua descomposició. Una fase mòbil amb un pH superior a 7 pot danyar una columna C18 quan s'utilitza de forma freqüent, mentre que per davall d'aquest valor l'OME es descomposa ràpidament. Finalment, les fases mòbils en l'estudi d'optimització es van preparar a pH 7 considerant tant l'estabilitat dels analits com la de la columna. Cal assenyalar que l'objectiu d'aquest capítol no va ser identificar els productes de degradació de l'OME, sinó desenvolupar un procediment per a la separació i anàlisi de l'OME i els seus dos metabòlits principals.

El següent pas va ser la selecció del dissolvent orgànic, que en aquest cas va ser el propanol, ja que permetia la completa resolució dels tres compostos en un temps d'anàlisi adequat. A més a més, amb propanol el pic de l'HOMe i la banda de proteïnes es resolien completament, mentre que si s'utilitza butanol o pentanol, s'espera un solapament dels compostos amb els pics de les matrius.

A continuació, es va portar a terme la selecció de les millors condicions per a l'anàlisi simultani de l'OME i els seus dos principals metabòlits, per a la qual cosa es van injectar els compostos objecte d'estudi en les següents fases mòbils d'SDS (M) / propanol (%): 0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.10/7.5, 0.15/2.5 i 0.15/12.5. En aquestes fases mòbils es van mesurar els factors de retenció (k), eficàcies (N) i factors d'asimetria (B/A) en els cromatogrames individuals de cada compost, i es van tractar

amb el programari *Michrom* [38]. El model utilitzat per a aquestes prediccions va ser el mateix dels capítols 4–9 (veure equació 7.1).

L'optimització de la resolució de la mescla dels compostos es va realitzar mitjançant el criteri de les fraccions solapades de cada pic cromatogràfic, el qual ja es va utilitzar en el capítol 4, i també es va modelitzar la forma dels pics cromatogràfics per predir els cromatogrames d'acord amb les equacions desenvolupades per Lapassió *et al.* [39].

Els compostos es van resoldre sempre en tot l'espai definit per les cinc fases mòbils del disseny experimental. La composició de la fase mòbil òptima es va obtenir considerant un criteri de màxima resolució en un menor temps d'anàlisi: 0.08 M SDS–10% de propanol–0.01 NaH₂PO₄ tamponada a pH 7. Els paràmetres cromatogràfics (*k*, *N* i *B/A*) obtinguts en aquesta fase mòbil per als compostos estudiats van ser: 3.5, 2400 i 1.1; 7.6, 3000 i 1.1; i 8.9, 3100 i 1.0 per a HOME, OMES i OME, respectivament. El temps d'anàlisi va ser inferior a 11 min i no es va observar cap interferència de la banda proteica o dels compostos endògens, encara que si es va produir un xicotet solapament de l'HOME amb un metabòlit o un producte de descomposició de l'OME en la matriu d'orina.

10.4.2. Comportament de les mostres de sèrum i orina

Amb la finalitat d'avaluar el senyal de fons de les matrius, es van injectar directament diversos blancs de sèrum i orina en el cromatògraf després de la dilució adequada. Es van obtenir uns perfils corresponents a la banda de proteïnes i als compostos endògens molt similars en totes les mostres (Figures 10.2a i 10.3a). No es van trobar pics addicionals en les anàlisis posteriors per la qual cosa aquests resultats aconsegueixen els requisits d'anàlisi rutinàries.

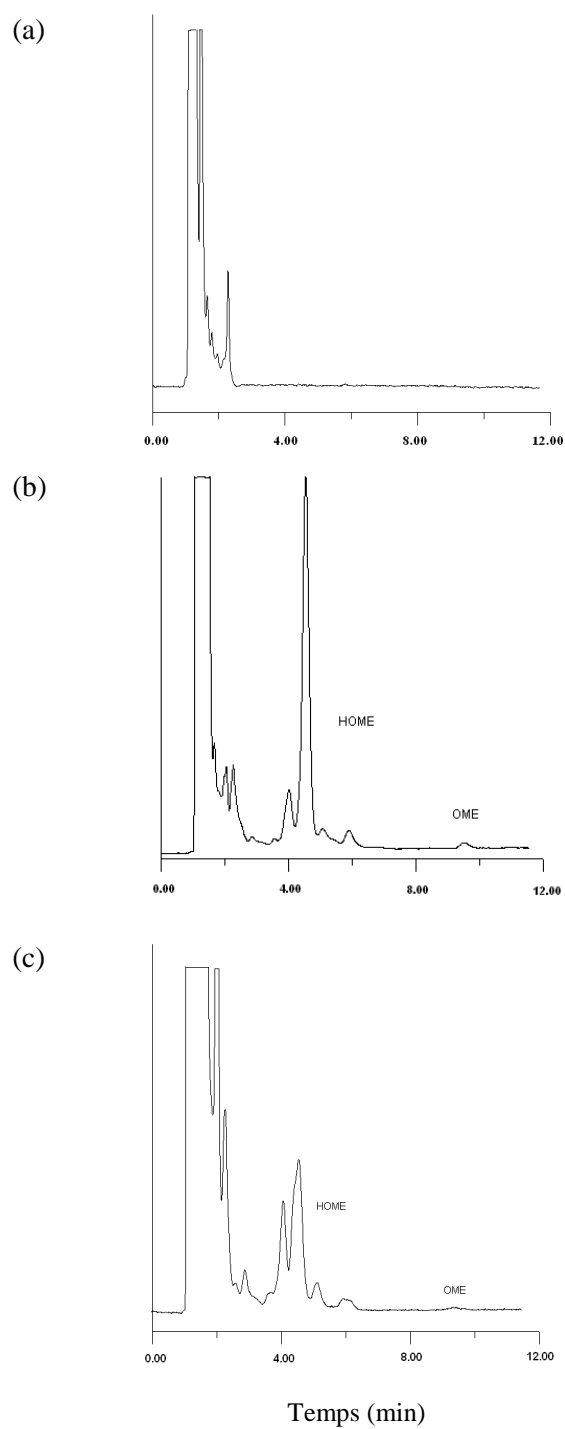


Figura 10.2. Cromatogrames del blanc d'orina (a), omeprazole excretat en orina després de 3 h (b), i 10 h (c) de la seua ingestió. Fase mòbil: 0.08 M SDS–10% propanol–pH 7.

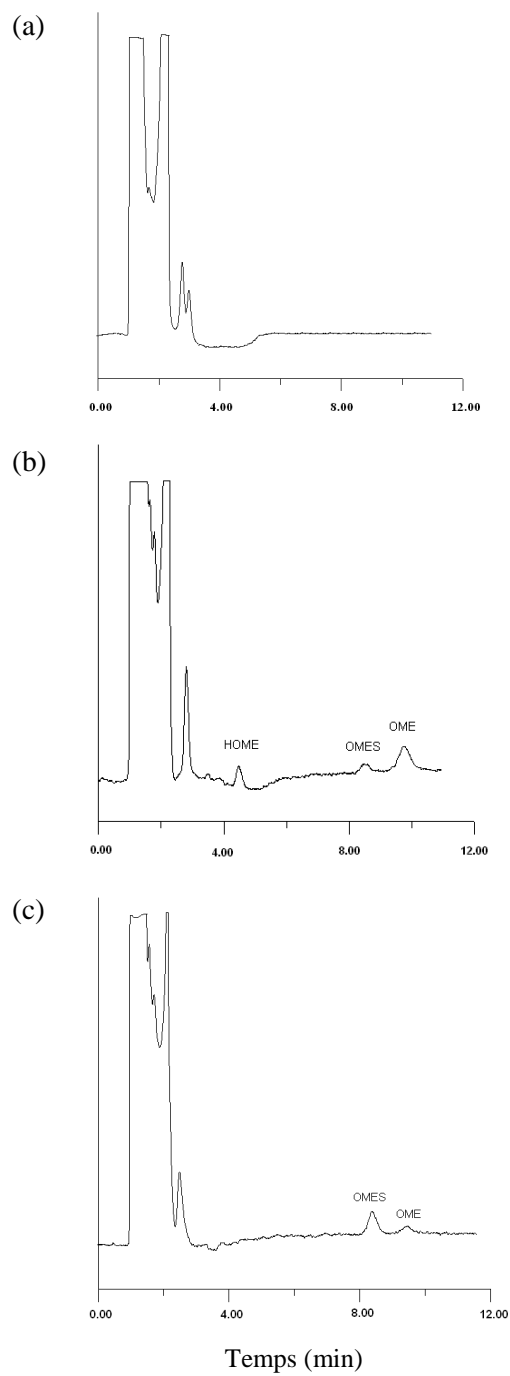


Figura 10.3. Cromatogrames del blanc de sèrum (a), omeprazole en sèrum després de 2 h (b), i 6 h (c) de la seua ingestió. Fase mòbil: 0.08 M SDS–10% propanol–pH 7.

10.4.2. Validació del mètode

La guia de validació seguida va ser la mateixa que s'ha utilitzat en els capítols 3–5, *Food and Drug Administration* (FDA) [37]. Els paràmetres avaluats van ser: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, precisió i exactitud, recuperació i robustesa.

a) Selectivitat

Per estudiar la selectivitat es van seleccionar sis mostres de sèrum i orina que no contenen OME com a mostres control, que es van injectar directament en el sistema cromatogràfic. D'aquesta forma es determina el grau d'interferència dels endògens en l'anàlisi dels compostos estudiats. No es va trobar cap interferència dels endògens en les matrius fisiològiques estudiades (Figures 10.2a i 10.3a), a excepció d'una xicoteta superposició de l'HOME amb un metabòlit o un possible producte de descomposició.

b) Linealitat, límits de detecció i quantificació

Les corbes de calibratge es van obtenir mesurant les àrees dels pics cromatogràfics obtingudes a partir de dissolucions preparades en set concentracions diferents (sis rèpliques), en l'interval 10–2000 ng/mL per a HOME, i 25–2000 ng/mL per a OME i OMES, en tres matrius diferents: medi micel·lar, sèrum (amb un factor de dilució d'1:5) i orina (amb un factor de dilució d'1:10). Per estudiar la variabilitat dels paràmetres de calibratge, les corbes es van obtenir durant 5 dies en un període de 2 mesos preparant-se a partir de diferents patrons. Els resultats en les tres matrius van ser semblants. Els pendents, determinats pel mètode de l'anàlisi de regressió lineal per mínims quadrats, van ser: $(5.35 \pm 0.13) \times 10^{-4}$ (RSD = 2.4%), $(4.00 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ (RSD = 2.0%), i $(5.50 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ (RSD = 1.5%) per a l'HOME, OME, i OMES, respectivament. L'ordenada en l'origen també va ser semblant en totes les matrius, -0.0022, i els coeficients de determinació van ser $R^2 > 0.9998$.

Es van calcular els límits de detecció (LOD) per a l'HOME, OME, i OMES en medi micel·lar, sèrum i orina amb el criteri $3s$ (tres voltes la desviació estàndard de la dissolució de menor concentració inclosa en la calibratge dividida pel pendent de la corba de calibratge) injectant 10 voltes la dissolució de menor concentració. Els límits de quantificació (LOQ) en les tres matrius van ser seleccionats com la concentració més baixa utilitzada en la corba de calibratge. Els valors dels LODs i LOQs es resumeixen en la taula 10.1.

Taula 10.1. Límits de detecció i quantificació per a l'OME, OMES i HOME.

Analit	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Matriu
OME	4.62	25	SDS
	5.44	25	Orina
	5.79	25	Sèrum
HOME	1.77	10	SDS
	3.18	10	Orina
	3.34	10	Sèrum
OMES	4.24	25	SDS
	5.40	25	Orina
	5.45	25	Sèrum

c) Precisió i exactitud

Es va determinar la precisió intra i interdia en l'interval de 10–2000 ng/mL per a HOME i 25–2000 ng/mL per a OME i OMES, en medi micel·lar, sèrum (1:5) i orina (1:10) en set nivells de concentració diferents, obtenint-se resultats semblants en totes tres matrius. L'anàlisi intradia es va determinar mitjançant la injecció d'aquestes dissolucions sis voltes durant el mateix dia, mentre que les anàlisis interdia corresponen a la mitjana de cinc mesures dels valors intradia obtinguts en 5 dies durant un període de tres mesos realitzats per diferents analistes i equips (taula 10.2). Les dades mostren una bona precisió (expressada com a RSD, %), i exactitud (expressada com a error relatiu, Er %) amb valors inferiors al 8% i 3%, respectivament, els quals són acceptables per a la realització d'anàlisis rutinàries.

d) Robustesa

La robustesa del mètode va ser examinada en realitzar lleugers canvis sobre els principals paràmetres cromatogràfics (concentració d'SDS, percentatge de propanol, pH, i flux) respecte a les condicions òptimes d'anàlisi. Així, es va injectar sis voltes una dissolució patró que contenia els tres compostos a una concentració d'1 µg/mL en diverses condicions (taula 10.3) i es va calcular la seua influència sobre la retenció dels compostos. Els resultats indiquen que la variació realitzada sobre aquests paràmetres no altera significativament la retenció dels compostos estudiats (RSD < 11.5%). El flux és el paràmetre que modifica en major grau el temps de retenció. Cal indicar que es poden realitzar al voltant de 200 injeccions de mostres biològiques diluïdes de forma consecutiva sense danyar la columna i, per tant, sense afectar el funcionament analític.

Taula 10.2. Precisió i exactitud intra i interdia dels analits en un medi micel·lar.

Analit	Conc. addic. (ng/mL)	Trobada ^a		Exactitud		Intradia		Trobada ^b		Exactitud		Interdia	
		(mitjana ± SD)	(ng/mL)	Er (%)	RSD (%)	(mitjana ± SD)	(ng/mL)	Er (%)	RSD (%)	Er (%)	RSD (%)		
HOME	10	9.8 ± 0.3	2.0	3.1	10.2 ± 0.5	2.0	3.1	4.9					
	50	49.5 ± 2.5	1.0	5.1	50.8 ± 1.9	1.6	3.7						
	100	100.4 ± 1.5	0.4	1.5	100.1 ± 0.9	0.1	0.9						
	250	246 ± 7	1.6	2.8	248.3 ± 1.9	0.7	0.8						
	500	514 ± 9	2.8	1.7	504 ± 7	0.8	1.4						
	1000	986 ± 10	1.4	1.0	995 ± 9	0.5	0.9						
2000	2004 ± 110	0.2	5.5	2006 ± 3	0.3	0.1							
OME	25	24.4 ± 1.9	2.4	7.8	25.3 ± 0.9	1.2	3.6						
	50	49 ± 3	2.0	6.1	50.5 ± 1.4	1.0	2.8						
	100	98 ± 3	2.0	3.1	99.9 ± 1.5	0.1	1.5						
	250	247 ± 11	1.2	4.5	248 ± 4	0.8	1.6						
	500	507 ± 15	1.4	3.0	501 ± 5	0.2	1.0						
	1000	993 ± 16	0.7	1.6	994 ± 6	0.6	0.6						
2000	1994 ± 14	0.3	0.7	2002 ± 6	0.1	0.3							
OMES	25	25.0 ± 1.6	0.0	6.4	25.2 ± 0.9	0.8	3.6						
	50	50 ± 4	0.0	8.0	50.6 ± 1.4	1.2	2.8						
	100	99 ± 6	1.0	6.1	99 ± 1.1	1.0	1.1						
	250	252 ± 17	0.8	6.7	250.7 ± 2.3	0.3	0.9						
	500	495 ± 15	1.0	3.0	495.9 ± 0.7	0.8	0.1						
	1000	1020 ± 21	2.0	2.1	1005 ± 9	0.5	0.9						
2000	1989 ± 21	0.6	1.1	1999 ± 7	0.05	0.3							

^a n = 6, ^b n = 5

Taula 10.3. Avaluació de la robustesa del mètode.

Paràmetre cromatogràfic	Nivell	HOME	OME	OMES
		t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)
A: SDS (M)				
0.075	-0.005	4.51	9.98	8.66
0.08	0	4.37	9.53	8.32
0.085	+0.005	4.31	9.29	7.93
Mitjana ± SD		4.39 ± 0.10	9.6 ± 0.4	8.3 ± 0.4
RSD (%)		2.3	4.2	4.8
B: Propanol (% v/v)				
6.9	-0.1	4.37	9.58	8.66
7	0	4.37	9.53	8.32
7.1	+0.1	4.28	9.34	7.87
Mitjana ± SD		4.34 ± 0.04	9.48 ± 0.13	8.3 ± 0.4
RSD (%)		0.9	1.4	4.8
C: pH				
6.9	-0.1	4.38	9.56	8.36
7	0	4.37	9.53	8.32
7.1	+0.1	4.34	9.52	7.87
Mitjana ± SD		4.363 ± 0.021	9.54 ± 0.06	8.2 ± 0.3
RSD (%)		0.5	0.6	3.7
D: Flux (mL/min)				
0.9	-0.1	4.88	10.65	9.24
1	0	4.37	9.53	8.32
1.1	+0.1	3.95	8.60	7.52
Mitjana ± SD		4.4 ± 0.5	9.6 ± 1.0	8.4 ± 0.9
RSD (%)		11.4	10.4	10.7

e) Estabilitat

Es va dur a terme un estudi d'estabilitat dels tres compostos en l'interval de pH entre 3 i 11, observant-se una ràpida descomposició dels analits per davall de pH 7. D'altra banda, no es va observar cap diferència en l'estabilitat en l'interval entre pH 9 i 11. Tanmateix, a pH 9 es va produir la descomposició de dissolucions estàndard d'HOME, OME, i OMES preparades en SDS, després de quatre dies d'emmagatzematge, mitjançant l'aparició de pics en els cromatogrames els quals solapaven amb els dels analits. Totes les dissolucions es van conservar a 4 °C fins ser analitzades, i es van usar com a màxim durant una setmana. La dissolució d'OME es va analitzar immediatament després de la seua preparació, així com a diferents intervals d'emmagatzematge al llarg del període d'estudi. Així, després de 24 h, 48 h i 96 h, l'OME es va descomposar en un 9%, 29% i 31%, respectivament. D'altra banda, es va observar una descomposició de l'1% d'ambdós metabòlits (HOME i OMES) a les 48 h, que va ser confirmada per l'aparició d'un nou pic en el cromatograma. Es van obtenir els mateixos resultats en les matrius d'orina i sèrum.

f) Anàlisi d'omeprazole en medicaments

Es van construir corbes de calibratge a partir de les àrees dels pics, utilitzant dissolucions dels compostos en cinc concentracions creixents en el rang de 0.5–50 µg/mL, amb coeficients de determinació $R^2 > 0.999$. No es va observar cap variació significativa en els paràmetres d'ajust (pendent i ordenada en l'origen) quan es van obtenir les corbes en dies consecutius o diferents. Es van determinar tres medicaments que contenen OME comercialitzats en Espanya (taula 10.4), analitzant-se 10 mostres de cadascun d'ells que s'injectaren per triplicat. Aquestes es van pesar, triturar i homogeneïtzar. Posteriorment es van pesar sis porcions i cadascuna es va sonicar en una xicoteta quantitat d'etanol en un bany d'ultrasons, i tot seguit es va utilitzar una dissolució de 0.1 M SDS–pH 9 per afavorir l'extracció de l'OME de nou

amb ajuda del bany d'ultrasons, i finalment es va diluir amb la mateixa. Els excipients van ser insolubles en el medi micel·lar, per tant, les dissolucions de les mostres es van filtrar abans de la seua injecció en el sistema cromatogràfic, evitant d'aquesta manera que interferisquen en l'anàlisi. La taula 10.4 dóna els valors declarats pels fabricants, valors trobats (99.9%), i la precisió (1.0–1.6%) (n = 6). Els resultats van estar d'acord amb el contingut declarat pels fabricants.

Taula 10.4. Anàlisi de medicaments que contenen omeprazole (n = 6).

Medicament (fabricant)	Composició (mg)/ càpsula	Trobat (mg)	Percentatge del valor declarat (%)	RSD (%)
Omeprazole Ratiopharm (Ratiopharm)	Omeprazole (20), excipients	19.97	99.8	1.0
Omeprazole Normon (Normon)	Omeprazole (20), excipients	19.95	99.7	1.3
Omeprazole Pensa (Pensa Pharma)	Omeprazole (20), excipients	20.05	100.2	1.6

g) Determinació d'omeprazole en mostres adicionades

Es van determinar les recuperacions de l'OME i els seus metabòlits en medi micel·lar, orina i sèrum, utilitzant dissolucions d'SDS, i mostres adicionades d'orina (factor de dilució 1:10), i de sèrum (factor de dilució 1:5), que continguen quantitats conegudes dels compostos a tres concentracions diferents (40, 750 i 1500 ng/mL). Aquestes dissolucions es van processar i analitzar mitjançant el procediment descrit anteriorment. Les recuperacions obtingudes en medi micel·lar van ser molt satisfactòries per tots els composts (97.6–101.9%) amb una precisió (RSD) inferior al 8% (taula 10.5).

Taula 10.5. Recuperacions (%) obtingudes en medi micel·lar.

Analit	Concentració addicionada (ng/mL)	Concentració trobadada (ng/mL)	Recuperació (%)	RSD (%)
OME	40	40 ± 3	100.0	7.5
	750	764 ± 8	101.9	1.0
	1500	1507 ± 14	100.5	0.9
HOME	40	39.3 ± 2.3	98.2	5.8
	750	732 ± 18	97.6	2.5
	1500	1516 ± 17	101.1	1.1
OMES	40	40.1 ± 1.6	100.2	4.0
	750	739 ± 3	98.5	0.4
	1500	1512 ± 8	100.8	0.5

h) Control en mostres reals

Es va realitzar un estudi farmacocinètic en mostres de sèrum i orina després de l'administració oral d'una dosi de 40 mg d'OME a voluntaris sans. Es va recollir una mostra d'orina just abans de la ingestió del fàrmac, que es va utilitzar com a blanc. Les mostres d'orina van ser preses 15 voltes al dia, i es va mesurar el volum excretat. Aquestes mostres es van diluir en un factor 1:10, i es van injectar directament en el sistema cromatogràfic després de ser filtrades. La figura 10.4 mostra la corba de l'eliminació urinària de l'HOME, OME, i OMES. Les concentracions màximes excretades es van trobar a les 3.5 h, sent aquestes 55 µg/mL per a HOME, i 282 i 420 ng/mL per a OME i OMES, respectivament. La corba d'eliminació de l'HOME és més fàcil d'observar que la dels altres dos analits i es va poder detectar fins a les 12 h, mentre que l'OMES i l'OME van ser detectables fins 6 i 8 h després de l'administració oral, respectivament. La quantitat final eliminada d'HOME, OME, i OMES a les 12 hores va ser de 15.7 mg, 40 ng, i 30 ng, és a dir, 39.6, 0.1, i 0.08% de la dosi ingerida, respectivament. Les Figures 10.2b i 10.2c mostren els cromatogrames de l'HOME, OME, i OMES excretats a les 3 h i 10 h després de l'administració oral. Aquests resultats indiquen que es poden realitzar estudis d'excreció en les condicions cromatogràfiques proposades.

Les mostres de sèrum es van prendre dos vegades al dia, a les 2 i 6 h després de l'administració oral. Aquestes es van diluir en un factor 1:5, i es va seguir el mateix procediment descrit en l'orina. Les concentracions de l'HOME, OME, i OMES en el sèrum van ser de 313, 79, i 177 ng/mL, respectivament després de 2 h de l'administració, i, 15 i 383 ng/mL per a OME, i OMES, respectivament, després de 6 h, mentre que l'HOME no es va detectar. La figura 10.3b i 10.3c mostren els cromatogrames a les 2 i 6 h després de l'administració oral.

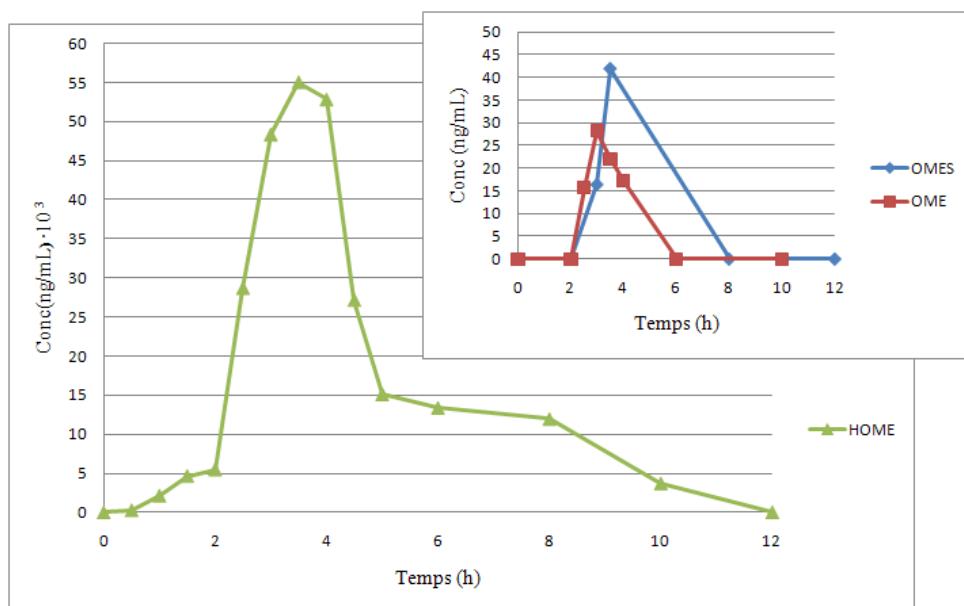


Figura 10.4. Estudi d'excreció urinària d'HOME (▲), OME (■), i OMES (◆).

10.5. Conclusions

La cromatografia líquida micel·lar ha resultat ser una tècnica adequada per a l'anàlisi de l'omeprazole i els seus dos principals metabòlits (omeprazole sulfona i 5-hidroxiomeprazole) en mostres fisiològiques. La validació es va realitzar de forma eficient seguint la guia *Food and Drug Administration* amb resultats satisfactoris en quant a la selectivitat, precisió, exactitud i robustesa. Els límits de detecció i quantificació van ser adequats per monitoritzar aquests compostos en matrius fisiològiques. Un avantatge d'aquest procediment és la possibilitat d'injectar directament mostres de sèrum i orina en el sistema cromatogràfic sense tractament previ, tret de la filtració, evitant així el tediós procés d'extracció, per la qual cosa aquest procediment permet realitzar estudis farmacocinètics. També es van analitzar medicaments que contenen omeprazole obtenint bons percentatges de recuperació (al voltant del 100%). Els resultats indiquen que el procediment és prou sensible per a la realització d'anàlisis rutinàries del compost tant en matrius biològiques com en preparacions farmacèutiques. Aquest mètode compleix amb els requisits del concepte de "química verda" atès que fa ús de reactius respectuosos amb el medi ambient (no inflamables, i poc tòxics), i és relativament econòmic en comparació amb altres mètodes, la qual cosa resulta atractiva en moltes situacions.

10.6. Referències

1. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, EUA, 1988.
2. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, Londres, Regne Unit, 2004.
3. B. Person, S. Wendsjo, *J. Chromatogr.* 32 (1985) 375.
4. G.W. Sluggett, J.D. Stong, J.H. Adams, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 357.
5. A. Tivesten, S. Folestad, V. Schonbacher, K. Svensson, *Chromatographia* 49 (1999) S7.
6. C. Sastry, Y. Naidu, S. Murty, *Talanta* 44 (1997) 1211.
7. S. McClean, E. O'Kane, V.N. Ramachandran, W.F. Smyth, *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 81.
8. S. Pinzauti, P. Gratteri, S. Furlanetto, P. Mura, E. Dreassi, R. Phan-Tan-Luu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 881.
9. F.C. Cheng, Y.F. Ho, L.C. Hung, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 35.
10. K.H. Yuen, W.P. Choy, H.Y. Tan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 715.
11. M.C. Dubuc, C. Hamel, M.S. Caubet, J.L. Brazier, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 1161.
12. G. García Encina, R. Farrán, S. Puig, L. Martínez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 371.
13. K. Hay Yuen, W. Peng Choy, H. Yin Tan, J. Woei Wong, S. Ping Yap, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 715.
14. J. Macek, J. Klíma, P. Ptáček, *J. Chromatogr. B* 852 (2001) 282.
15. H.M. González, E.M. Romero, T. de J. Chavez, A.A. Peregrina, V. Quezada, C. Hoyo Vadillo, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 459.
16. E.J. Woolf, B.K. Matuszewski, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 229.
17. H. Kanazawa, A. Okada, Y. Matsushima, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 1.

18. A. Tolonen, M. Turpeinen, J. Uusitalo, O. Pelkonen, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (2005) 155.
19. M. Shimizu, T. Uno, T. Nijoka, N. Yaii-Furukori, T. Takahata, K. Sugawara, T. Tateishi, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 241.
20. N.L. Rezk, K.C. Brown, A.D.M. Kashuba, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 314.
21. R. Linden, A.L. Ziulkoski, M. Wingert, P. Tonello, A.A. Souto, *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2007) 733.
22. U. Hofmann, M. Schawab, G. Treiber, U. Klotz, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 85.
23. Q.B. Cass, V.V. Lima, R.V. Oliveira, N.M. Cassiano, A.L. Degani, J. Pedrazzoli, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 275.
24. R. Mathias Orlando, P. Sueli Bonato, *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 227.
25. J. Martens Lobenhoffer, I. Reiche, U. Tröger, K. Mönkemüller, P. Malfertheiner, S. M. Bode Böger, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 301.
26. R. Cirilli, R. Ferretti, B. Gallinella, E. De Santis, L. Zanitti, F. La Torre, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 105.
27. L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, C. Alonso, J.J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 118.
28. D. Castro, M.A. Moreno, S. Torrado, J.L. Lastres, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 291.
29. A.M. Qaisi, M.F. Tutunji, L.F. Tutunji, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 384.
30. A. Riedel, C.S. Leopold, *Pharmazie* 60 (2005) 126.
31. A. Riedel, C.S. Leopold, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 151.
32. M. Mathew, V. Das Gupta, R.E. Bailey, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 965.
33. M. Espinosa Bosch, A.J. Ruiz Sánchez, F. Sánchez Rojas, C. Bosch Ojeda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 831.
34. A. Berthod, M.C. García Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.

35. S. Carda Broch, M.T. Gil Agustí, L. Monferrer Pons, J.S. Esteve Romero, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 254.
36. J. Esteve Romero, S. Carda Broch, M. Gil Agustí, M.E. Capella Peiró, D. Bose, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
37. U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration, Guidance for Ind. Bioanal. Method Validation, 2001. (www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf)
38. J.R. Torres Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, Nova York, EUA, 2000.
39. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.

Conclusions

Aquesta Memòria descriu diversos mètodes de separació i determinació de diferents famílies d'antibiòtics (14 fluoroquinolones, 4 penicil·lines i 6 sulfamides), així com substàncies relacionades amb aquests (omeprazole i els seus metabòlits) en una àmplia varietat de matrius (medicaments, orina, sèrum, i aliments), mitjançant la seua injecció directa i elució isocràtica en fases mòbils micel·lars que contenen dodecilsulfat sòdic (SDS) i un dissolvent orgànic:

- (i) Antibiòtics de la família de les fluoroquinolones (àcid oxolínic, àcid pipemídic, ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, levofloxacina, lomefloxacina, marbofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, i sarafloxacina), emprant detecció fluorescent o UV.
- (ii) Antibiòtics del grup de les penicil·lines (amoxicil·lina, ampil·lina, cloxacil·lina, i dicloxacil·lina), amb detecció UV.
- (iii) Antibiòtics del grup de les sulfamides (sulfacetamida, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizole, sulfametoxazole i sulfatiazole), mitjançant detecció en el visible prèvia detecció diazotació i acoblament amb el reactiu de Bratton-Marshall.
- (iv) Compostos relacionats amb els antibiòtics (omeprazole, omeprazole sulfona i 5-hidroxiomeprazole), amb detecció en la regió UV.

Les taules C1 i C2 mostren les estructures dels compostos estudiats així com les seues constants de dissociació àcid-base i les de repartiment octanol-aigua, mentre que en la taula C3 es resumeixen les principals característiques dels mètodes desenvolupats en la present Memòria.

A continuació es detallen les conclusions més significatives agrupades en les següents parts:

- C1. Conceptes bàsics de la cromatografia líquida micel·lar
- C2. Protocols de validació per a mètodes analítics
- C3. Anàlisi d'antibiòtics en fluids fisiològics i productes farmacèutics
- C4. Anàlisi d'antibiòtics en aliments
- C5. Anàlisi d'omeprazole i els seus principals metabòlits en fluids fisiològics

C1. Conceptes bàsics de la cromatografia líquida micel·lar

La cromatografia líquida micel·lar (MLC), que utilitza fases mòbils de tensioactius a una concentració superior a la micel·lar crítica, és una alternativa a la cromatografia líquida en fase inversa convencional i proporciona una solució a la injecció directa de mostres fisiològiques o d'aliments, mitjançant la solubilització dels seus components proteics (que elueixen conjuntament o poc després del front del dissolvent). La possibilitat de la injecció directa de les mostres en el cromatògraf simplifica i accelera en gran mesura el seu tractament, la qual cosa implica una major exactitud dels procediments analítics i un menor cost econòmic.

La versatilitat de l'MLC es deu a la varietat d'interaccions que s'estableixen entre els soluts eluïts, la fase estacionària, la fase aquosa i les micel·les. Les seues característiques d'elució permeten l'anàlisi de compostos en un ampli interval de polaritats. La retenció és molt reproducible i pot modelitzar-se amb gran exactitud per predir els canvis de retenció, en variar la composició de la fase mòbil (concentració del tensioactiu i fracció volumètrica del dissolvent orgànic). D'aquesta forma és facilitada l'optimització de les condicions de separació.

La presència del tensioactiu no sols modifica les interaccions que s'estableixen dins de la columna, sinó que redueix la quantitat necessària de dissolvent orgànic en la fase mòbil, que es pot recircular per la seua baixa evaporació. Aquestes característiques són molt interessants donada l'actual preocupació sobre la reducció de residus orgànics contaminats en els laboratoris.

La descripció del comportament de retenció en fases mòbils micel·lars és un fet ben conegut que ha estat recolzat per diversos models empírics i mecanicistes proposats al llarg dels anys. També els diferents equilibris que s'estableixen en la columna entre el solut, la fase mòbil i la fase estacionària modificada pel tensioactiu han estat estudiats de forma exhaustiva.

Sovint, la complexitat de les mescles dels compostos estudiats i la important modificació del seu comportament cromatogràfic en variar la composició de la fase mòbil, requereix l'ús de simulacions assistides per ordinador en MLC per tal de poder seguir amb detall les modificacions en els cromatogrames. Aquestes simulacions es poden realitzar amb un alt grau de fiabilitat, gràcies a l'ús d'eines quimiomètriques.

Recentment s'ha descrit un nou mode de cromatografia micel·lar depenent de la concentració de tensioactiu i dissolvent orgànic: cromatografia submicel·lar alta, on el tensioactiu està en una concentració suficient perquè es formen micel·les, mentre que el contingut del dissolvent orgànic és alt. Aquest mode obri un nou ventall de possibilitats en les noves aplicacions d'aquesta tècnica cromatogràfica, i complementa l'anomenada cromatografia submicel·lar baixa, on el nombre de molècules lliures del tensioactiu en la fase mòbil és insignificant però sí que recobreix la fase estacionària, coneguda tradicionalment com cromatografia de parells iònics.

Els estudis de tipus fonamental en MLC han servit per al desenvolupament de la tècnica i l'establiment de les seues bases, sense els quals hauria resultat impossible el seu posterior ús en les diverses aplicacions.

C2. Protocols de validació per a mètodes analítics

El fet que molts dels termes tècnics que s'utilitzen en els processos d'avaluació dels mètodes varien en els diferents sectors de mesura analítica, tant pel que fa al seu significat com a la forma en què es determinen, dificulta la comprensió de l'analista sobre el procediment de validació.

La validació d'un mètode analític ha de permetre comprovar l'aptitud dels mètodes, així com la capacitat del personal i del laboratori, cosa que es recolza en els paràmetres estadístics del procediment. Els mètodes desenvolupats per un laboratori han de ser totalment validats abans del seu ús. Els procediments i l'abast de la validació no són sempre els mateixos i s'han d'establir de forma individual.

La validació requereix un entorn de treball que garantisca la seguretat dels resultats que es vagen a obtenir, per a la qual cosa s'ha de treballar d'acord amb unes pautes correctes que han de seguir els laboratoris i que venen establides per les normes de bones pràctiques de laboratori.

Els mètodes analítics han de ser validats o revalidats pel laboratori que fa ús dels mateixos: (i) abans del seu ús rutinari, (ii) cada vegada que es canvien les condicions en què es va validar originàriament, o bé (iii) quan es modifiqui el mètode sense que estiguera previst.

La validació consisteix en tres etapes: (i) establiment de les condicions que ha de complir, (ii) determinació dels paràmetres estadístics del procediment, i (iii) valoració dels resultats de la validació per comparació dels paràmetres estadístics obtinguts en les condicions establides, i presa de decisions sobre la validesa del procediment per al propòsit establert. Aquest procés finalitza quan el mètode és capaç de respondre a la necessitat establida, de manera que és innecessari un major desenvolupament.

Els paràmetres de qualitat d'un mètode analític que haurien de ser verificats són: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, exactitud, precisió, recuperacions, i robustesa, la definició dels quals es pot trobar en diversos documents de la IUPAC o ISO, entre d'altres. Hi ha diferents guies de validació en funció de la matriu a analitzar, d'entre les quals es poden destacar les següents que s'han utilitzat en els mètodes desenvolupats en aquesta Memòria: International Conference on Harmonization, Food and Drug Administration, i la Decisió de la Comissió 2002/657/EC.

C3. Anàlisi d'antibiòtics en fluids fisiològics i productes farmacèutics

Les Fluoroquinolones i les penicil·lines es van analitzar en orina amb detecció fluorescent o UV, respectivament. En aquesta matriu es va fer ús de la metodologia d'injecció directa on es pot utilitzar la mateixa columna per a l'anàlisi d'un gran nombre de mostres, eliminant d'aquesta forma el risc d'una baixa reproductibilitat dels procediments que empren una extracció prèvia a l'anàlisi cromatogràfic. Les micel·les tendeixen a enllaçar-se a les proteïnes competitivament, donant lloc així a complexos proteïnes-compostos i proteïnes lliures. Així, les proteïnes són solubilitzades i arrossegades de forma innòcua amb el dissolvent en compte de precipitar en la columna. Les anàlisis realitzades mostren la conveniència de realitzar la injecció de mostres d'orina després de la seua dilució, per evitar l'exposició innecessària de la columna a una mostra que conté una concentració elevada de proteïnes, i reduir l'amplada de banda que aquestes originen, així com la dels pics dels compostos endògens. Per a la majoria dels fàrmacs la sensibilitat assolida després de la dilució va ser adequada per a la seua detecció en orina, fins 24 h després de la seua ingestió. D'altra banda es va comprovar que en estes condicions, els temps de retenció no es van modificar després de realitzar vora 250 injeccions en el sistema cromatogràfic (màxim nombre d'injeccions realitzades amb una mateixa fase mòbil sense netejar la columna). Cal assenyalar que en les

experiències incloses en aquesta Memòria, amb la finalitat de disminuir costos d'operació, la fase mòbil micel·lar es va recircular.

Els procediments d'injecció directa desenvolupats poden aplicar-se en el control rutinari dels fàrmacs en mostres d'orina. Els límits de quantificació i la fase mòbil seleccionada en cada cas es mostren en la taula C3. Les columnes utilitzades van ser: fenil (amoxicil·lina), Zorbax C18 (penicil·lines) i C18 (fluoroquinolones).

Els valors de desviació estàndard relativa (RSD, %) corresponents a la precisió intra i interdia van ser inferiors al 8.5%.

En la bibliografia, es discuteix amplament sobre la disminució de l'eficàcia dels pics cromatogràfics en utilitzar fases mòbils micel·lars, en compte de les clàssiques aquo-orgàniques. Tanmateix aquest no és un comportament general, atès que s'ha demostrat que les eficàcies de compostos aminats, com els β -bloquejants, és superior en l'MLC. D'altra banda, l'amplada dels pics limita la possibilitat d'una investigació sistemàtica dels fàrmacs. Cal indicar que els estudis presentats en aquesta Memòria s'han realitzat amb elució isocràtica. L'MLC possibilita les anàlisis de compostos amb hidrofobicitats molt diverses utilitzant una única fase mòbil. En aquestes condicions cal avaluar el nombre de compostos que es poden resoldre en un temps d'anàlisi adequat. L'ús de gradients potenciaria aquesta possibilitat que, no obstant, no s'ha investigat en aquesta Memòria.

En aquest tipus de matrius es van poder resoldre fins a quatre compostos, amb valors del coeficient de repartiment octanol-aigua ($\log P_{o/w}$) en els següents intervals: 0.87–2.91 per a les penicil·lines, i 0.18–2.04 per a les fluoroquinolones. Tant les fluoroquinolones com les penicil·lines es protonen en distint grau en l'interval de pH de treball de la columna ($pK_{a1} \approx 5.5$ – 6.6 i $pK_{a2} \approx 7.2$ – 8.9 per a les fluoroquinolones, i $pK_{a1} \approx 2.6$, $pK_{a2} \approx 7.4$, i $pK_{a3} \approx 9.6$ per a les penicil·lines). L'ús de fases mòbils a pH 3, per realitzar aquests anàlisis, es justifica per la major retenció que experimenten aquests compostos, afavorint així la seua resolució. A més a més, en medi àcid es produeix una millora en

els valors de les eficàcies dels compostos bàsics produïda per la protonació dels grups silanol lliures de la columna. Tot i això, cal indicar que les penicil·lines es descomposen en un medi àcid, i les seues anàlisis s'han de realitzar pràcticament immediatament després de la seua preparació.

Una volta fixat el pH, l'etapa d'optimització interpretativa de la composició de la fase mòbil es va efectuar només considerant les concentracions de tensioactiu i dissolvent orgànic (propanol o butanol). En el cas de les fluoroquinolones, es va addicionar a la fase mòbil un 0.5% de trietilamina (TEA) per reduir les cues dels pics cromatogràfics dels compostos i millorar l'eficàcia, la qual cosa és una pràctica habitual en fases mòbils aquo-orgàniques convencionals tamponades a valors baixos de pH (2.5–4.0).

Un dels avantatges de l'MLC és l'elevada reproductibilitat dels temps de retenció i la capacitat de predir-los en base a models senzills, que posseeixen una justificació químic-física. En els procediments exposats en aquesta secció, els errors de predicció dels temps de retenció van ser sempre inferiors al 3%. La modelització de la retenció permet l'ús d'estratègies d'optimització interpretativa per resoldre mescules de compostos. Aquestes estratègies posseeixen l'avantatge de requerir un nombre d'experiències inferior a l'emprat en estratègies seqüencials, l'aplicació de les quals es veu dificultada pels canvis en l'ordre d'elució dels compostos en variar la composició de la fase mòbil. A més a més, els òptims que s'obtenen amb les estratègies interpretatives són molt més fiables. Per mesurar la qualitat de la separació cromatogràfica es va aplicar el criteri elemental de les fraccions solapades, que té en compte la posició i la forma dels pics cromatogràfics. Els valors individuals de la fracció solapada, obtinguts per a cada pic, han de combinar-se per quantificar la resolució global de la mescla de compostos en un cromatograma. En tots els casos es va utilitzar el producte no normalitzat de les resolucions elementals que proporciona una visió més realista de la resolució global obtinguda. En el cas de les penicil·lines, es van dur a terme dos processos d'optimització, un per a la columna Kromasil, i un altre per a la columna Zorbax. Es van obtenir els

diagrames de resolució per a totes dues columnes, sent més robust el corresponent a la columna Zorbax ja que proporciona una zona més àmplia on els compostos se separen completament a nivell de la línia base, raó per la qual es va seleccionar aquesta columna en aquest cas.

Els mètodes van ser validats seguint les guies FDA (per a l'anàlisi de fluoroquinolones i penicil·lines en orina), i ICH (per a l'anàlisi de fluoroquinolones en medicaments). Els paràmetres estudiats van ser: selectivitat, linealitat, límits de detecció i quantificació, exactitud, precisió, recuperacions, i robustesa, obtenint en tots els casos bons resultats.

L'anàlisi en mostres reals d'orina va demostrar que els mètodes desenvolupats podien aplicar-se a l'estudi farmacocinètic d'aquests antibiòtics atès que els límits de quantificació eren adequats per realitzar el seguiment considerant que es feia una dilució de la mostra.

També es van analitzar medicaments en forma de comprimits o càpsules que contenen fluoroquinolones i penicil·lines en què els valors trobats estaven en l'interval 96–106% del contingut declarat i les dispersions en l'interval 0.1–2.4%. En tots els casos els resultats van estar d'acord amb el contingut declarat pels fabricants.

C4. Anàlisi d'antibiòtics en aliments

Els programes de control d'aliments tenen com a objectiu fer complir la legislació sobre residus de medicaments, en aquest cas d'antibiòtics, en productes d'origen animal i depenen en gran manera de la disponibilitat de mètodes ràpids i precisos per a la detecció analítica. La Unió Europea ha introduït una legislació relativa a l'autorització de medicaments veterinaris i ha establert nivells màxims residuals (MRL) d'aquests fàrmacs en diferents teixits d'origen animal de consum humà. Així, hi ha una necessitat contínua de desenvolupar nous mètodes analítics fiables per determinar el compliment de les

regulacions tant nacionals com internacionals en totes les àrees de qualitat i seguretat alimentària.

En aquest cas es van analitzar antibiòtics en mostres de llet (sulfamides i fluoroquinolones), ous i peix (fluoroquinolones), seguint les directrius de la Decisió de la Comissió Europea 2002/657/CE o la guia ICH.

En aquestes matrius es van poder resoldre mesclades entre cinc (fluoroquinolones) i sis fàrmacs (sulfamides), amb valors de $\log P_{o/w}$ en els següents intervals: 0.2–3.01 per a les fluoroquinolones, i –1.09–0.85 per a les sulfamides. La columna utilitzada en tots els casos va ser una Kromasil C18, mentre que l'optimització es va portar a terme de la forma descrita per a les mostres fisiològiques en l'apartat C3.

Les sulfamides es van derivatitzar amb el reactiu de Bratton-Marshall (*N*-(1-naftil)etilendiamina), per formar els corresponents azocolorants i posterior determinació cromatogràfica fent ús de detecció en la regió visible ($\lambda = 490$ nm). Tanmateix cal indicar que la determinació dels azocolorants de les sulfamides no es pot considerar, estrictament, com un mètode d'injecció directa, ja que malgrat que s'ha eliminat qualsevol etapa prèvia de separació, es manipula la mostra abans de la seua injecció directa en el cromatògraf, amb l'objectiu de millorar la selectivitat. El mètode desenvolupat es va aplicar a l'anàlisi de mostres de llet addicionades amb els antibiòtics obtenint-se recuperacions en l'interval 83.7–103.0%, la qual cosa indica que el procediment de preparació de les mostres és adequat per a aquest tipus d'anàlisi.

La danofloxacina, difloxacina, flumequina i marbofloxacina es van determinar en mostres de llet i ou amb detecció fluorescent aplicant el següent programa als temps i longituds d'ona d'excitació/emissió indicats: 0–9.30 min, 260/366 nm per a flumequina, i 9.30–20 min: 280/450 nm per a danofloxacina, difloxacina i marbofloxacina.

A més dels paràmetres de validació especificats anteriorment en les mostres fisiològiques, en el cas de les fluoroquinolones en aliments es van determinar el límit de decisió (CC_{α}), i la capacitat de detecció (CC_{β}).

En l'estudi de la robustesa es van seleccionar cinc factors per examinar la variació que produïen sobre la retenció dels compostos: a) SDS (M), b) butanol (%), c) pH, d) flux, i e) TEA (%), observant que la majoria d'ells romanen suficientment inalterats per les xicotetes variacions d'aquests paràmetres (RSD < 6%), tret del flux i la variació de la concentració d'SDS que tenen una major influència en la retenció dels compostos estudiats (RSD < 10%). Les mateixes conclusions es van obtenir en la resta de mètodes desenvolupats en esta Memòria.

El mètode es va aplicar a la determinació de les quatre quinolones en mostres addicionades de llet i ou on es van obtenir amb unes recuperacions satisfactòries per a tots els compostos (94.3–113.7%). D'altra banda no es van trobar proves de la presència de residus de les quinolones en cap de les mostres reals analitzades.

Finalment, es va analitzar àcid oxolínic, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, i sarafloxacina en mostres de peix (daurada, gambes, llobarro, músclo, rêmol, salmó, i truita) utilitzant un programa de detecció per fluorescència semblant al descrit anteriorment. En aquest cas el tractament de la mostra va consistir en la seua homogeneïtzació, extracció i filtració prèvia a la injecció en el sistema cromatogràfic. L'avantatge respecte als procediments habituals d'extracció és que en aquest cas no es va utilitzar cap dissolvent orgànic. De forma breu, en primer lloc les mostres van ser mòltes finament amb una picadora. A continuació, es va pesar una quantitat determinada que es va homogeneïtzar i mesclar amb una dissolució 0.05 M SDS–pH 3, i després es va agitar durant 1 h. Finalment, el sobrenadant es va filtrar i injectar en el sistema cromatogràfic. El mètode va ser exacte i precís com indiquen els valors de l'error relatiu i desviació estàndard relativa, els quals són inferiors al 7.4% i 6.4%, respectivament. Les quinolones es van addicionar a les mostres de peix obtenint recuperacions en el interval 87–110%. De la mateixa forma que ocorria en les mostres de llet i ou, l'anàlisi de mostres de peix sense addicionar amb els antibiòtics no van revelar la presència de cap quinolona.

Els resultats d'aquesta secció indiquen que els mètodes cromatogràfics proposats poden aplicar-se a un programa de control de residus de les fluoroquinolones.

C5. Anàlisi d'omeprazole i els seus principals metabòlits en fluids fisiològics

L'omeprazole pertany al grup dels inhibidors d'alta eficàcia contra l'acció dels àcids que produeixen gastritis o acidesa estomacal, és a dir, és un inhibidor de la bomba de protons gàstrica. També es utilitza en la triple teràpia combinat amb els antibiòtics claritromicina i amoxicil·lina (o metronidazole en pacients hipersensibles a la penicil·lina) per a l'eradicació de la bactèria *Helicobacter pylori* de l'estómac.

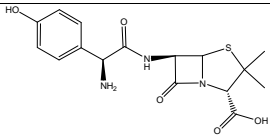
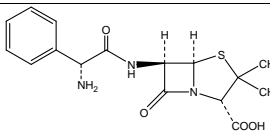
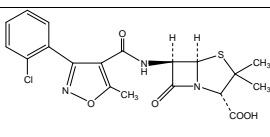
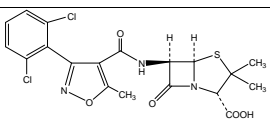
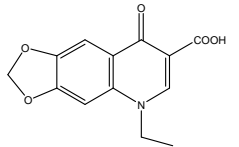
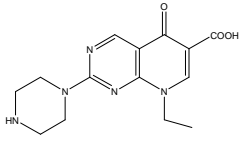
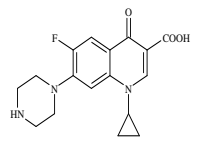
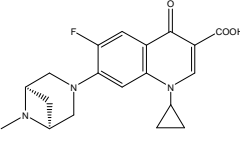
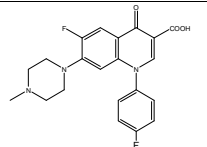
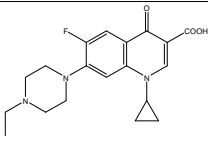
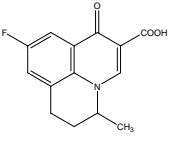
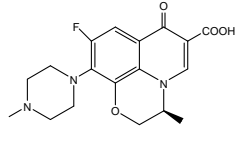
L'omeprazole i els seus metabòlits (omeprazole sulfona i 5-hidroxiomeprazole) es van determinar en orina (factor dilució 1:10) i sèrum sanguini (factor de dilució 1:5). La fase mòbil utilitzada per a la seua separació va ser 0.08 M SDS–10% propanol–0.01 NaH₂PO₄–pH 7, amb detecció en la regió ultraviolada. L'elecció del pH queda justificada ja que en medi àcid té lloc la descomposició de l'omeprazole. Així, les dissolucions dels compostos estudiats es van preparar en medi micel·lar a pH 9 i es van conservar a 4 °C fins ser analitzades. Després de 48 h de la seua preparació, l'omeprazole es va descomposar un 29%, i els seus dos metabòlits un 1%.

La guia de validació utilitzada en aquest cas va ser l'FDA, i els paràmetres avaluats: selectivitat, linealitat (10–2000 ng/mL), límits de detecció (1.8–5.8 ng/mL) i quantificació (10–25 ng/mL), precisió (0.1–8.0%) i exactitud (0.05–2.8%), recuperació (97.6–101.9%), i robustesa (RSD < 11.5%). Els resultats van ser molt semblants per a ambdues matrius.

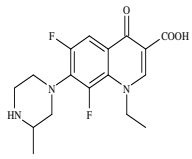
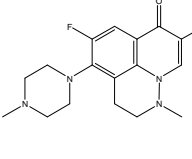
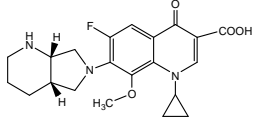
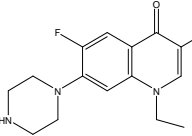
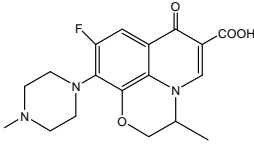
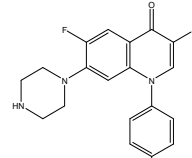
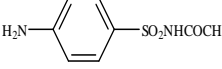
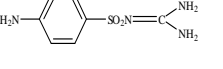
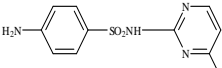
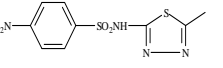
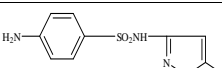
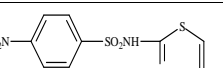
Es va realitzar un estudi farmacocinètic en orina fins 12 h després de la seua administració, on es van observar els tres compostos, mentre que en sèrum es van fer només dos anàlisis (2 i 6 h). El mètode també es va aplicar per a l'anàlisi d'omeprazole en medicaments amb uns valors trobats al voltant del 99.9% del contingut declarat pels fabricants, i una precisió en l'interval de 1.0–1.6%.

En conclusió, el procediment és prou sensible per a la realització d'anàlisis rutinàries del compost tant en matrius biològiques com en preparacions farmacèutiques.

Taula C1. Estructures, coeficient de repartiment octanol-aigua ($\log P_{o/w}$) i constants de dissociació (pK_a) dels antibiòtics estudiats en la present Memòria.

<i>Penicil·lines^a</i>					
	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	0.87	2.4 7.4 9.6		1.06	2.5 7.3
Amoxicil·lina			Ampicil·lina		
	2.5	2.7		2.91	2.76
Cloxacil·lina			Dicloxacil·lina		
<i>Quinolones i fluoroquinolones^{a,b}</i>					
	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	0.2	6.90		0.18	5.5
Àcid oxolínic			Àcid pipemídic		
	0.28	6 8.8		2.42	6.32 8.73
Ciprofloxacina			Danofloxacina		
	2.72	6.49 7.74		1.63	6.00 8.50
Difloxacina			Enrofloxacina		
	1.20	6.65		1.26	6.05 8.22
Flumequina			Levofloxacina		

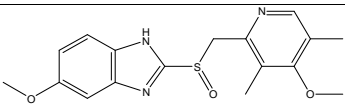
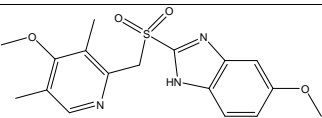
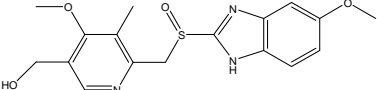
Taula C1 (continuació)

	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	1.11	6.56 8.47		0.83	5.51 8.38
Lomefloxacin			Marbofloxacin		
	2.04	6.4 9.5		1.64	6.3 8.8
Moxifloxacin			Norfloxacin		
	0.92	5.74 7.9		3.01	6.49 8.54
Ofloxacin			Sarafloxacin		
Sulfamides^c					
	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	-0.19	1.82 5.85		-1.09	2.46 11.15
Sulfacetamida			Sulfaguanidina		
	0.11	2.16 6.80		0.47	2.24 5.30
Sulfamerazina			Sulfametizole		
	0.85	1.81 5.46		-0.04	2.06 7.07
Sulfametoxazole			Sulfatiazole		

^a Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, 2004; J. Chromatogr. B 705 (1998) 63; Comprehensive Medicinal Chemistry, vol. 6 (1990). Oxford: Pergamon Press.

^b J. Chromatogr. A 945 (2002) 1; Tuberculosis 88 (2008) 119; Tuberculosis 88 (2008) 127; Trends Anal. Chem. 26 (2007) 1043; Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 4806; Science of the Total Environmen. 407 (2009) 2760; Pharmaceutical Research, Vol 19, No. 12, 2002; AHFS Americal Hospital Formulary Service 1998.

Taula C2. Estructures, coeficient de repartiment octanol-aigua ($\log P_{o/w}$) i constants de dissociació (pK_a) de l'omeprazole i els seus metabòlits.

	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
 <p>Omeprazole</p>	2.23	4.2 9.0	 <p>Omeprazole sulfona</p>	2.06	
 <p>5-Hidroxiomeprazole</p>	1.17				

Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, 2004; ALOGPS 2.1 program (J. Chem. Inf. Comp. Sci. 41 (2001) 1488).

Taula C3. Resum de les característiques dels mètodes desenvolupats en la present Memòria

Compost	Condicions cromatogràfiques	Temps d'anàlisi (min)	Tipus de detecció (nm)	LOQ	Precisió intra i interdia (%)	Tipus de mostra
Amoxicil·lina	Hypersil Phenyl (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) 0.10 M SDS-4% butanol-pH 3	6	UV: 210	0.34 µg/mL	0.13-6	Orina Medicaments
Amoxicil·lina, ampicil·lina, cloxacil·lina, i dicloxacil·lina	Zorbax C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) 0.11 M SDS- 6% propanol-pH 3	16	UV: 210	50 ng/mL	0.1-5.9	Orina Medicaments
Ciprofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, ofloxacina, i moxifloxacina	C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) a) 0.15 M SDS- 12.5% propanol- 0.5% TEA-pH 3 b) 0.05 M SDS- 12.5% propanol- 0.5% TEA-pH 3	a) 10 b) 22	a) FLD: $\lambda_{em} = 285$ $\lambda_{ex} = 485$ b) FLD: $\lambda_{em} = 295$ $\lambda_{ex} = 485$	1 ng/mL	0.11-8.4	Orina
Àcid pipemídic, levofloxacina, morfloxacina, i moxifloxacina	C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) 0.15 M SDS- 2.5% propanol- 0.5% TEA-pH 3	12	UV: 276	28-171 ng/mL	0.2-3.5	Medicaments

Taula C3 (continuació)

Compost	Condicions cromatogràfiques	Temps d'anàlisi (min)	Tipus de detecció (nm)	LOQ	Precisió intra i interdia (%)	Tipus de mostra
Sulfacetamida, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizol, sulfametoxazol, i sulfatiazol	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.08 M SDS-8.5% propanol-pH 7	16	UV: 490	2.4-3.1 ng/mL	0.3-3.7	Llet
Danofloxacina, difloxacina, flumequina, i marbofloxacina	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.05 M SDS-10% butanol-0.5% TEA-pH 3	15	FLD: 0-9,30 min $\lambda_{\text{em}} = 260$ $\lambda_{\text{ex}} = 366$ 9,30-20 min $\lambda_{\text{em}} = 280$ $\lambda_{\text{ex}} = 450$	30-100 µg/kg	0.6-8.4	Llet Ou
Àcid oxolínic, flumequina, enrofloxacina, difloxacina, i sarafloxacina	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.065 M SDS-12.5% propanol- 0.5% TEA-pH 3	18	FLD: 0-10 min $\lambda_{\text{em}} = 260$ $\lambda_{\text{ex}} = 366$ 10-20 min $\lambda_{\text{em}} = 280$ $\lambda_{\text{ex}} = 450$	5-30 µg/kg	1.0-7.8	Peix
Omeprazole, omeprazole-sulfona, i hidroximeprazole	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.08 M SDS-10% propanol-pH 7	11	UV: 305	10-25 ng/mL	0.14-7.9	Medicaments Orina Sèrum sanguini

EUROPEAN DOCTORATE MENTION

“Doctor Europeus”

Determination of antibiotics by micellar liquid chromatography in physiological and food samples

REQUIREMENTS

1. The mention “Doctor Europeus” can be included on the reverse of the doctoral degree diploma if the following conditions have been met:
 - (a) The candidate, during the official postgraduate programme, must take courses or undertake research recognised by the institution responsible for the official postgraduate programme for at least three months in an institution of higher education of another European country.
 - (b) Part of the doctoral thesis, at least the summary and the conclusions, must be written and defended in an official language of a European country, other than the official languages in Spain.
 - (c) The doctoral thesis must have been informed by a minimum of two experts belonging to higher education institutions or research institutes of European Union countries other than Spain.
 - (d) At least one expert, holding a doctoral degree, different to the two mentioned in (c) and belonging to a higher education institution or research institute of a European Union country other than Spain must be a member of the Board of Examiners.
2. The defence of the thesis must be made at the Spanish university where the candidate is enrolled.

Objectives and development of the research work

The work here described is part of a line of research developed by the group *Bioanalytical Chemistry*, in the Department of Physical and Analytical Chemistry at the Universitat Jaume I (Castellón, Spain), with code 029 of *The Office of Communications & Information Technology* (OCIT). This line aims to develop analytical methods in the clinical chemistry and forensic fields making use of micellar liquid chromatography (MLC), and capillary electrophoresis techniques. It has been funded through various national (Spanish Ministry of Education and Science), regional (Valencian Government) and university (Fundació Caixa Castelló-Bancaixa) research projects. The study reported here has received funding from the Fundació Caixa de Castelló-Bancaixa and the Universitat Jaume I, project P1-1B2006-12: *Interpretive optimisation for the separation and determination of antibiotics by micellar liquid chromatography with direct injection of the samples. Use of selective detectors, gradient techniques and column switching.*

MLC is an efficient alternative to conventional reversed-phase liquid chromatography (RPLC) with hydro-organic mobile phases. One of its main characteristics is its great versatility given the variety of interactions among solutes, the aqueous phase, micelles and the stationary phase. Its eluent characteristics also allow the analysis of solutes in a wide range of polarities, from a single injection to isocratic elution. Since retention in MLC is highly reproducible, it can be modelled with great accuracy to predict changes in the retention of compounds by varying the mobile phase composition. This facilitates the optimisation of the separation conditions. It should be noted that the organic solvent concentration is much lower than that used in conventional RPLC. For this reason, the mobile phases in MLC are less toxic, non-flammable with a lower cost and of less environmental impact.

Moreover, MLC provides a simple solution for the problem of directly injecting physiological fluids or food samples. It is one of its main advantages since it simplifies and expedites the analytical procedures.

MLC was first proposed by Armstrong in 1981. Since then, several articles have been published that address developing the technique and acquiring knowledge of its retention mechanisms. These fundamental studies are essential to improve the capabilities of separation systems and to establish the basis for developing analytical methods of compounds of different natures. Based on these studies, the main objective of the current work is the development and validation of procedures for the separation and determination of different families of antibiotics in various matrices (urine, pharmaceuticals and food) by MLC. The antibiotic groups considered are penicillins, quinolones and sulphonamides.

A new developed method must be validated according to well-defined criteria so that the data obtained are reliable. This is another objective of this Thesis. Most of the methods developed herein have been validated by taking into account the following performance parameters: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy, precision, recovery and robustness. For this purpose, three different validation guidelines have been used depending on the matrix studied: the regulations of the *Food and Drug Administration (FDA)*, the standards of the *International Conference on Harmonization (ICH)*, and the rules of the *Commission Decision 2002/657/EC*.

Antibiotics, or antibacterial agents, are chemicals of a low molecular weight, synthetic or produced by microorganisms that, in small concentrations, are capable of inhibiting growth and of even killing certain microorganisms. Their main applications are in human and veterinary medicine, and agriculture. In humans, they are used in the treatment of urinary tract, respiratory and other systemic-type infections. Their use in the treatment of diseases in livestock for human consumption and as additives in factory farms have resulted in necessarily considering their potential presence in foods of animal origin. Antibiotic residues in foods of animal origin may cause allergic reactions in hypersensitive individuals; in particular, the administration of low levels of antibiotics can lead to resistant bacteria, which can reach humans through foods. Besides these immediate effects, there are also long-term effects which are still unknown. For all these

reasons, the development and validation of analytical methods for the determination of these compounds are clearly justified.

The group of antibiotics includes compounds of very different structures, many of which are of great pharmacological interest. Therefore, a large number of articles have been published in the literature, in which several analytical procedures using various techniques have been described, of which the most widely used are conventional RPLC. The availability of new tools to improve the procedures developed by our research group, and the interest of investigating new generation antibiotics, led to the proposal of a new Thesis on the determination of these drugs, which began in April 2007, and is presented below.

The research work herein included has implied considerable experimental development, especially in the validation step, as well as extensive data processing. The huge effort made in the literature survey of the different topics should be highlighted as it has implied searching, reading and organising a very large amount of valuable information. In addition, the PhD period (April 2007–April 2011) has included a stay in the laboratory at the Organic Chemistry Department in Ghent University (Belgium), under the supervision of Professor Patrick Sandra. This stay has addressed the measurement of antioxidant activity in natural products by an on-line HPLC system.

This Thesis includes ten chapters, the first two being introductory in nature. Its title, *Determination of antibiotics by micellar liquid chromatography in physiological and food samples*, refers to the central issue addressed, as outlined in seven chapters, divided into two parts. The first includes the analysis of antibiotics in body fluids and pharmaceuticals, whereas the determination of these drugs in food samples is carried out in the second. However, another closely related chapter has been included in the third part. In this last chapter, a method for the analysis of a stomach protector and its metabolites, which are commonly administered with antibiotics, was developed. In most cases, the chapters are translations of published articles (Chapters 3 to 10). The report concludes with an analysis of the results obtained and the articles published.

It should be indicated that owing to the official time schedule, the described work has been finished several months before the PhD thesis. Therefore, it was not possible to include some research work for which an article draft is still being prepared, or for which extensive experimental work has been done. Next, the complete list of research topics relating to the Thesis and carried out during the PhD period is indicated.

Scientific communications

31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC 2007, Ghent (Belgium), June 2007.

1. J.S. Esteve-Romero, M.A. Raviolo, M. Rambla-Alegre, J. Clausell-Tormos, M.E. Capella-Peiró, S. Carda-Broch, “*Determination of sulphonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography*”

32nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques. HPLC 2008, Baltimore (USA), May 2008.

2. M. Rambla-Alegre, M-L. Chin-Chen, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Development of a direct and validated method of amoxicillin detection in physiological fluids using micellar liquid chromatography*”
3. J. Esteve-Romero, M. Rambla-Alegre, S. Carda-Broch, “*Column selection in micellar liquid chromatography determination of antibiotics*”

34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June–July 2009.

4. M. Rambla-Alegre, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Cluster analysis for column classification and selection for the determination of norfloxacin and amoxicillin by micellar liquid chromatography*”

5. M. Rambla-Alegre, M.L. Chin-Chen, M.A. Collado-Sánchez, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Simultaneous separation and determination of quinolones in urine by micellar liquid chromatography*”
6. M. Rambla-Alegre, M.L. Chin-Chen, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases*”

35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC 2010, Boston (USA), June 2010.

7. M. Rambla-Alegre, M.A. Collado-Sánchez, R. Martí-Centelles, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Simultaneous determination of quinolones in milk and eggs by micellar liquid chromatography with fluorescence detection*”
8. M. Rambla-Alegre, J. Peris-Vicente, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography and validated in accordance with regulation 2002/657/EC*”

Maria Rambla-Alegre was rewarded with a Student Travel Award to attend this symposium, granted by HPLC, Inc. Only two awards were granted to European students.

28th International Symposium on Chromatography, ISC 2010, Valencia (Spain), September 2010.

9. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Development and validation of micellar liquid chromatographic methods for the determination of antibiotics in different matrices*”

10. M. Rambla-Alegre, M.A. Collado-Sánchez, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Micellar liquid chromatography determination of quinolones in food samples with fluorescence detection*”
11. M. Rambla-Alegre, J. Peris-Vicente, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Validation of a liquid chromatographic procedure for the determination of five quinolones in fish according with regulation 2002/657/EC*”

Articles

1. M.A. Raviolo, M. Rambla-Alegre, J. Clausell-Tormos, M.E. Capella-Peiró, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography*”
Analytica Chimica Acta 593 (2007) 152–156
2. M. Rambla-Alegre, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Development of a direct and validated method of amoxicillin in physiological fluids using micellar liquid chromatography*”
Journal of Separation Science 31 (2008) 2813–2819
3. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases*”
Analytica Chimica Acta 633 (2009) 250–256
4. M. Rambla-Alegre, S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero, “*Column classification and selection for the determination of antibiotics by micellar liquid chromatography*”
Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 32 (2009) 1127–1140

5. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection*”
Journal of Chromatography B 877 (2009) 3975–3981
6. M.A. Collado-Sánchez, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Rambla-Alegre, “*Simultaneous separation and determination of quinolones in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography*”
Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 33 (2010) 513–525
7. M. Rambla-Alegre, J. Peris-Vicente, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC*”
Food Chemistry 123 (2010) 1294–1302
8. J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Rambla-Alegre, “*Micellar liquid chromatography in bioanalytical chemistry*”
Contributions to Science 6 (2010) 105–119
9. M. Rambla-Alegre, M.A. Collado-Sánchez, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Quinolones control in milk and eggs samples by liquid chromatography using a surfactant-mediated mobile phase*”
Analytical and Bioanalytical Chemistry (in press, doi: 10.1007/s00216-010-4409-x)
10. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in pharmaceutical formulations and biological fluids using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection*”
Journal of Chromatography A (in press, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.015)

11. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Development and validation of micellar liquid chromatographic methods for the determination of antibiotics in different matrices*”
Accepted in the Journal of AOAC International in November 2010
12. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Micellar liquid chromatography in the determination of antibiotics: an overview*”
Submitted for publication
13. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, “*Development, optimization and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of several fluoroquinolones in meat samples*”
Experimental work
14. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, D. Bose, S. Carda-Broch, “*Quantitative determination of penicillin antibiotics in food samples by micellar liquid chromatography*”
Experimental work
15. M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, D. Bose, “*Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis*”
Experimental work

SUMMARY

Chapter 1

Basic principles of micellar liquid chromatography

Micellar liquid chromatography (MLC) is a reversed-phase liquid chromatographic (RPLC) mode with a mobile phase consisting in an aqueous solution of surfactant above its critical micellar concentration (CMC). The idea of using pure micellar solutions as mobile phases in RPLC is very attractive given their lower cost, less toxicity and poorer environmental impact. In practice, however, the addition of a small amount of organic solvent to the micellar solution is needed to achieve retention in practical time windows, and to improve peak efficiency and resolution.

Micellar mobile phases have been used with different bonded stationary phases (mostly C8, C18 and cyanopropyl). The most common surfactants are anionic sodium dodecyl sulphate (SDS), cationic cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and non-ionic Brij-35. Several organic solvents have been used as modifiers, of which short/medium chain alcohols and acetonitrile are the most suitable. The presence of micelles helps keep these organic solvents in solution at concentrations well above their solubility in water, and the risk of evaporation diminishes.

Above the CMC, a change in surfactant concentration leads to an increased concentration of micelles in the solution, whereas the number of monomers of the surfactant in the mobile phase remains constant. Adsorption of an approximately fixed amount of surfactant monomers in the stationary phase is also produced, giving rise to a stable modified column and to regular retention behaviour.

The retention mechanisms (e.g., solute-mobile phase and solute-stationary phase interactions) in MLC are fairly well understood, and there is a reasonable theoretical

foundation on which to build. MLC is a fascinating example of the benefits of secondary equilibria in RPLC. The primary equilibrium is solute partitioning between bulk solvent (e.g., water or the aqueous-organic mixture) and the stationary phase. A secondary equilibrium is established with the micelles in the mobile phase. Both equilibria are affected by a variety of factors, such as the type and concentration of surfactant and additives (e.g., salts or organic modifiers), temperature, ionic strength and pH. The complexity of MLC is much greater than that of conventional RPLC with aqueous-organic mixtures.

MLC shares the basic components of RPLC systems, that is, a non-polar stationary phase and a polar aqueous mobile phase. However, hydro-organic mobile phases in conventional RPLC are homogeneous, whereas micellar solutions are microscopically heterogeneous, and composed of two distinct media: amphiphilic micellar aggregates (micellar pseudophase), and the surrounding bulk water or aqueous-organic solvent that contains surfactant monomers in an approximate concentration equal to the CMC.

Retention behaviour in MLC depends on the interactions established by the solute with the surfactant-modified stationary phase and micelles. Neutral solutes eluted with non-ionic and ionic surfactants, and charged solutes eluted with non-ionic surfactants, will only be affected by non-polar, dipole–dipole and proton donor–acceptor interactions. Besides these interactions, charged solutes will interact electrostatically with ionic surfactants (e.g., with the charged surfactant layer in the stationary phase and the charged outer layer of micelles). In any case, the steric factor can also be important.

The separation process in a micellar chromatographic system requires a structured approach in the development of practical applications. Ideally, the resolution of complex mixtures should be made and optimised in a short time, with a minimal consumption of reagents. Empirical and mechanistic models have been developed to model the retention behaviour of solutes.

Fundamental studies in MLC have focused mainly on surfactant adsorption, retention behaviour, measurement of partition coefficients, peak efficiency and selectivity. Most of these studies were carried out in the 90s, and some provide evidence of retention mechanisms. This knowledge has allowed a theoretical description of MLC, and a better understanding and use of the technique. Applications have greatly benefited from these research works.

Chapter 2

Validation protocols for analytical methods

Reliable analytical methods are required for compliance with national and international regulations in all areas of the analysis. Accordingly, it is internationally recognised that a laboratory must take appropriate measures to ensure that it is capable of providing, and does provide, data of the required quality.

Thus, method validation is an important requirement in the chemical analysis practice. However, awareness of its importance, why and when it should be done, and exactly what needs to be done, seem poor amongst analytical chemists. The literature provides much advice about method validation, especially in relation to particular methods, but more often than not, it is underused. Some analysts see method validation as something that can be done only by collaborating with other laboratories; therefore they do not go about it. In addition, analysts' understanding of method validation is inhibited by the fact that many of the technical terms used in the processes for evaluating methods vary in different sectors of analytical measurement, both in terms of their meaning and the way they are determined.

Method validation can be defined as the process of establishing the performance characteristics and limitations of a method, and of identifying the influences that may change these characteristics and to what extent. Method validation is, therefore, an essential component of the measures that a laboratory should establish to be able to produce reliable analytical data. In general, validation should check that the method performs adequately for the purpose through the whole range of analyte concentrations to which it is applied. It therefore follows that these features, together with a statement of any fitness-for-purpose criteria, should be completely specified before any validation takes place. It is essential that validation studies are representative; that is, studies should, as far as possible, be conducted to provide a realistic survey of the number and range of effects operating during the normal use of the method, and to cover the concentration ranges and sample types within the method's scope. Several performance

parameters should be studied, including specificity (the ability to measure a desired analyte in a complex mixture), accuracy (an agreement between the measured and the real value), linearity (the proportionality of the measured value to the concentration), precision (an agreement between series of measurements), range (a concentration interval where the method is precise, accurate and linear), detection limit (the lowest amount of analyte to be detected), limit of quantification (the lowest amount of analyte that can be measured), and robustness (reproducibility under normal but variable laboratory conditions).

Transferring analytical methods from one group to another becomes an important step in ensuring that proper validation is in place to justify its intended use. As several groups will run the method while its progresses from development to validation, it must be robust. This means that the method should provide reliable data, not only in a wide range of equipment, but also in the hands of several chemists. A common weakness in the development and validation of methods is that they are not robust enough. If robustness is not built into methods early on development, then the most likely result will be lack of efficiency during routine analyses and a lengthy, complicated validation process. Another challenge encountered early on the development of methods intended to support stability studies is to ensure that the method indicates stability.

Here are some recommendations for the use of a single-laboratory method validation:

- Wherever possible and practical, a laboratory should use an analysis method whose performance characteristics have been evaluated through a collaborative trial that conforms to an international protocol.
- When such methods are not available, an in-house method must be validated before being used to generate analytical data.
- Single-laboratory validation requires the laboratory to select appropriate characteristics for evaluation (e.g., selectivity, calibration, accuracy, etc.).
- Evidence that these characteristics have been assessed must be made available.

Part I. Analysis of antibiotics in physiological and pharmaceutical formulations

Chapter 3

Development and validation of an analytical method for the determination of amoxicillin by micellar liquid chromatography

Amoxicillin is an aminopenicillin with a broad spectrum which is currently the most commonly used antibiotic. It is used orally to treat lower respiratory tract infections, otitis media, sinusitis, skin and skin structure infections, and urinary tract infections.

Several analytical methods have been developed for the analysis of amoxicillin in physiological fluids. Most refer to the use of high-performance liquid chromatography with conventional aqueous-organic mobile phases. However, the determination of drugs in these matrices with direct injection presents many problems. Drugs are often strongly bound to proteins in a complex matrix where interference from numerous endogenous compounds is expected. This technique usually requires elaborate sample pretreatment owing to the tendency of proteins to denature and precipitate in the injection valve or inside the column, thus obstructing or clogging the system. Micellar liquid chromatography (MLC) allows the analysis of complex matrices without the aid of extraction. Micelles tend to bind proteins competitively, therefore releasing protein-bound drugs and proteins; rather than precipitating into the column, they are solubilised and washed harmlessly away to elute with the solvent front. Another advantage of using micellar mobile phases is that they are non-toxic, non-flammable, biodegradable and relatively inexpensive in comparison with aqueous-organic solvents.

A simple and robust method has been developed for the routine identification and quantification of amoxicillin by MLC. Three stationary phases were studied: amino, C18

and phenyl, of which the phenyl column is the most appropriate because of its highest efficiencies and adequate retention times without amoxicillin overlapping other urine peaks.

Separation was performed in a reversed-phase phenyl column using UV detection and a mobile phase of 0.10 M sodium dodecyl sulphate–4% butanol–0.01 M NaH₂PO₄ at pH 3 in which the antibiotic eluted at 5.1 min with no interference by the protein band or endogenous compounds. Method validation was performed following the Food and Drug Administration guide. The parameters evaluated were: selectivity, linearity ($R^2 > 0.9998$), limits of detection and quantification (0.14 and 0.34 µg/mL, respectively), precision and accuracy, robustness, and drug stability. Recoveries in the spiked urine samples were in the 95–110% range. It should be pointed out that amoxicillin undergoes decomposition and should be kept at a low temperature (4 °C) until analysed.

Finally, the method was successfully applied for the determination of amoxicillin in pharmaceuticals and urine samples with satisfactory results. Urinary excretion studies were also conducted following the oral administration of a single dose of a conventional tablet containing 875 mg of amoxicillin to volunteers. Urine samples were taken nine times a day, approximately every 1 h, and the volume was measured. Urine samples were diluted to 1:100, and the solution was injected directly into the chromatographic system with no further treatment, except filtration. The final quantity of amoxicillin eliminated after 8.5 hours was 517 mg, that is, 59% of the dose taken. These results show that pharmacokinetic studies can be performed under the proposed chromatographic conditions.

Chapter 4

Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection

Penicillins are β -lactam antibiotics, which have been the most widely used antimicrobial drugs for more than 80 years and are still considered one of the most important groups of antibiotics. They are used to treat respiratory tract infections that often result from encroachment of sensitive bacteria. They are clinically used against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The penicillins included in this study are amoxicillin, ampicillin, cloxacillin and dicloxacillin.

The purpose of this study was to develop and validate a new MLC method for the simple, rapid and specific determination and quantification of four penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids.

It should be taking into account that the stability of penicillins greatly depends on pH, and that their maximum stability is in the region of pH 6.0–7.0. Thus, the pH of the selected mobile phase should be in this range. However, the retention factor of the four studied compounds lowered when the pH of the mobile phase increased, and it eluted at the dead volume at pH 7 because of the repulsion between the negatively charged antibiotics and the surfactant (sodium dodecyl sulphate). Thus, pH 3 was finally selected as it provided the best resolution and adequate retention times for all four compounds. However given the instability of penicillins under acidic conditions, they should be analysed almost immediately after preparation or stored at -20°C until used.

An interpretive optimisation strategy based on the accurate description of the retention and shape of the chromatographic peaks was followed to select the most

adequate stationary phase (Hypersil Phenyl, Kromasil or Zorbax C18 columns), and the best concentration of the surfactant and organic solvent for the simultaneous analysis of the four penicillins. Since Zorbax columns provide better robustness (the major region where compounds can be fully resolved at the baseline level), they were selected for the determination of penicillins. Antibiotics were eluted in less than 16 min with no interference by the urine protein band or endogenous compounds using the mobile phase 0.11 M SDS–6% propanol–0.01 M NaH₂PO₄ buffered at pH 3.

The method was validated according to Food and Drug Administration guideline. The robustness study was done by making slight changes to the following parameters: SDS concentration, propanol (%), flow rate, and pH. The slight variation observed in these parameters does not significantly alter the retention factor or the peak area of the compounds studied.

Finally, the method was successfully applied to the determination of these antibiotics in pharmaceutical formulations (the label claim percentages obtained were around 100%) and urine samples. Pharmacokinetic studies of urine samples were conducted to demonstrate its usefulness. The urinary excretion results were in agreement with the bibliographical reports.

Chapter 5

Validation of an MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection

Quinolones and fluoroquinolones are synthetic antibiotics whose action is based on their anti-DNA activity. Since nalidixic acid was discovered, a number of structure modifications to the quinolone nucleus were performed to increase antimicrobial activity and to enhance the pharmacokinetic performance of these drugs. The general structure consists in a 1-substituted-1,4-oxopyridine-3-carboxylic moiety combined with either an aromatic or a heteroaromatic ring. Fluoroquinolones are quinolones with a fluorine atom at position 6 of the quinolone naphthyridine or benzoaxazine ring systems, and they belong to the second generation of quinolones. They are characterised by their greater effectiveness against bacterial activity, and are used in both human and veterinary medicine. In humans, they are used to treat an extensive range of diseases, including urinary, respiratory, and gastrointestinal tract infections.

High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ionisation mass spectrometry has been reported for the analysis of quinolones in urine and food samples. It is normally a fast technique, but requires complicated and expensive equipment, and a labour-intensive sample preparation procedure. Capillary electrophoresis methods have been recently developed for quinolones in biological and environmental samples.

MLC is an attractive alternative to conventional HPLC methods using aqueous-organic mobile phases for the determination of drugs in physiological fluids with direct injection. A rapid, sensitive and selective reversed-phase HPLC procedure with micellar mobile phases was developed and validated for the determination of five fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, moxifloxacin, and ofloxacin) in urine samples using direct injection and fluorescence detection.

An optimisation protocol was followed to select the best chromatographic conditions with the experimental design used for the drugs which included five mobile phases: four located at the corners of a rectangular factor space and the fifth in its centre. The second step involved fitting the retention data to an adequate model. Since the simultaneous elution of the five compounds was not resolved, two mobile phases have been proposed: (a) 0.15 M sodium dodecyl sulphate–12.5% propanol–0.5% triethylamine at pH 3.0 and the detector at excitation wavelength 285 nm and emission wavelength 465 nm, for ciprofloxacin and levofloxacin; and (b) 0.05 M sodium dodecyl sulphate–12.5% propanol–0.5% triethylamine at pH 3.0 and the detector at excitation wavelength 295 nm and emission wavelength 485 nm, for lomefloxacin, moxifloxacin, and ofloxacin.

The method has been validated according to the Food and Drug Administration guideline in terms of selectivity, linearity (1–1000 ng/mL, $R^2 > 0.99996$), limits of detection (lower than 0.7 ng/mL) and quantification (1 ng/mL), precision (RSD, 0.06–6.0%), and accuracy (Er, 0.0–2.4%), recovery (96–103%), and robustness.

Detection of the urinary excretion of four quinolones was followed up at 12 h after the healthy volunteers had taken the drug. The results indicate that this method is sensitive enough to undertake the quality control routine analyses and pharmacokinetic studies of the drugs, bearing in mind that the urine samples were injected without any previous treatment.

Chapter 6

Simultaneous separation and determination of quinolones in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography

Quinolones are among the most important antibacterial agents used in human medicine. They are active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria through the inhibition of their DNA gyrase, are mainly used in the treatment of human and veterinary diseases, and are also very useful in preventing diseases in animals. There is concern about the possibility of exposure to low levels of these compounds resulting in the development of resistance to antibiotics of human pathogens.

HPLC has become an important tool for the analysis of single and various combinations of quinolones in biological fluids, foods, environmental samples, and pharmaceutical preparations where either UV or fluorescence is used as the detection method. State-of-the-art LC-MS/MS equipment has also been used, although this equipment is very expensive and only a few laboratories can afford it.

MLC methods offer the advantages of directly injecting samples with no pretreatment other than filtration and the low toxicity of the mobile phases employed. A simple chromatographic procedure with micellar mobile phases of sodium dodecyl sulphate for the simultaneous determination of four quinolones (levofloxacin, norfloxacin, moxifloxacin, and piperidic acid) was developed and applied to control numerous pharmaceuticals in several dosage forms, and was validated according to the *International Conference on Harmonisation* (ICH) harmonized guideline. Good claim percentages (96–106%) were obtained in the analysis of pharmaceutical formulations. Although these compounds are not administered together, the proposed method allowed the determination and quantification of the four quinolones in a single chromatographic run without modifications being made to each compound separately, thus making the proposed method more economical and faster.

Part II. Analysis of antibiotics in food

Chapter 7

Determination of sulphonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography

Sulphonamides are widely used to prevent and control a number of veterinary diseases, such as gastrointestinal and respiratory infections, and for growth-promoting purposes and as a prophylactic. When inappropriate abusive antibiotic-based treatments are applied to treat livestock diseases, undesirable residues can remain in animal tissues and biofluids, including milk. These residues are a huge public health concern given the risk of developing drug resistance, which leads to this medicine becoming inefficient for therapeutic use. Consequently to prevent health problems, the European Community has adopted a maximum sulphonamide residue level of 100 µg/kg in edible animal tissue, including milk.

Sulphonamides are arylamines that contain a primary aromatic amine. For this reason, they can be derivatised and quantified in the visible band by the formation of azo dyes using the diazotisation-coupling reaction with the Bratton-Marshall reagent [*N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride or NED]. The use of a micellar medium of sodium dodecyl sulphate (SDS) offers some advantages, for instance, it requires no changes in pH, lowers reaction times and enhances the molar absorption of azo dyes.

A liquid chromatographic procedure to identify and determine six sulphonamides (sulphacetamide, sulphaguanidine, sulphamerazine, sulphamethizole, sulphamethoxazole, and sulphathiazole) in milk by MLC was developed. The assay makes use of a precolumn diazotisation-coupling derivatisation, including the formation of an azo dye that can be detected at 490 nm, thus avoiding interferences by the protein and matrix compounds that absorb in the UV region. In this way, this method increases selectiveness in biological matrices.

Chromatographic separation was performed with a mobile phase of 0.08 M SDS–8.5% propanol buffered at pH 7. Analysis times were below 16 min with complete resolution. This procedure does not require complex procedures such as sample extraction and/or sample cleaning, and large volumes of samples and solvents are not necessary. The method was validated using the ICH harmonised guideline in terms of linearity ($R^2 > 0.9999$), intra- and inter-day precisions (below 2.7%), and limits of detection (0.7–0.9 ng/mL) and quantification (2.4–3.1 ng/mL). The detection limit was below the maximum residue limit established by the European Community. Finally, recoveries in spiked milk samples were in the 83–103% range.

Chapter 8

Quinolones control in milk and eggs samples by liquid chromatography using a surfactant-mediated mobile phase

Veterinary drugs have become an integral part of livestock production and play an important role in animal welfare maintenance, mainly for preventing disease, curing infection, controlling the risk of disease transmission to humans and for increasing the productive capacity of animals. The routine use of veterinary medicines for these purposes may induce the presence of drug residues in animal food products if appropriate withdrawal times are not respected, which can induce pathogen resistance to the antibiotics used in human medicine. Food surveillance programmes intended to enforce legislation on drug residues in animal products rely heavily on the availability of fast, accurate analytical screening methods. To protect consumers from exposure to residue levels that might become a health risk, the European Union has introduced legislation on the authorisation of veterinary drugs and has established maximum residue levels (MRLs) for these drugs in different animal edible tissues. Therefore, there is a continuous need for reliable analytical methods in determining compliance with both national regulations and international requirements in all areas of food quality and safety.

A liquid chromatographic procedure with fluorescence detection was developed for the simultaneous determination in food samples (milk and egg) of four fluoroquinolones: danofloxacin, difloxacin, flumequine and marbofloxacin. Mobile phases comprised a surfactant solution with a concentration above the critical micellar concentration.

The stable and reproducible behaviour of micellar mobile phases allows the accurate prediction of the retention of solutes with a model that can be further used to optimise the separation of mixtures of solutes. In liquid chromatography, interpretive optimisation strategies can prove more efficient and reliable than sequential approaches. These strategies can be assisted by computer simulation, which can mimic the methodology

followed by experienced chromatographers with less time and effort. For this purpose, the position and shape of the chromatographic peaks were considered. The optimum mobile phase for the separation of quinolones was obtained through a complete separation criterion (maximum resolution) in an appropriate analysis time. The prediction capability of the interpretive strategy, which was assessed by comparing the predicted and experimental chromatograms for a mixture of the four quinolones eluted with the optimum mobile phase, was checked and found satisfactory.

The method was validated in order to meet the criteria specified by European Commission Decision 2002/657/EC. Validation provided satisfactory results in terms of sensitivity, linearity, accuracy, decision limit (CC_{α}), detection capability (CC_{β}), detection and quantification limits, recoveries and robustness at the $\mu\text{g}/\text{kg}$ level. Robustness studies were also included.

The results indicate that the proposed procedure is useful in the area of food quality testing and control to determine the content of those quinolones studied in milk and egg samples. Moreover, it allows the simultaneous determination quinolones residues in different milk and egg matrices with high sensitivity. One advantage of this procedure is the possibility of injecting food samples directly into the chromatographic system.

Chapter 9

Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection, and validation in accordance with regulation 2002/657/EC

The main use of quinolones, antibacterial agents, is the treatment of human and veterinary diseases, and they prove most useful in preventing diseases in animals. They are well absorbed after oral administration and distribute extensively in tissues. Such characteristics make these drugs suitable to be used as the therapy for a large number of infections on fish farms. These practices imply that drug residues persist in the edible tissues derived from treated animals, therefore maximum permitted levels have been set for most of them. Accordingly, these residues need to be controlled because there is concern about the possibility of exposure to low levels of these compounds as it may result in the development of resistance to antibiotics of human pathogens.

The state-of-the-art high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) equipment allows a multiresidue determination of quinolones in different matrices. However, this equipment is very expensive and only a few laboratories can afford it. Furthermore, one of the main problems involved in multiresidue antibiotic analyses in real samples is that the procedures required for the extraction, cleanup and preconcentration of matrix analytes before the instrumental analysis are tediousness and complex. The use of a surfactant-mediated mobile phase above its critical micellar concentration allows the analysis of complex matrices, and usually does not require the aid of extraction because micelles tend to bind proteins competitively, therefore releasing protein-bound drugs and proteins, thus cutting costs and analysis times.

A multiresidue HPLC procedure with micellar mobile phases was developed to simultaneously determine five quinolones (difloxacin, enrofloxacin, flumequine,

oxolinic acid and sarafloxacin) in fish muscle samples. Through Council Regulation No. 2377/90, the European Union has established maximum residue limits (MRLs) in samples of animal origin. Therefore, analytical methods are required to check food samples before they become available in markets. The optimisation of sample preparation focused on the extraction of five quinolones from fish muscles without the aid of organic solvents, this making the procedure less toxic and relatively inexpensive.

Most analytical procedures in MLC require the addition of an organic solvent, which also increases peak efficiency. Usually, it is a short-chain alcohol, such as propanol, butanol or pentanol. The selection of alcohol is directly related to the polarity of the compounds under study. The studied quinolones have a moderate hydrophobicity (octanol-water partition coefficients, $\log P_{o/w}$, ranging between 0.7–1.6). Therefore, the use of propanol or butanol was preferred. Butanol affords high efficiencies, but the five quinolones could not be resolved from the protein front elution band. For this reason, propanol was used to carry out the optimisation procedure.

Analytical separation was performed in less than 18 min using a C_{18} column, and a micellar solution of 0.065 M sodium dodecyl sulphate–12.5% propanol–0.5% triethylamine buffered at pH 3 was employed as the mobile phase. A fluorescence detection programme was followed at the following times and excitation/emission wavelengths (0–10 min: 260/366 nm and 10–20 min: 280/450 nm). The method was validated in line with Commission Decision 2002/657/EC in terms of selectivity, linearity (5–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), limits of detection (1–7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and quantification (5–30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), decision limit, detection capability, accuracy (lower than 7.4%), precision (lower than 6.4%), and robustness. Recoveries of the quinolones in spiked muscle fishes were in the 87–110% range. Finally, the method was applied to determine the antibiotics studied in real fish samples (gilthead, mussel, prawn, sea bass, salmon, trout, and turbot). The analysis of these samples did not reveal the presence of quinolones.

Part III. Analysis of related compounds

Chapter 10

Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases

Omeprazole, a substituted benzimidazole compound and a prototype anti-secretory agent, is a class referred to as a proton-pump inhibitor. It acts to regulate acid production in the stomach by interaction with H^+/K^+ -ATPase in the secretory membranes of the parietal cells, and is highly effective for the treatment of duodenal or gastric ulcers, reflux oesophagitis and Zollinger–Ellison syndrome. Omeprazole is combined with antibiotics in eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection of the stomach.

Omeprazole extensively metabolises to the primary metabolite of 5-hydroxyomeprazole and omeprazole sulphone.

A sensitive method that makes use of micellar mobile phases was developed and validated for the simultaneous determination of omeprazole and its two main metabolites in biological fluids with no pretreatment. The selected mobile phase composition was 0.08 M SDS–10% (v/v) propanol–0.01 M NaH_2PO_4 –pH 7, with the total analysis time under 11 min.

The method was validated according to the Food and Drug Administration guideline. The analytical parameters including linearity ($R^2 > 0.9996$), intra- and inter-day precisions (RSD, %: 0.6–7.9 and 0.14–4.7, respectively), and robustness were studied for the three compounds. The limits of detection and quantification were less than 6 and 25 ng/mL, respectively. Recoveries were in the 98–102% range. Finally, the method was successfully applied to determine omeprazole and its metabolites in physiological samples (urine and plasma). Omeprazole was also analysed in pharmaceutical formulations.

Conclusions

This thesis describes several methods for the separation and determination of different groups of antibiotics (14 fluoroquinolones, 4 penicillins and 6 sulphonamides), as well as related compounds (omeprazole and their metabolites) in a wide variety of matrices (pharmaceuticals, urine, serum and food samples), by direct injection and isocratic elution in micellar mobile phases that contain sodium dodecylsulphate (SDS) and an organic solvent:

- (i) Antibiotics of the group of fluoroquinolones (oxolinic acid, pipemidic acid, ciprofloxacin, danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, flumequine, levofloxacin, lomefloxacin, marbofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, and sarafloxacin), using fluorescent or UV detection.
- (ii) Antibiotics of the group of penicillins (amoxicillin, ampicillin, cloxacillin, and dicloxacillin), with UV detection.
- (iii) Antibiotics of the group of sulphonamides (sulphacetamide, sulphaguanidine, sulphamerazine, sulphamethizole, sulphamethoxazole and sulphathiazole), by detection in the visible region prior diazotisation and coupling with the Bratton-Marshall reagent.
- (iv) Related compounds (omeprazole, omeprazole sulphone and 5-hydroxiomeprazole), with detection in the UV region.

Tables C1 and C2 show the structures of the studied compounds and their dissociation constants, and the octanol-water partition coefficient constants. Table C3 summarises the main characteristics of the developed methods in the present thesis.

The most significant conclusions will be detailed in the following parts:

- C1. Basic principles of micellar liquid chromatography
- C2. Validation protocols for analytical methods
- C3. Analysis of antibiotics in physiological fluids and pharmaceuticals
- C4. Analysis of antibiotics in food samples
- C5. Analysis of omeprazole and its main metabolites in physiological fluids

C1. Basic principles of micellar liquid chromatography

Micellar liquid chromatography (MLC), which uses mobile phases containing a surfactant above its critical micellar concentration, is an alternative to conventional reversed-phase liquid chromatography and provides a solution to the direct injection of physiological or food samples by solubilising proteins (that are eluted together or shortly after the solvent front). The possibility of directly injecting samples into the chromatograph simplifies and expedites treatment, which confers analytical procedures greater accuracy and a lower cost.

The versatility of MLC is due to the wide variety of interactions that are established among the eluted solutes, the stationary phase, the aqueous phase and micelles. Their eluent characteristics allow the analysis of compounds with a wide range of polarities. Retention is highly reproducible and can be modelled with great accuracy to predict the retention changes when the mobile phase composition varies (surfactant and organic solvent concentrations), thus facilitating the optimisation of separation conditions.

The presence of a surfactant not only modifies the interactions established inside the column, but reduces the necessary amount of organic solvent in the mobile phase, which can be recycled due to low evaporation. These characteristics are genuinely interesting given current concerns about reducing organic contaminant residues in laboratories.

The retention behaviour in micellar mobile phases is well-known and has been supported by several empirical and mechanistic models proposed over the years. In addition, the different equilibria inside the column among the solute, the mobile phase and the modified stationary phase by monomers of surfactant have been exhaustively studied.

More often than not, the complexity of the mixtures of compounds studied and the relevant modification of their chromatographic behaviour when changing the mobile phase composition requires the use of computer-assisted simulations in MLC to follow the modifications in the chromatograms in detail. These simulations can be done with sound reliability thanks to the use of chemometrics tools.

On the other hand, a new micellar chromatographic mode has been recently described: high submicellar chromatography, where the surfactant forms micelles and organic solvent content is high. This mode opens up a range of possibilities to new applications in this chromatographic technique, and complements low submicellar chromatography (also known as ion pair chromatography) where the number of free molecules of the surfactant in the mobile phase is insignificant, but sufficient to cover the stationary phase.

Fundamental studies into MLC have served to develop the technique and to establish its theoretical basis, without which its later use in diverse applications would be impossible.

C2. Validation protocols for analytical methods

The fact that many of the technical terms used in methods evaluation vary in different sectors of analytical measurement, both in terms of its meaning and how they are determined, makes it difficult for analysts to comprehend the validation procedure.

Validation of an analytical method should enable the verification of its suitability, as well as the capacity of both staff and the laboratory, which is based on the procedure's statistical parameters. The methods developed by a laboratory must be fully validated before use. The procedures and scope of validation are not always the same and should be set individually.

Validation requires work to ensure the security of the results obtained, so laboratories should work in accordance with proper guidelines which are established by Good Laboratory Practices (GLP).

Analytical methods should be validated or revalidated by the laboratory that uses them: (i) prior to routine use, (ii) each time the original validated conditions are changed, or (iii) when the method is modified without this being planned.

Validation consists in three steps: (i) establishment of the conditions to be performed, (ii) determination of the procedure's statistical parameters, and (iii) evaluation of the validation results by comparing the statistical parameters obtained under the established conditions, and the decision making on the validity of the procedure for the intended purpose. This process ends when the method is able to meet the established purpose, thus rendering further development unnecessary.

The quality parameters of an analytical method to be checked are: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy, precision, recovery, and robustness, whose definition can be found in several IUPAC or ISO documents, among others. Guidelines differ depending on the validation matrix to be analysed, among which we can highlight the following that have been used in the methods developed in this thesis: International Conference on Harmonization, Food and Drug Administration, and the Commission Decision 2002/657/EC.

C3. Analysis of antibiotics in physiological fluids and pharmaceuticals

Fluoroquinolones and penicillins were analysed in urine samples using fluorescence or UV detection, respectively. Samples were directly injected into the chromatographic system after dilution, which permits the same column to be used to analyse a large number of samples, thus avoiding the possibility of poor reproducibility of extraction procedures. Micelles tend to bind proteins competitively, thereby releasing protein-bound drugs and proteins. Thus, proteins are solubilised in micellar media and washed harmlessly away to elute with the solvent front rather than precipitating into the column. The analysis revealed the relevance of urine samples dilution before injection to avoid an unnecessary exposure of the column to samples containing high concentrations of proteins, and to reduce the wide protein band at the beginning of the chromatograms, as well as the peaks of endogenous compounds. For most antibiotics, the sensitivity achieved after dilution was adequate for urine detection at 24 hours after its ingestion. On the other hand, the retention times of the antibiotics remained unchanged under these conditions after approximately 250 injections (maximum number of injections performed with the same mobile phase without cleaning the column). It should be noted that the experiments included in this thesis were done by recycling the micellar mobile phase in order to reduce operation costs.

The direct injection procedures herein developed can be applied in routine control analyses of antibiotics in urine samples. The limits of quantification and the mobile phases selected in each case are shown in Table C3. The columns used were: phenyl (amoxicillin), Zorbax C18 (penicillins), and C18 (fluoroquinolones).

The values of relative standard deviation (RSD) for intra-and interday precisions were less than 8.5%.

The low efficiency of the chromatographic peaks in MLC compared to that obtained using the hydro-organic mobile phases has been widely discussed in the literature. However, this is not a general behaviour since it has been demonstrated that the efficiencies of amino compounds, such as β -blockers, is better in MLC. On the other hand, the peak width limits the possibility of systematic drugs research. It should be noted that all the studies herein presented were performed with an isocratic elution. MLC allows the analysis of compounds with a very different hydrophobicity using a single mobile phase. The number of compounds that can be resolved in an adequate analysis time should be evaluated under these conditions. The use of a gradient elution would enhance this possibility; however, this has not been investigated in this thesis.

In these matrices, up to four compounds were resolved whose octanol-water partition coefficients ($\log P_{o/w}$) fall in the following ranges: 0.87–2.91 for penicillins, and 0.18–2.04 for fluoroquinolones. Both groups of antibiotics are protonated in different degrees in the working pH range of the column ($pK_{a1} \approx 5.5$ –6.6 and $pK_{a2} \approx 7.2$ –8.9 for fluoroquinolones, $pK_{a1} \approx 2.6$, $pK_{a2} \approx 7.4$, and $pK_{a3} \approx 9.6$ for penicillins). The use of mobile phases at pH 3 is justified by the adequate retention of these compounds at this pH value, thus enhancing resolution. Furthermore in an acidic medium, the basic compounds efficiencies values are enhanced due to the protonation of the free silanol groups of the column. However, it should be noted that penicillins decompose in acidic media, whose analysis should be performed almost immediately after preparation.

After selecting the pH of the mobile phase, an interpretative optimisation procedure of mobile phase composition was performed by considering only the surfactant and organic solvent (propanol or butanol) concentrations. For fluoroquinolones, 0.5% triethylamine (TEA) was added to the mobile phase to reduce the tail of the chromatographic peaks and to improve efficiency values, which is common practice in hydro-organic mobile phases buffered at low pH values (2.5–4.0).

One of the advantages of MLC is the high reproducibility of compounds' retention times and the ability of their prediction using simple models, which have a chemical-physical justification. In the procedures outlined in this section, the prediction errors of the retention times were always lower than 3%. Modelling retention allows the use of interpretive optimisation strategies to resolve mixtures of compounds. These strategies entail a lower number of experiments than sequential strategies, whose application is difficult when there are changes in the elution order of compounds when varying the mobile phase composition. In addition, the results obtained with interpretive strategies are more reliable. Chromatographic separation quality was measured by the application of the elemental criterion of the overlapped fractions, which takes into account the position and shape of the chromatographic peaks. The individual values of the overlapped fractions, obtained for each peak, should be combined to quantify the global resolution of the compounds mixture in a chromatogram. In all cases, the normalised product of elementary resolutions was used which provides a more realistic and global resolution. For penicillins, two optimisation procedures were performed: one for the Kromasil column, and another one for the Zorbax column. Resolution diagrams were obtained for both columns; that of the Zorbax column was the most robust since it provides a wider area where compounds are completely separated at the baseline; this is precisely the reason why this column was selected in this case.

The methods were validated according to the FDA guidelines (for the analysis of fluoroquinolones and penicillins in urine samples) and ICH (fluoroquinolones in pharmaceuticals). The parameters studied were: selectivity, linearity, limits of detection

and quantification, accuracy, precision, recovery, and robustness; which obtained good results in all cases.

The urine samples analysis showed that the developed methods could be applied in a pharmacokinetics study of these antibiotics since the limits of quantification were adequate if we consider that the sample was diluted before its analysis.

Fluoroquinolones and penicillins were also analysed in pharmaceuticals as tablets or capsules. The label claim percentage values were in the 96–106% range and the RSD fell in the 0.1–2.4% range. In all cases, the results agreed with the contents declared by the manufacturers.

C4. Analysis of antibiotics in food samples

The aim of food control programmes is law enforcement drug residues, antibiotics in this case, in products of animal origin, and they strongly depend on the availability of rapid, precise methods for analytical determination. The European Union has introduced legislation on the authorisation of veterinary medicines and has established maximum residual levels (MRLs) for these drugs in different tissues of animal origin for human consumption. Thus, there is a continuing need to develop new reliable analytical methods for determining compliance with national and international regulations in all quality and food safety areas.

In this case, antibiotics were analysed in milk (sulphonamides and fluoroquinolones), eggs and fish samples (fluoroquinolones), following the European Commission Decision 2002/657/EC or ICH guidelines.

In these matrices it was possible to resolve mixtures of five (fluoroquinolones) and six (sulphonamides) antibiotics, with log $P_{o/w}$ values in the following ranges: 0.2–3.01 for fluoroquinolones, and –1.09–0.85 for sulphonamides. The column used in all cases

was a Kromasil C18, while optimisation was carried out as described for physiological samples in Section C3.

Sulphonamides were derivatised with the Bratton-Marshall reagent (*N*-(1-naphthyl) ethylenediamine) to form the corresponding azo-dyes and subsequent detection in the visible region ($\lambda = 490$ nm). However, sulphonamide-azo dyes determination cannot be strictly considered a direct injection method because, even though it has removed any previous extraction step, samples are treated before direct injection into the chromatograph to improve selectivity. The developed method was applied to the spiked milk samples analysis, where recoveries fell in the 83.7–103.0% range. This indicates that the sample preparation procedure is suitable for this type of analysis.

Danofloxacin, difloxacin flumequine and marbofloxacin were determined in milk and eggs with fluorescent detection using the following programme for the time and wavelengths of excitation / emission: 0–9.30 min, 260/366 nm for flumequine, and 9.30–20 min: 280/450 nm for danofloxacin, difloxacin, and marbofloxacin.

In addition to the validation parameters previously specified for physiological samples, the decision limit (CC_{α}) and detection capability (CC_{β}) were also determined for fluoroquinolones in food.

In the robustness study, five factors were selected to examine variation on the retention times of compounds: a) SDS (M), b) butanol (%), c) pH, d) flow rate, and e) TEA (%). Most remained sufficiently unaffected by slight changes to these parameters (RSD < 6%), except flow rate and the variation of SDS concentration, which have more influence on the retention of the studied compounds (RSD < 10%). The same results were obtained with the other methods developed in this thesis.

The method was applied to determine the four quinolones in spiked milk and eggs samples, which were obtained with satisfactory recoveries for all the compounds (94.3–113.7%). Furthermore, no evidence was found of the presence of quinolones residues in any of the real samples analysed.

Finally, oxolinic acid, difloxacin, enrofloxacin, flumequine, and sarafloxacin were analysed in fish muscles (gilthead, salmon, trout, sea bass, mussel, prawn, and turbot) using a fluorescence detection programme similar to that previously described. In this case, sample treatment consisted in homogenisation, extraction and filtration prior to injection into the chromatographic system. The advantage over usual extraction procedures is that no organic solvent was used. Briefly, samples were finely ground using a mincer. Then, an amount was weighed, homogenised and mixed with a solution of 0.05 M SDS–pH 3, and stirred for 1 h. Finally, the supernatant was filtered and injected into the chromatographic system. The method was accurate and precise, as indicated by the relative error and relative standard deviation values, which were lower than 7.4% and 6.4%, respectively. The recoveries obtained in fish samples fell in the 87–110% range. As with the milk and egg samples, the analysis of free antibiotic fish samples did not reveal the presence of any quinolone.

The results of this section indicate that the proposed chromatographic methods can be applied to a residue control programme for fluoroquinolones.

C5. Analysis of omeprazole and its main metabolites in physiological fluids

Omeprazole belongs to a group of inhibitors with high power against the action of acids causing gastritis or heartburn; that it is an inhibitor of the gastric proton pump. It is also used in a triple therapy combined with the clarithromycin and amoxicillin antibiotics (or metronidazole in patients who are hypersensitive to penicillin) for the eradication of the *Helicobacter pylori* bacterium in the stomach.

Omeprazole and its metabolites (omeprazole sulphone and 5-hydroxyomeprazole) were determined in urine (dilution factor 1:10) and serum (dilution factor 1:5). The mobile phase used was 0.08 M SDS–10% propanol–0.01 NaH₂PO₄–pH 7, with detection in the ultraviolet region. pH selection is justified because omeprazole decomposes at lower pH values. Thus, the solutions of the compounds studied were prepared in a micellar medium at pH 9 and kept at 4 °C until analysed. At 48 h since its preparation, omeprazole decomposed by 29%, and its two metabolites by 1%.

The Food and Drug Administration validation guide used in this case, with the following parameters: selectivity, linearity (10–2000 ng/mL), limits of detection (1.8–5.8 ng/mL) and quantification (10–25 ng/mL), precision (0.1–8.0%) and accuracy (0.05–2.8%), recovery (97.6–101.9%) and robustness (RSD < 11.5%). The results in both matrices were very similar.

A pharmacokinetic study was performed in urine up to 12 h after oral administration, where the three compounds were observed. Serum samples were analysed twice (2 h and 6 h), but no 5-hydroxyomeprazole peak appeared after 6 h. The method was also applied to the analysis of omeprazole in pharmaceuticals where the values found were around 99.9% of those declared by the manufacturers, with accuracy in the 1.0–1.6% range.

In conclusion, the procedure is sensitive enough to perform routine analyses of omeprazole in biological and pharmaceutical formulations.

Table C1. Structures, octanol-water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) and dissociation constants (pK_a) of the antibiotics studied in this thesis.

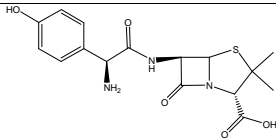
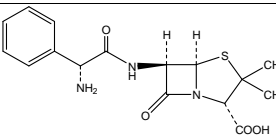
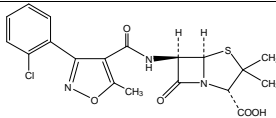
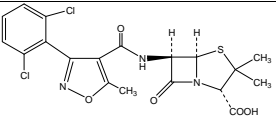
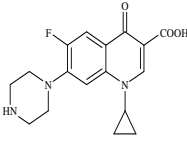
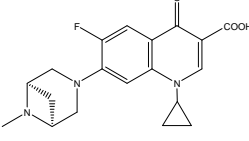
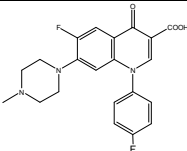
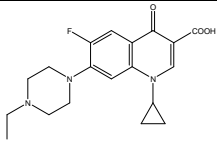
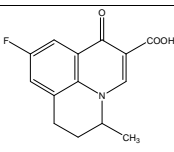
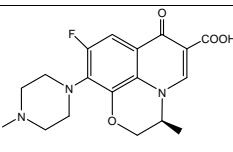
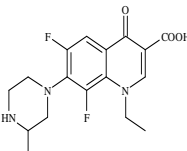
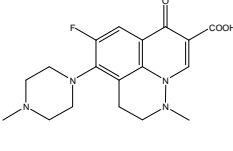
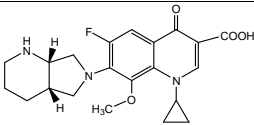
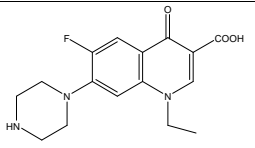
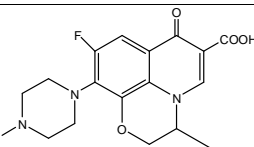
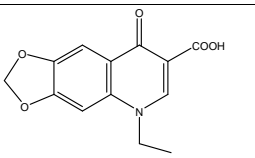
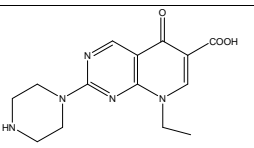
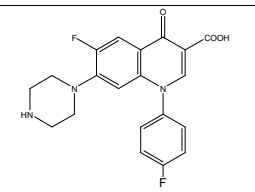
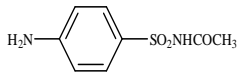
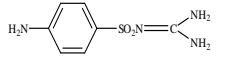
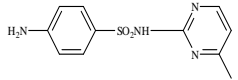
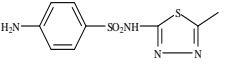
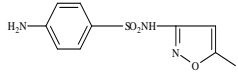
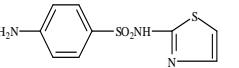
<i>Penicillins^a</i>					
	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	0.87	2.4		1.06	2.5
Amoxicillin		7.4	Ampicillin		7.3
		9.6			
	2.5	2.7		2.91	2.76
Cloxacillin			Dicloxacillin		
<i>Quinolones and fluoroquinolones^{a,b}</i>					
	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	0.28	6		2.42	6.32
Ciprofloxacin		8.8	Danofloxacin		8.73
	2.72	6.49		1.63	6.00
Difloxacin		7.74	Enrofloxacin		8.50
	1.20	6.65		1.26	6.05
Flumequine			Levofloxacin		8.22
	1.11	6.56		0.83	5.51
Lomefloxacin		8.47	Marbofloxacin		8.38

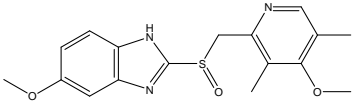
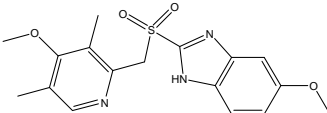
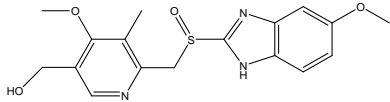
Table C1 (continue)

	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	2.04	6.4 9.5		1.64	6.3 8.8
Moxifloxacin			Norfloxacin		
	0.92	5.74 7.9		0.2	6.90
Ofloxacin			Oxolinic acid		
	0.18	5.5		3.01	6.49 8.54
Pipemidic acid			Sarafloxacin		
Sulphonamides^c					
	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
	-0.19	1.82 5.85		-1.09	2.46 11.15
Sulphacetamide			Sulphaguanidine		
	0.11	2.16 6.80		0.47	2.24 5.30
Sulphamerazine			Sulphamethizole		
	0.85	1.81 5.46		-0.04	2.06 7.07
Sulphamethoxazole			Sulphathiazole		

^a Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, 2004; J. Chromatogr. B 705 (1998) 63; Comprehensive Medicinal Chemistry, vol. 6 (1990). Oxford: Pergamon Press.

^b J. Chromatogr. A 945 (2002) 1; Tuberculosis 88 (2008) 119; Tuberculosis 88 (2008) 127; Trends Anal. Chem. 26 (2007) 1043; Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 4806; Science of the Total Environmen. 407 (2009) 2760; Pharmaceutical Research, Vol 19, No. 12, 2002; AHFS Americal Hospital Formulary Service 1998.

Table C2. Structures, octanol-water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) and dissociation constants (pK_a) of omeprazole and its metabolites.

	$\log P_{o/w}$	pK_a		$\log P_{o/w}$	pK_a
 <p>Omeprazole</p>	2.23	4.2 9.0	 <p>Omeprazole sulfone</p>	2.06	
 <p>5-hydroxyomeprazole</p>	1.17				

Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, 2004; ALOGPS 2.1 program (J. Chem. Inf. Comp. Sci. 41 (2001) 1488).

Table C3. Summary of the characteristics of the developed methods in this thesis

Compound	Chromatographic conditions	Analysis Time (min)	Detection (nm)	LOQ	Precision intra and inter-day (%)	Sample
Amoxicillin	Hypersil Phenyl (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 0.10 M SDS–4% butanol–pH 3	6	UV: 210	0.34 μg/mL	0.13–6	Urine Pharmaceuticals
Amoxicillin, ampicillin, cloxacillin, and dicloxacillin	Zorbax C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 0.11 M SDS–6% propanol–pH 3	16	UV: 210	50 ng/mL	0.1–5.9	Urine Pharmaceuticals
Ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, and moxifloxacin	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) a) 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3 b) 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3	a) 10 b) 22	a) FLD: λ _{em} = 285 λ _{ex} = 485 b) FLD: λ _{em} = 295 λ _{ex} = 485	1 ng/mL	0.11–8.4	Urine
Pipemidic acid, levofloxacin, morfloxacin, and moxifloxacin	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–pH 3	12	UV: 276	28–171 ng/mL	0.2–3.5	Pharmaceuticals

Table C3 (continue)

Compound	Chromatographic conditions	Analysis Time (min)	Detection (nm)	LOQ	Precision intra and inter-day (%)	Sample
Sulphacetamide, sulphaguanidine, sulphamerazine, sulphamethizole, sulphamethoxazole, sulphathiazole	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.08 M SDS-8.5% propanol-pH 7	16	UV: 490	2.4-3.1 ng/mL	0.3-3.7	Milk
Danofloxacin, difloxacin, flumequine, and marbofloxacin	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.05 M SDS-10% butanol-0.5% TEA-pH 3	15	FLD: 0-9.30 min $\lambda_{em} = 260$ $\lambda_{ex} = 366$ 9.30-20 min $\lambda_{em} = 280$ $\lambda_{ex} = 450$	30-100 µg/kg	0.6-8.4	Milk Egg
Oxolinic acid, flumequine, enrofloxacin, difloxacin, and sarafloxacin	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.065 M SDS-12.5% propanol-0.5% TEA-pH 3	18	FLD: 0-10 min $\lambda_{em} = 260$ $\lambda_{ex} = 366$ 10-20 min $\lambda_{em} = 280$ $\lambda_{ex} = 450$	5-30 µg/kg	1.0-7.8	Fish
Omeprazole, omeprazole-sulfone, 5-hydroxymeprazole	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) 0.08 M SDS-10% propanol-pH 7	11	UV: 305	10-25 ng/mL	0.14-7.9	Pharmaceuticals Urine Serum

Published articles

Investigar es veure el que tothom ha vist, i pensar el que ningú més ha pensat
A. Szent-Györgi

Maria Rambla Alegre
Samuel Carda Broch
Josep Esteve Romero

Àrea de Química Analítica, QFA,
Universitat Jaume I, Castelló,
Spain

Original Paper

Development and validation of a method to determine amoxicillin in physiological fluids using micellar liquid chromatography

A simple and robust method was developed for the routine identification and quantification of amoxicillin by micellar LC. Amoxicillin, a β -lactamase inhibitor, is one of the most commonly prescribed drugs in the treatment of urine and skin structure infections. In this work, amoxicillin was determined in urine samples without any pretreatment step in a phenyl column using a micellar mobile phase of 0.10 M SDS and 4% butanol at pH 3. A UV detection set at 210 nm was used. Amoxicillin was eluted at 5.1 min with no interference by the protein band or endogenous compounds. Linearities ($r > 0.9998$), intra- and interday precisions were determined (RSD (%) 0.4–2.7% and 0.3–5%, respectively, in micellar media, and 0.14–2.6% and 0.13–6%, respectively, in urine), and robustness was studied in the method validation. LOD and LOQ were 0.04 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$ in micellar media and 0.14 and 0.34 $\mu\text{g/mL}$ in urine, respectively. Recoveries in the urine matrix were in the range of 95–110%. The validated method proved to be reliable and sensitive for the determination of amoxicillin in urine samples.

Keywords: Amoxicillin / Direct injection / Micellar mobile phase / Urine

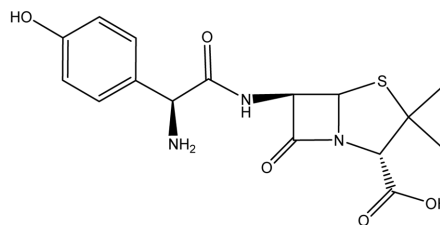
Received: February 14, 2008; revised: May 2, 2008; accepted: May 2, 2008

DOI 10.1002/jssc.200800084

1 Introduction

Amoxicillin (α -amino-*p*-hydroxybenzyl-penicillin) is an aminopenicillin with a broad spectrum, and currently it is the most commonly used antibiotic. It differs structurally from ampicillin only in the addition of a hydroxyl group on the phenyl ring, which makes it susceptible to a variety of degradative processes. Amoxicillin is also commercially available in fixed-ratio combinations with clavulanate potassium salt. Although clavulanic acid has only a weak antibacterial activity when used alone, the combined use of clavulanic acid and certain penicillins leads to a synergistic effect which extends the spectrum of penicillin activity against many strains of β -lactamase-producing bacteria [1]. Chemically, amoxicillin is a hydrophilic compound ($\log P_{ow} = 0.87$) whose dissociation constants are $\log K = 2.4, 7.4, 9.6$ [2]. The structure of amoxicillin is shown below.

Amoxicillin is used orally to treat lower respiratory tract infections, otitis media, sinusitis, skin and skin structure infections and urinary tract infections. It is also used orally for the treatment of chancroid and gonorrhoea



caused by susceptible organisms. In the medical practice, amoxicillin is used in the conventional tablet form with a minimal dose of 250 mg and a maximal dose of 875 mg [1]. After administering orally, amoxicillin is rapidly absorbed with peak serum levels appearing within 1–2 h. Approximately 60% of an oral dose is excreted in urine as an unchanged drug in 6 h and 20% as the inactive metabolite (penicilloic acid and penamaldic acid) [2].

Several analytical methods have been developed for the determination of amoxicillin. These methods include microbiological assay [3], enzymatic assay [4] and polarography [5]. Most of the described methods refer to the use of HPLC and GC-MS, which require large volumes of solvents, extraction and a derivatising treatment. GC-MS also involves high costs, thus limiting accessibility. HPLC methods were developed for more specific assays. Early HPLC methods involved pretreatment with imidazole [6], precolumn [7] and postcolumn derivatisation [8].

Correspondence: Professor Josep Esteve Romero, Àrea de Química Analítica, QFA, ESTCE, Universitat Jaume I, 12071 Castelló, Spain

E-mail: josep.esteve@qfa.uji.es

Fax: +34-964-728066

Later HPLC methods using RP and UV detection, and column switching or amperometric detection [9–15] were developed. In order to enhance selectivity and sensitivity, some methods with fluorescence detection are carried out using postcolumns [16, 17] or precolumns [37]. Other techniques involve CZE [18, 19], micellar EKC [20, 21], as well as techniques coupled with flow injection analysis [22]. HPLC separation, followed by selective mass spectrometric detection, has recently become a method of choice [23–26]. Although these methods are selective, fast and sensitive, they are not suitable for routine clinical analysis because of the requirements they involve and for financial reasons.

Conventional HPLC methods using aqueous-organic mobile phases for the determination of drugs in physiological fluids with direct injection present many problems. Drugs are often strongly bound to proteins in a complex matrix where interference from numerous endogenous compounds is expected. This technique usually requires elaborate sample pretreatment due to the proteins' tendency to denature and precipitate in the injection valve or inside the column, thus obstructing or clogging the system. Micellar LC (MLC) allows the analysis of complex matrices without the aid of extraction. Micelles tend to bind proteins competitively, thereby releasing protein-bound drugs and proteins; rather than precipitating into the column, they are solubilised and washed away harmlessly to elute with the solvent front. Another advantage of using micellar mobile phases is that they are nontoxic, nonflammable, biodegradable and relatively inexpensive in comparison with aqueous-organic solvents [27]. MLC has proved to be a useful technique in the determination of substances in physiological fluids, as stimulants [28], barbiturates [29], and other compounds [20].

The purpose of the present work is to develop a rapid and sensitive quantitative chromatographic method for the determination of amoxicillin in urine using a new MLC method. The procedure developed herein could also be useful in the area of quality control, routine analysis and pharmacokinetic studies.

2 Experimental

2.1 Apparatus

The pH of the solutions was measured with a Crison GLP 22 (Barcelona, Spain) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode. The balance used was a Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland). The vortex shaker and sonification unit were from Selecta (Barcelona, Spain). The chromatographic system was an Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, thermostatted autosampler tray and column compartments and a diode-array detec-

tor (range 190–700 nm). Columns were: phenyl, amino and C18. The dimensions of all columns (Scharlab, Barcelona) were 150 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size.

2.2 Materials and reagents

Amoxicillin was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). SDS and sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dihydrogen phosphate, propanol, butanol and *n*-amyl alcohol were acquired from Scharlab. Hydrochloric acid, methanol and ethanol were purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Ultrapure water was used throughout the experiment (Millipore S.A.S., Molsheim, France). The pharmaceuticals Normon (Madrid, Spain) and Alter (Madrid) were purchased in a local pharmacy.

2.3 Standard, samples and mobile phase preparation

The micellar mobile phases were prepared by dissolving SDS in water, which were buffered with sodium dihydrogen phosphate 0.01 M at pH 3 using 0.1 M of hydrochloric acid. Finally, butanol was added to achieve the desired concentration of the organic solvent. Then water was added up to the mark-up of the volumetric flask.

A stock solution of 100 µg/mL of amoxicillin was prepared by dissolving the compounds in a few millilitres of ethanol with the aid of an ultrasonic bath, and was finally filled up with 0.05 M SDS pH 3. Urine samples were collected in a Urine Collection Cup (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK). Spiked urine stock solutions, also containing 100 µg/mL of amoxicillin, were prepared by dilution of 1 mL urine in a factor 1:100 using 0.05 M SDS pH 3. Solutions were prepared daily. For analysis, stock micellar or urine-micellar solutions were diluted to the desired concentration with the 0.05 M SDS pH 3 or urine/0.05 M SDS pH 3 (1:100) solutions, respectively. Analyses of patient urine were performed diluting urine with 0.05 M SDS pH 3 (1:100), which was injected directly into the chromatographic system. All solutions were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Micron Separations, Westboro, MA, USA) before analysis.

2.4 Recommended chromatographic conditions

Separation was performed in an RP Hypersil phenyl column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size) thermostatted at 25°C. The mobile phase was 0.10 M SDS, 4% v/v butanol, NaH₂PO₄ 0.01 M at pH 3. The flow rate, injection volume and UV wavelength were 1 mL/min, 20 µL and 210 nm, respectively. Under these conditions, the retention time for amoxicillin was 5.1 min. Chromatographic signals were acquired and processed with an Agilent ChemStation (Rev. A.10.01). Michrom software [31, 32]

Table 1. Retention factor (k), efficiencies (N) and asymmetry factors (A_f) of amoxicillin in three different columns

Concentration (M)	Phenyl			Amino			C18		
	k	N	A_f	k	N	A_f	k	N	A_f
pH 3									
0.05	15.9	3140	1.1	16.2	2180	0.9	17.7	820	0.7
0.10	7.2	2350	1.1	8.1	1500	0.9	7.9	750	0.8
0.15	4.0	1920	1.1	5.2	1400	1.0	5.1	750	0.9
0.20	3.1	1530	1.1	3.9	1460	1.0	3.9	750	0.9
pH 7									
0.05	0.3	1590	1.6	1.8	3260	1.8	0.5	770	1.0
0.10	0.3	1570	1.6	1.4	2620	1.4	0.4	770	1.1
0.15	0.3	1520	1.2	1.2	2130	1.2	0.4	740	1.0
0.20	0.3	1430	1.2	1.2	2100	1.2	0.4	910	1.2
pH 3									
0.05 – 2% ^{a)}	9.1	3270	1.1	10.3	2010	1.0	9.9	2920	1.1
0.05 – 6% ^{a)}	7.4	3660	1.2	7.3	2400	0.8	8.2	3510	1.0
0.10 – 4% ^{a)}	4.5	2550	1.1	4.7	1800	0.9	4.6	1790	1.1
0.15 – 2% ^{a)}	3.5	1900	1.1	4.8	1870	0.9	3.2	1350	1.1
0.15 – 6% ^{a)}	3.2	3100	1.2	3.0	1900	0.9	2.9	1870	1.1

^{a)} Propanol.

was used for chromatographic data treatment. The dead volume was 1.9 min.

3 Results and discussion

3.1 pH and column selection

In order to select the best analysis conditions, two pH (3 and 7) and three columns (C18, phenyl and amino) were studied. In a micellar chromatographic system with the anionic SDS, the stronger attraction of the cationic drugs to the surfactant adsorbed in the stationary phase, in relation to the micelles in the mobile phase, led to the retention of these drugs to increase at a lower pH. The influence of the mobile phase pH on the amoxicillin retention was studied using pure micellar mobile phases of SDS (M): 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 buffered at pH 3 and 7 with NaH_2PO_4 0.01 M. The results are presented in Table 1. Although the efficiencies (1500–3300) and asymmetries (0.7–1.6) were similar at both pH, the main difference lies in that amoxicillin eluted either near or in the dead volume in all columns at pH 7, owing to which pH 3 was finally chosen.

The stationary phases studied were columns C18, phenyl and amino. The modification of the stationary phase by adsorbed surfactant can have profound implications with regard to retention, selectivity and asymmetry in MLC. Firstly, in the C18 column [33], the formation of an anionic hydrophilic layer between the hydrophilic compounds and the sulphate group would explain the high resolution. On the other hand, the shorter retention

times of hydrophilic compounds are due to an increase in the polarity of the stationary phase which occurred as a result of surfactant adsorption. In some cases, poor retention, selectivity and reproducibility obtained in C18 columns could be improved by amino columns [34] that retain longer polar compounds than nonpolar compounds when the mobile phase is polar. Finally for hydrophilic compounds, phenyl columns could have a high retention character because of their high aromatic nature (π - π interactions and hydrophobicity) and spatial circumstances (planar molecule).

Amoxicillin was injected in phenyl, amino and C18 columns using pure micellar mobile phases containing SDS (M): 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, or SDS (M)-propanol (% v/v): 0.05–2, 0.05–6, 0.10–4, 0.15–2 and 0.15–6. The retention factors, efficiencies and asymmetry factors obtained are shown in Table 1. The usual behaviour in MLC with SDS was observed in all the columns and mobile phases: the retention factors decreased for SDS and alcohol, while the concentration of SDS and alcohol increased. The efficiencies decreased when surfactant concentration increased but, conversely, efficiencies increased at higher concentrations of the modifier. The three columns (phenyl, amino and C18) showed an appropriate retention factor for the analysis, good efficiency and asymmetry. C18 column presented a lower retention factor, but phenyl column displayed higher efficiency. Amino and C18 columns overlapped the amoxicillin peak with endogenous compounds of the urine. Thus, the phenyl column was selected for further analysis because of its highest efficiencies and adequate

Table 2. Retention factors (*k*), efficiencies (*N*) and asymmetry factors of amoxicillin in the method optimisation

Mobile phase	<i>k</i>	<i>N</i>	<i>B/A</i>
0.05 M SDS–2% propanol	9.1	3270	1.1
0.05 M SDS–6% propanol	7.4	3660	1.2
0.10 M SDS–4% propanol	4.5	2550	1.1
0.15 M SDS–2% propanol	3.5	1900	1.1
0.15 M SDS–6% propanol	3.2	3100	1.2
0.05 M SDS–2% butanol	7.5	2940	1.2
0.05 M SDS–6% butanol	3.8	3490	1.3
0.075 M SDS–5% butanol	3.5	3310	1.3
0.10 M SDS–4% butanol	2.4	2940	1.1
0.125 M SDS–3% butanol	2.9	2690	1.1
0.125 M SDS–5% butanol	2.2	3190	1.1
0.15 M SDS–2% butanol	2.6	1815	1.2
0.15 M SDS–6% butanol	2.0	2780	1.2
0.05 M SDS–2% pentanol	4.6	3450	1.1
0.10 M SDS–4% pentanol	2.2	2390	1.4

retention times with no overlapping of amoxicillin with other urine peaks.

3.2 Mobile phase selection

Once the pH (3) and the column (phenyl) were selected, amoxicillin was injected in different mobile phases to find the best composition of the mobile phase, which contained SDS (M)/propanol (% v/v) (0.05:2, 0.05:6, 0.1:4, 0.15:2, 0.15:6), SDS (M)/butanol (% v/v) (0.05:2, 0.05:6, 0.75:5, 0.10:4, 0.125:3, 0.125:5, 0.15:2, 0.15:6) and SDS (M)/pentanol (% v/v) (0.05:2, 0.10:4). Retention factors (*k*), efficiencies (*N*) and asymmetry factors (*A_T*) were measured and are summarised in Table 2.

The chromatographic data obtained were treated with Michrom [32], and the factors of maximum resolution and the minimum analysis time were taken into account. The accurate prediction of the retention behaviour, based on a checked model [35], can speed up the process of finding the optimal composition of the mobile phase for a given compound. Therefore, the model based on the following equation to determine amoxicillin has proved adequate to describe its retention in MLC with hybrid mobile phases. Predicted errors were in a range of 2–4%:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD}\phi}{1 + K_{AD}\phi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\phi}{1 + K_{AD}\phi}}$$

where *k* is the retention factor, [M] and ϕ are the concentrations of the surfactant and modifier, respectively; *K_{AS}* and *K_{AM}* describe the association equilibria between the solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; *K_{SD}* and *K_{MD}* are constants that measure the relative variation in the concentration of solute in bulk

water and micelles given the presence of the modifier, and refer to a pure micellar solution.

Although propanol showed a good resolution when simulated chromatograms were used throughout the experimental design, it was not used as an organic modifier because the retention time was not short enough, and instead resulted in a long analysis time as opposed to what was expected from not using a high percentage of alcohol. When pentanol was used, an overlapping between amoxicillin and urine endogenous peaks was observed in almost all the mobile phases. Thus, pentanol does not improve the results obtained with butanol, and butanol was selected as the organic modifier as it allows for less analysis time and the complete resolution. After monitoring the simulated chromatograms in the SDS–butanol experimental design, the optimum mobile phase was: SDS 0.1 M–4% v/v butanol–NaH₂PO₄ at pH 3, while the chromatographic parameters for amoxicillin in this mobile phase (*k*, *N* and *A_T*) were: 2.4, 2940 and 1.1.

3.3 Urine blank behaviour

Several urine blanks from males and females were injected directly into a micellar chromatographic system in order to check the background. The profile of the protein band and the endogenous compounds for all the samples were similar to those shown in Fig. 1A. No additional peaks were found in subsequent analyses.

3.4 Method validation

Validation was done following the food and drug analysis (FDA) validation guide [36]. The parameters evaluated were: linearity, LOD and LOQ, precision and accuracy, selectivity, robustness and the stability of the drug.

3.4.1 Linearity

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks obtained at seven different concentrations (nine replicates), in the range of 0.4–50 μg/mL in two different matrices: micellar solution and urine–micellar solution (1:100 dilution factor). To study the variability of the calibration parameter, curves were obtained for 5 days over a 2-month period for a different set of standards. The results in the two matrices were similar. The slope and intercept were determined by the least-squares linear regression analysis method, with averages of 0.6525 ± 0.005 and –0.04 ± 0.09, respectively. The regression coefficients (*r*) were always higher than 0.9998.

3.4.2 LOD and LOQ

The LOD (*3s criterion*) and LOQ (*10s criterion*) for amoxicillin in SDS and urine (*n* = 10) were determined according to the FDA validation guide [36] using ten injections of SDS

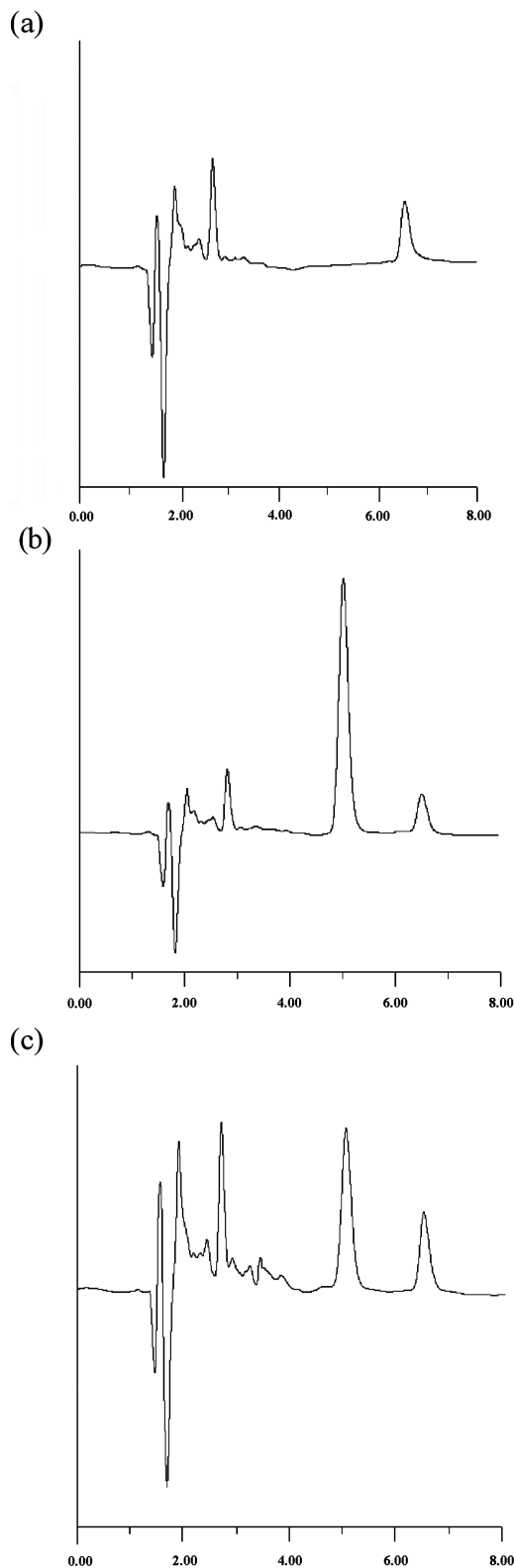


Figure 1. (a) Chromatograms of urine blank, (b) urine spiked (15 µg/mL) and (c) amoxicillin excreted (6 µg/mL) in urine as unchanged drug 2 h after oral ingestion. Mobile phase: 0.1 M SDS–4% butanol pH 3.

and urine blanks. The results were based on the SD of the response, and also on the slope of a specific calibration curve containing the analyte. LODs and LOQs in SDS and urine were: 0.04 and 0.10 µg/mL, and 0.14 and 0.34 µg/mL, respectively.

3.4.3 Precision and accuracy

The intra- and interday precisions of the method were determined by analysing the amoxicillin at seven concentrations in the range of 0.4–50 µg/mL in micellar media and in urine–SDS (1:100). The intraday analysis was determined by injecting these seven test solutions nine times in a day, while the interday analysis was the average of nine measurements of the intraday values taken on 5 days over a 3-month period performed by different analysts and equipment at the same seven concentrations. The results, expressed as the percentage of the RSD, for intra- and interday values were 0.4–2.7% and 0.3–5%, respectively, in micellar media, and 0.14–2.6% and 0.13–6%, respectively, in urine.

3.4.4 Selectivity

Five selected control drug-free human urine samples were processed directly into the chromatographic system and analysed to determine the extent to which endogenous components may contribute to interfere with the retention time of the drug. No interference for endogenous compounds was found in the physiological matrix studied.

3.4.5 Robustness

The robustness of the method was examined by replicate injections ($n = 6$) of standard solution at a concentration of 10 µg/mL with slight changes made to the chromatographic parameters. Insignificant differences in the peak areas and less variability in the retention time were observed. The results, shown in Table 3, indicate that the selected factors remain unaffected by the slight variations made to these parameters.

3.4.6 Stability

Degradation of amoxicillin, after 1 wk of storage of SDS and urine stock solutions, was confirmed by new peaks emerging in the chromatograms (retention times at 4.58 and 5.30 min); no interferences were found between these peaks and the analyte. All solutions were kept at a low temperature (4°C) until required, and were used within a week. Amoxicillin was analysed immediately after preparation and at selected time intervals after storage over the study period. After 24 h, 48 h and 1 wk, 4, 19 and 64% of decomposition of amoxicillin in urine were observed, respectively.

Table 3. Robustness evaluation of MLC method

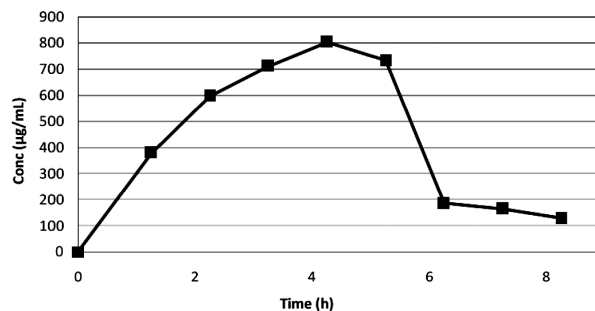
Chromatographic changes	Level	t_R (min)
A: Flow rate (mL/min)		
0.9	-0.1	5.67
1	0	5.10
1.1	+0.1	4.56
Mean \pm SD		5.1 \pm 0.6
B: SDS concentration (M)		
0.095	-0.01	5.23
0.1	0	5.10
0.0105	+0.01	5.01
Mean \pm SD		5.11 \pm 0.11
C: Percentage of butanol in the mobile phase v/v		
3.9	-0.1	5.29
4	0	5.10
4.1	+0.1	4.99
Mean \pm SD		5.12 \pm 0.15
D: pH of mobile phase		
2.9	-0.1	5.31
3	0	5.10
3.1	+0.1	4.92
Mean \pm SD		5.11 \pm 0.19

3.4.7 Analysis of the marketed pharmaceutical formulation

The pharmaceutical formulations analysed (Normon and Alter) were tablets containing a mixture of amoxicillin (875 mg) and a β -lactamase inhibitor (clavulanic acid, 125 mg). The experimental results of the amount of amoxicillin in tablets, expressed as a percentage of the label claimed by the manufacturer, were in good agreement, therefore suggesting that there was no interference of clavulanic acid and excipients, which are normally present in tablets. The drug content mg \pm SD found in one tablet was 878.4 \pm 0.6 ($n = 6$) and 880.2 \pm 0.6 ($n = 6$) for the Normon and Alter drugs, respectively.

3.4.8 Determination of spiked urine samples

Amoxicillin recoveries from urine were determined by spiking drug-free urine diluted in a 1:100 factor with 0.05 M SDS at pH 3 with known amounts of the drug at seven different concentrations (0.4–50 μ g/mL) within the calibration range (nine replicates for each standard). The spiked samples were processed and analysed with the developed procedure. The relative (analytical) recovery was calculated by comparing the concentration obtained from the drug-supplemented urine with the actual added amounts. The data obtained showed satisfactory recoveries for amoxicillin, and the results were in the range of 95–110%. The highest errors were obtained for the lowest concentrations. Figure 1B shows the chromatogram of a spiked urine sample containing amoxicillin analysed with the optimum mobile phase.

**Figure 2.** Elimination curve of amoxicillin in urine.

3.4.9 Drug control in real urine samples

Urinary studies were conducted following the oral administration of a single dose of a conventional tablet containing 875 mg of amoxicillin with volunteers. Urine samples were taken nine times a day, approximately every 1 h, and the volume was measured. Dilution of urine samples at 1:100 was performed, and the solution was injected directly into the chromatographic system without any other treatment, except filtration. No interferences from clavulanic acid were observed since this compound has a poor absorption ($\lambda_{max} = 201$ nm in water) in the UV region. Figure 2 depicts the elimination curve. The maximum concentration excreted in urine was found 4 h after oral administration, and this concentration was 803 μ g/mL. The final quantity of amoxicillin eliminated after 8.5 h was 517 mg, *i.e.* 59% of the dose taken. Figure 1C shows the chromatogram of amoxicillin excreted after 2 h of oral administration in an unchanged form. These results show that pharmacokinetic studies can be performed under the proposed chromatographic conditions.

4 Conclusions

In conclusion, our results indicate that the MLC procedure can be used for the analysis of amoxicillin, a frequently prescribed penicillin, in urine samples, with an analysis time below 6 min.

Validation including linearity, sensitivity, selectivity, accuracy, stability and robustness were developed efficiently with satisfactory results and used for assaying amoxicillin in urine. The method is sensitive enough to undertake quality control routine analysis and pharmacokinetic studies of the drug if we take into account that the urine samples were injected without any previous treatment to separate or concentrate the analytes.

This work was supported by the projects of the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) CTQ 200764473/BQU and the Foundation Caixa Castelló-Bancaixa P1-1B2006-12. Maria Rambla-Alegre also wishes to thank the MEC for the FPU grant.

The authors declared no conflict of interest.

5 References

- [1] American Hospital Formulary Service, *Drug Information*, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD 1988.
- [2] Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004.
- [3] Mainz, D., Borner, K., Koeppe, P., Kotwas, J., Lode, H., *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 50, 699–706.
- [4] Hoizey, G., Lamiable, D., Frances, C., Trenque, T., Kaltenbach, M., Denis, J., Millart, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 30, 661–666.
- [5] Lyle, S. J., Yassin, S. S., *Anal. Chim. Acta* 1993, 274, 225–230.
- [6] Matar, K. M., Nazi, E. M., El-Saved, Y. M., Al-Yamani, M. J., Al-Suwaveh, S. A., Al-Khamis, K. I., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28, 97–107.
- [7] Ang, C. Y. W., Luo, W. H., Hansen, E. B., Freeman, J. P., Thompson, H. C., *J. AOAC Int.* 1996, 79, 389–396.
- [8] Mascher, H. J., Kikuta, C., *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 221–226.
- [9] Dousa, M., Hosmanová, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 373–377.
- [10] Cass, Q. B., Gomes, R. F., Calafatti, S. A., Pedrazzoli, J., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 235–241.
- [11] Aghazadeh, A., Kazemifard, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 325–329.
- [12] Foroutan, S. M., Zarghi, A., Shafaati, A., Khoddam, A., Movahed, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45, 531–534.
- [13] Matar, K. M., *Chromatographia* 2006, 64, 255–260.
- [14] Cavazos Rocha, N., Vera Cabrera, L., Welsh Lozano, O., Waksman de Torres, N., Salazar Cavazos, M. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 1775–1781.
- [15] Leroy, P., Gayriloff, C., Nicolas, A., Archimbault, P., Ambroggi, G., *Int. J. Pharm.* 1992, 82, 157–164.
- [16] Tokumura, T., Machida, Y., *Int. J. Pharm.* 2001, 228, 1–4.
- [17] Mascher, H., Kikuta, C., *J. Chromatogr.* 1990, 506, 417–421.
- [18] Santos, S. M., Henriques, M., Duarte, A. C., Esteves, V. I., *Talanta* 2007, 71, 731–737.
- [19] Pajchel, G., Pawlowski, K., Tyski, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29, 75–81.
- [20] Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* 2000, 910, 69–78.
- [21] Bailón-Pérez, M. I., Cuadros-Rodríguez, L., Cruces-Blanco, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 746–752.
- [22] González San Miguel, H. M., Alpizar Lorenzo, J. M., Cerdà Martín, V., *Talanta* 2007, 72, 296–300.
- [23] Yoon, K. H., Lee, S. Y., Kim, W., Park, J. S., Kim, H. J., *J. Chromatogr. B* 2004, 813, 121–127.
- [24] Riediker, S., Stadler, R. H., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1614–1621.
- [25] De Baere, S., Cherlet, M., Baert, K., De Backer, P., *Anal. Chem.* 2002, 74, 1393–1401.
- [26] Reyns, T., De Boever, S., De Baere, S., De Backer, P., Croubels, S., *Anal. Chim. Acta* 2007, 597, 282–289.
- [27] Berthod, A., García-Álvarez-Coque, M. C., *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, New York 2000.
- [28] Gil-Agustí, M., Capella-Peiró, M. E., Martinavarro-Dominguez, A., Esteve-Romero, J., *Chromatographia* 2003, 57, 51–57.
- [29] Capella Peiró, M. E., Gil Agustí, M., Martinavarro Dominguez, A., Esteve Romero, J., *Anal. Biochem.* 2002, 309, 261–268.
- [30] Esteve Romero, J., Carda Broch, S., Gil Agustí, M., Capella Peiró, M. E., Bose, D., *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 75–91.
- [31] Torres Lapasió, J. R., García Álvarez Coque, M. C., Baeza Baeza, J. J., *Anal. Chim. Acta* 1997, 348, 187–196.
- [32] Torres Lapasió, J. R., *Michrom Software*, Marcel Dekker, New York 2000.
- [33] Lavine, B. K., Cooper, W. T., He, Y., Hendayana, S., Han, J. H., Tetreault, J., *J. Colloid Interface Sci.* 1994, 165, 497–504.
- [34] Olsen, B. A., *J. Chromatogr. A* 2001, 913, 113–122.
- [35] García Álvarez Coque, M. C., Torres Lapasió, J. R., Baeza Baeza, J. J., *J. Chromatogr. A* 1997, 780, 129–148.
- [36] *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA 2001.
- [37] Gamba, V., Dusi, G., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 69–72.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection

Maria Rambla-Alegre*, Rosa Martí-Centelles, Josep Esteve-Romero, Samuel Carda-Broch

Àrea de Química Analítica, QFA, Universitat Jaume I, 12071 Castelló, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Penicillins
Direct injection
Micellar liquid chromatography
Urine
Pharmaceuticals

ABSTRACT

A direct injection liquid chromatography procedure was developed for the simultaneous determination of four penicillin antibiotics (amoxicillin, ampicillin, cloxacillin and dicloxacillin) in pharmaceutical formulations and physiological fluids (urine) using hybrid micellar mobile phases. These antimicrobials are used to treat gastrointestinal and systemic infections. The four penicillins were analysed using a Zorbax C18 reversed-phase column and detected at 210 nm. These antibiotics were separated by an interpretive optimisation procedure based on the accurate description of the retention and shape of the chromatographic peaks. Antibiotics were eluted in less than 16 min with no interference by the urine protein band or endogenous compounds using the mobile phase 0.11 M sodium dodecyl sulphate–6% propanol–0.01 M NaH_2PO_4 buffered at pH 3. The method was validated according to the Food and Drug Administration guideline, including analytical parameters such as linearity ($R^2 > 0.993$), intra- and inter-day precisions (RSD, %: 0.1–4.4 and 1.2–5.9, respectively), and robustness for the four compounds. This method is sensitive enough for the routine analysis of penicillins at therapeutic urine levels, with limits of detection in the 1.5–15 ng mL^{-1} range and limits of quantification of 50 ng mL^{-1} . Recoveries in a micellar medium and a spiked urine matrix were in the 92.4–108.2% and 96–110% ranges, respectively. Finally, the method was successfully applied to determine these antibiotics in urine samples and pharmaceutical formulations.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Penicillins are β -lactam antibiotics which have been the most widely used antimicrobial drugs for more than 80 years and are still considered one of the most important groups of antibiotics. They are used to treat respiratory tract infections that often result from the encroachment of sensitive bacteria [1]. They are clinically used against Gram-positive and Gram-negative bacteria [2]. The basic structure of penicillins, 6-aminopenicillanic acid, consists in a thiazolidine ring fused to a β -lactam ring with a side chain (e.g., amoxicillin presents a primary amine group in the side chain that does not exist in any other penicillin except epicillin and bacampicillin) [3].

Nowadays, amoxicillin (AMO), an α -amino-substituted β -lactam antibiotic, is the most commonly used antibiotic because of its broad spectrum and low cost. AMO has a moderate polarity (octanol–water partition coefficient, $\log P_{o/w} = 0.87$), and its dissociation constants are $pK_a = 2.7$, 7.5 and 9.6 [3,4]. After oral administration, AMO is rapidly absorbed. About 60% of an oral dose

is excreted in the urine as an unchanged drug in 6 h, while 20% is excreted as the inactive metabolite, penicilloic acid, in the same period. Ampicillin (AMP) is used to treat infections of the intestinal, urinary and respiratory tracts. AMP exhibits lower antibacterial activity than AMO, has a moderate polarity ($\log P_{o/w} = 1.06$), and its dissociation constants are $pK_a = 2.5$ and 7.1 [3,4]. AMP is readily, but incompletely, absorbed after oral administration. About 30% of an oral dose is excreted in the urine as an unchanged drug in 6 h, and about 10% is excreted as penicilloic acid. Cloxacillin (CLO) is a hydrophobic compound ($\log P_{o/w} = 2.5$) with a dissociation constant of $pK_a = 2.7$ [3]. It is incompletely absorbed after oral administration and about 35% of an oral dose is excreted unchanged in the urine in 12 h, while around 11% is excreted as penicilloic acid. Finally, dicloxacillin (DIC) has very similar chemical characteristics ($\log P_{o/w} = 2.91$) to CLO [3]. CLO and DIC belong to the penicillinase-resistant penicillin group, while AMO and AMP belong to the broad-spectrum penicillins. Fig. 1 shows the chemical structures of the four antibiotics studied.

Since the discovery of penicillin antibiotics, several analytical techniques have been developed for their analysis. Microbiological assays prove either insensitive and slow or non-quantitative microbiological screening type methods [5]. Colorimetric assays are also non-specific, which therefore limits their frequent application

* Corresponding author. Tel.: +34 964 728099; fax: +34 964 728066.
E-mail address: mrambla@qfa.uji.es (M. Rambla-Alegre).

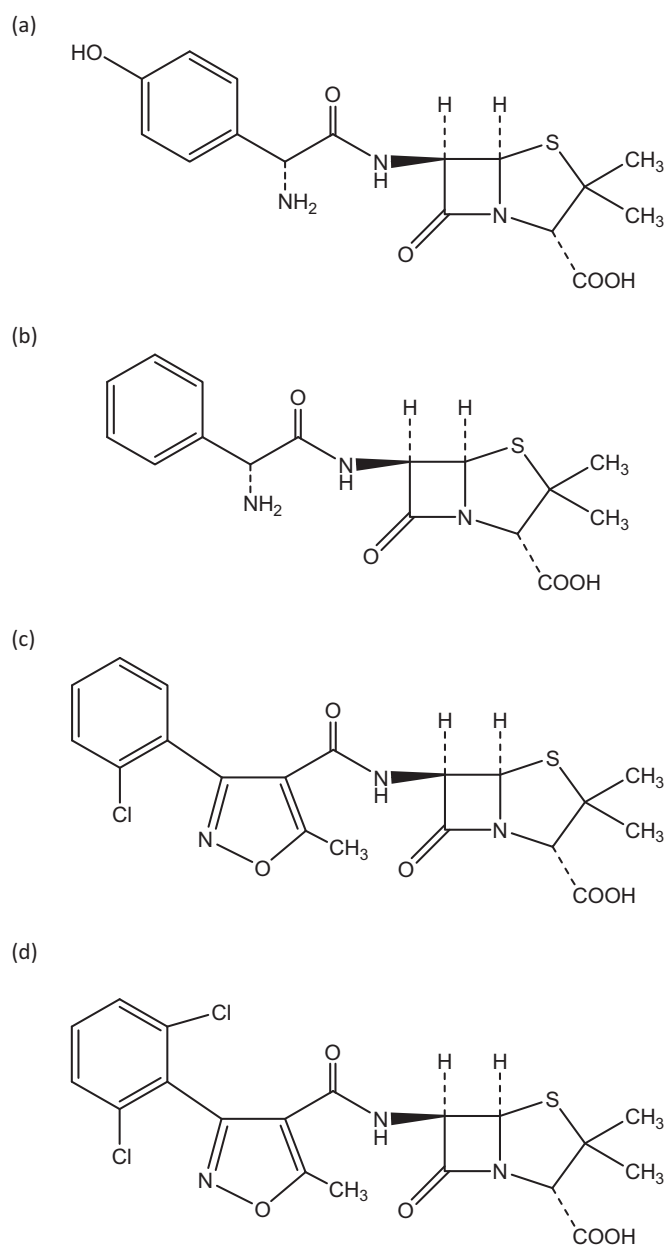


Fig. 1. Chemical structures of amoxicillin (a), ampicillin (b), cloxacillin (c) and dicloxacillin (d).

[6]. High-performance liquid chromatography (HPLC) is currently the most widely used technique for analysing antibiotics because it combines specificity with sensitivity, reproducibility and cost-effectiveness. Although this technique has been mainly applied to the analysis of amoxicillin, the simultaneous analysis of a range of penicillins has also been developed.

Several HPLC methods have been reported for the determination of AMO [7–20], AMP [11–23], CLO [11–17,19,21,24–26] and DIC [11–16,20,23–27] in biological fluids (serum, plasma, and urine), pharmaceutical formulations, food products of animal origin, among others. UV, fluorometric, electrochemical and, in some cases, mass spectrometry detection have been used. The sample preparation techniques reported for plasma or serum include deproteinisation [12,23] and extraction [8,9,11,13,14,18]. Few methods describe pre-column [15,26] or post-column derivatisation [10] with fluorescent detection, or photochemical degradation

[24] with the electrochemical detection of penicillins. Moreover, other methods have been established for the analysis of penicillins in pharmaceuticals [7,12,28,29], biological fluids [29,30] and food products [31–33]. Penicillins have also been analysed by capillary electrophoresis [34–37] and micellar electrokinetic capillary chromatography [38,39].

Drug analysis has been greatly enhanced through HPLC technology. However, the assay of drugs in physiological fluids presents many problems. Frequently, drugs are at a very low concentration, strongly bound to proteins and in a complex matrix where interference from numerous endogenous compounds is expected. The high-molecular-mass proteins in these samples are particularly troublesome since they tend to denature and precipitate in the injection valve or at the column head. This clogs the system, and leads to a rapid degradation of chromatographic performance and an increase in back-pressure system. Several approaches have been adopted to facilitate sample preparation for physiological fluids. One simple approach is to precipitate proteins by organics or sodium hydroxide, or to remove them by ultrafiltration. More often than not, other separation steps are required such as liquid–liquid or solid-phase extraction from the matrix, re-extraction and evaporation. All these procedures are time-consuming, require lots of repetitive work, and possibly allow the introduction of additional sources of error because of the incomplete recovery of drugs. An additional problem of extraction processes that should be considered is the use and disposal of toxic solvents and chemicals, which are dangerous not only to the analyst, but also to the environment. By way of example, Baranowska et al. [15] transferred 0.75 mL of human urine sample to a volumetric flask (10 mL), and then sodium hydroxide was added to adjust the required pH. The solution was then mixed with 1.5 mL acetonitrile and 1.5 mL methanol. Next, it was completed to the mark by adding water. After shaking for 1 min, the sample was transferred to a centrifuge tube and centrifuged for 15 min at 6500 rpm. Finally, the clear supernatant was injected directly into the HPLC column.

Micellar liquid chromatography (MLC), which uses a surfactant solution as the mobile phase and whose concentration is above the critical micellar concentration, is an alternative to conventional HPLC. MLC allows the analysis of complex matrices without the aid of extraction since micelles tend to bind proteins competitively, thus leading to protein-bound drugs and proteins. Proteins are solubilised and harmlessly washed away with the solvent front instead of being precipitated into the column. Several selected studies show the use of MLC with direct injection when applied to the determination of drugs in pharmaceuticals [40], serum [41] and urine [42]. The proposed method permits the direct injection of the sample without the need for an extraction step to precipitate the proteins, thus avoiding analyte loss, time-consuming practices and, consequently, lowering the procedure cost.

The purpose of this study was to develop and validate a new MLC method for the simple, rapid and specific determination and quantification of four penicillins (AMO, AMP, CLO and DIC) in biological fluids and pharmaceutical formulations. The method was validated according to the Food and Drug Administration (FDA) guideline [43]. The objective of developing such a method is to apply it to routine analyses in the quality control process of pharmaceutical samples and in pharmacokinetic studies.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Amoxicillin and ampicillin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Cloxacillin and dicloxacillin were obtained from MP Biomedicals (Solon, Ohio, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS)

was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dihydrogen phosphate and 1-propanol came from Scharlab (Barcelona, Spain). Hydrochloric acid and ethanol were obtained from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Ultrapure water was used throughout (Millipore S.A.S., Molsheim, France). The pharmaceuticals were purchased in a local Spanish pharmacy, except Pathocil which was directly supplied by Sandoz (Princeton, New Jersey, USA).

2.2. Instrumentation

The analytical balance used was an AX105 Delta-Range (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). A vortex shaker and sonication unit (Selecta, Barcelona) were employed for sample pretreatment. The pH of the solutions was measured with a potentiometer model GLP22 (Crison, Barcelona) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode. The chromatographic system (Agilent Technologies, Series 1100, Palo Alto, CA, USA) was equipped with a quaternary pump, thermostatted autosampler tray and column compartments, and a diode-array detector (range 190–700 nm). Several columns were assayed: Zorbax C18, Kromasil C18 and Hypersil Phenyl (Scharlab), all of which were the same size (150 mm × 4.6 mm) and with a 5- μ m particle size.

2.3. Preparation of the mobile phase, standard and urine samples

The micellar mobile phases were prepared by dissolving SDS in ultrapure water, and they were buffered with 0.01 M sodium dihydrogen phosphate at pH 3 using diluted hydrochloric acid. Finally, propanol was added to obtain the desired concentration of the organic solvent to be then topped up with ultrapure water to the mark on the volumetric flask. All the mobile phases were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Micron Separations, Westboro, MA, USA).

Individual stock solutions of 50 μ g mL⁻¹ of each antibiotic (AMO, AMP, CLO and DIC) were prepared by dissolving each one in a few millilitres of ethanol with the aid of an ultrasonic bath, and were finally topped up with 0.05 M SDS solution at pH 3.

Urine samples were collected in a Urine Collection Cup (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK). For optimisation purposes, urine stock solutions spiked with 50 μ g mL⁻¹ of the four penicillins were prepared by diluting urine by a 1:50 factor with 0.05 M SDS at pH 3. In the method validation, different blank urine samples were spiked at different concentrations (e.g., in the calibration curve, accuracy and precision, etc.), and were afterwards diluted to a 1:50 factor prior to the analysis. Thus, a simulation of a real situation is achieved. Solutions were prepared daily, protected from direct light and stored at 4 °C until use.

Patients' urine samples were injected directly into the chromatographic system after the aforementioned dilution with the surfactant solution. All the samples were filtered directly into the autosampler vials through 0.45 μ m nylon membranes before their analysis.

2.4. Chromatographic conditions

Separation was performed in a reversed phase Zorbax C18 column (Scharlab) (150 mm × 4.6 mm, 5- μ m particle size) thermostatted at 25 °C. The composition of the selected mobile phase was 0.11 M SDS–6% (v/v) propanol–0.01 M NaH₂PO₄ buffered at pH 3. The flow rate, injection volume and UV wavelength were 1 mL min⁻¹, 20 μ L and 210 nm, respectively. Under these conditions, the complete analysis time was less than 16 min. Chromatographic signals were acquired and processed with an Agilent ChemStation (Rev. B.03.01). The measurement of the peak properties and the optimisation of mobile phase composition were assisted by the Michrom software [44].

2.5. Sample preparation for pharmaceutical formulations determination

The pharmaceuticals analysed were tablets and enteric-coated capsules containing from 250 to 875 mg of the corresponding penicillin and excipients. The average weight per tablet/capsule content was calculated from 10 units. The tablet or capsule content was ground and reduced to a homogeneous fine powder in a mortar. Several portions of this powder were accurately weighed and sonicated in the presence of ethanol (5%, v/v, of the final content) in an ultrasonic bath. A 0.05 M SDS solution at pH 3 was added to favour the extraction of the analyte, for which the ultrasonic bath was used. A dilution was then made with the micellar solution at a final antibiotic concentration of 20 μ g mL⁻¹. Since the excipients in the tablets and capsules were not soluble in the micellar medium, sample solutions were filtered through 0.45 μ m nylon membranes before being injected into the chromatographic system.

3. Results and discussion

3.1. pH selection of the mobile phase

The structures of the investigated antibiotics are shown in Fig. 1. As this figure depicts, AMO and AMP are cationic under acidic conditions because of the protonation of the amine group, zwitterionic in the neutral medium given the protonation of the amine group and the deprotonation of the carboxylic acid group, and anionic under basic conditions due to the deprotonation of the carboxylic acid group. However, CLO and DIC are neutral at acidic pH values and anionic at basic pH values.

It should be taken into account that the stability of penicillins greatly depends on pH, and their maximum stability tends to be in the region of pH 6.0–7.0 [45]. Thus, the pH of the mobile phase should be in this range. However, the retention factor of the four compounds under study lowered when the pH of the mobile phase increased, and eluted at the dead volume at pH 7 (data not shown) because of the repulsion between the negatively charged antibiotics and the anionic surfactant. Thus, pH 3 was finally selected since the best resolution and adequate retention times were obtained for all four compounds. The next step was to study the stability of the antibiotics in this medium.

3.2. Antibiotics stability

Most penicillins are practically unstable under strong acidic conditions since their molecules are subject to several hydrolytic reactions, while the structural identity of their molecules are maintained under neutral or alkaline conditions. However, and as commented above, only the mobile phases buffered at pH 3 provide an adequate control on the retention of penicillins, and their stability should be checked under these conditions. To assess the stability of penicillins after sample preparation, blank urine samples were spiked with AMO, AMP, CLO and DIC. Stability was investigated at pH 3 at room temperature and at low temperature (4 °C) using the mobile phase 0.11 M SDS–6% propanol. Degradation of AMO, AMP, CLO at pH 3, after two days of storage, was confirmed by the new peaks overlapped with the peaks of the analytes that emerged in the chromatograms. DIC, however, decomposed at only 3 h after preparation. All the solutions were prepared freshly on a daily basis and kept at a low temperature (4 °C) until required. Penicillin solutions were analysed immediately after preparation and at selected time intervals after storage throughout the study period. After 6 h, 24 h and 42 h at 4 °C temperature, the decompositions of AMO, AMP, CLO and DIC were 0%, 1% and 35%; 0%, 0.2% and 18%; 1%, 10% and 30%; and 53%, 74% and 78%, respectively. Furthermore, decomposition

Table 1
Chromatographic parameters (retention factors, k , efficiencies, N and asymmetry factors, B/A) obtained for the penicillins in the Kromasil and Zorbax columns.

SDS (M)	Propanol (% v/v)	AMO			AMP			CLO			DIC		
		k	N	B/A	k	N	B/A	k	N	B/A	k	N	B/A
Kromasil C18													
0.05	2.5	12.0	1100	1.2	15.9	700	1.4	9.4	2000	0.8	20.5	200	1.3
0.05	12.5	6.9	200	1.9	13.1	100	1.4	6.8	200	1.1	10.8	800	1.5
0.1	7.5	3.6	400	1.4	12.5	1000	1.2	6.2	700	1.4	8.2	800	1.4
0.15	2.5	3.8	800	1.2	14.2	1100	1.1	9.6	1000	1.1	12.5	900	1.2
0.15	12.5	2.1	70	2.3	7.8	700	1.5	3.3	300	1.4	4.4	500	1.4
Zorbax C18													
0.05	2.5	6.4	1100	1.1	29.3	2200	1.1	17.1	1900	1.1	23.8	1300	1.2
0.05	7.5	4.3	2600	1.7	21.6	900	0.9	4.3	700	1.3	8.8	900	1.1
0.1	5	2.4	1600	1.8	11.1	500	1.8	5.6	300	1.9	8.0	500	1.7
0.15	2.5	2.1	500	1.4	8.2	800	1.4	5.9	800	1.3	7.8	800	1.3
0.15	7.5	1.7	1300	1.0	6.2	800	1.5	2.8	300	1.1	3.9	400	1.5

between 5% (AMP) and 90% (DIC) was observed at room temperature after 3 h, which was confirmed by a new overlapping peak emerging in the chromatogram. Under such conditions, samples should be analysed within 3 h. Urine samples may be stored for several weeks at -20°C with no noticeable degradation.

3.3. Chromatographic optimisation: column and mobile phase selection

Three columns (Kromasil C18, Zorbax C18 and phenyl) were tested to select the best analysis conditions. The following characteristics were common for all the columns: pore size (100 Å), particle size (5 μm), and length and internal diameter (150 mm \times 4.6 mm). C18 stationary phases are still the most popular and most widely used silica-based packages for reversed-phase liquid chromatography thanks to their ability to separate a wide range of solutes with good resolution, selectivity and column efficiency. Phenyl-type stationary phases have proven useful for the separation of species in which π - π interactions may be exploited during the retention process. This is the particular case of highly aromatic compounds.

Modification of the stationary phase by an adsorbed surfactant can have profound implications with regard to retention, efficiency and asymmetry in MLC. In addition, most analytical procedures require the addition of an organic solvent, which lowers retention times and increases peak efficiencies. A short-chain alcohol, such as propanol, butanol or pentanol, is normally employed. In this case, propanol was selected as it allows the complete resolution of the four compounds in an adequate analysis time. The AMO peak and the protein band were fully resolved when propanol was used. However, when butanol or pentanol are employed, an overlapping of the penicillin peaks with those of the urine matrix can be expected. It is important to note that the selection of alcohol is directly related to the polarity of the studied compounds.

The stock standard and urine stock solutions of the four penicillins were injected into the selected columns using hybrid micellar mobile phases at different SDS and propanol concentrations. The retention factors (k), efficiencies (N) and asymmetry factors (B/A) obtained are summarised in Table 1. The results of the phenyl column are not shown since several compounds did not elute in most of the mobile phases assayed. Thus, this column was disregarded. It can be observed that the retention factors of the antibiotics decreased when the surfactant and the organic solvent concentrations increased. Thus, two optimisation processes were then carried out: one for the Kromasil C18 column and another for the Zorbax C18 column.

An interpretive optimisation strategy was followed to select the most adequate column and the best surfactant and organic solvent concentrations for the simultaneous analysis of the four penicillins.

The experimental design consisting in five mobile phases (four located in the corners of a rectangular factor space and the fifth in its centre) buffered at pH 3 was used to examine the chromatographic behaviour of the four antibiotics. Thus, for the Kromasil column they were injected into the following compositions of SDS (M)–propanol (%): 0.05–2.5, 0.05–12.5, 0.10–7.5, 0.15–2.5 and 0.15–12.5. These concentration ratios were selected for the purpose of avoiding excessive retention times or elution near the void volume. However, the maximum concentration of propanol for the Zorbax column was 7.5% instead of 12.5%, because the elution for all the penicillins was close to the dead time when working at a propanol concentration above 7.5%, which introduces a high error in the predictions of the later modelling step. The chromatographic data obtained (k , N and B/A) were processed with the Michrom software [44]. This software enables any changes in the chromatograms to be graphically depicted when the user progressively varies the concentration of the surfactant and organic solvent. The retention of the compounds was modelled according to [46]:

$$k = \frac{K_{AS}(1/1 + K_{AD}\varphi)}{1 + K_{AM}((1 + K_{MD}\varphi)/(1 + K_{AD}\varphi))[M]} \quad (1)$$

where $[M]$ and φ are the concentrations of the surfactant and the modifier, respectively; K_{AS} and K_{AM} correspond to the equilibria between the solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; K_{AD} , K_{SD} , and K_{MD} measure the relative variation in the concentration of solute in bulk water, stationary phase and micelles, respectively, given the presence of the modifier, as compared to a pure micellar solution (with no modifier).

A global resolution criterion based on the equations developed by Lapasió et al. [47] was used to predict the chromatograms. This criterion measures the non-overlapped fractions for each individual peak and facilitates the understanding of the information obtained in the optimisation process. Different regions of the variable space are often associated with different critical peak-pairs. Thus, the resolution of a multicomponent mixture requires an analysis that involves all the components in the whole variable space. Inspection of the contour maps of global resolution will allow the robustness of the optimum to be evaluated.

Fig. 2a and b show the contour maps of the resolution for the antibiotics when injected into the Zorbax or the Kromasil columns, respectively. They were drawn using the chromatographic data (k , N , and B/A) obtained with the five mobile phases indicated above. For the Kromasil C18 column, most of the penicillin peaks overlapped with the urine protein band and/or the endogenous compounds at several mobile phase compositions, giving rise to a poor resolution in almost all the space defined by the variables (Fig. 2b). Only a small region was suitable for the separation of compounds, while complete baseline separation was not possible. Furthermore, several inversions in the elution order of the com-

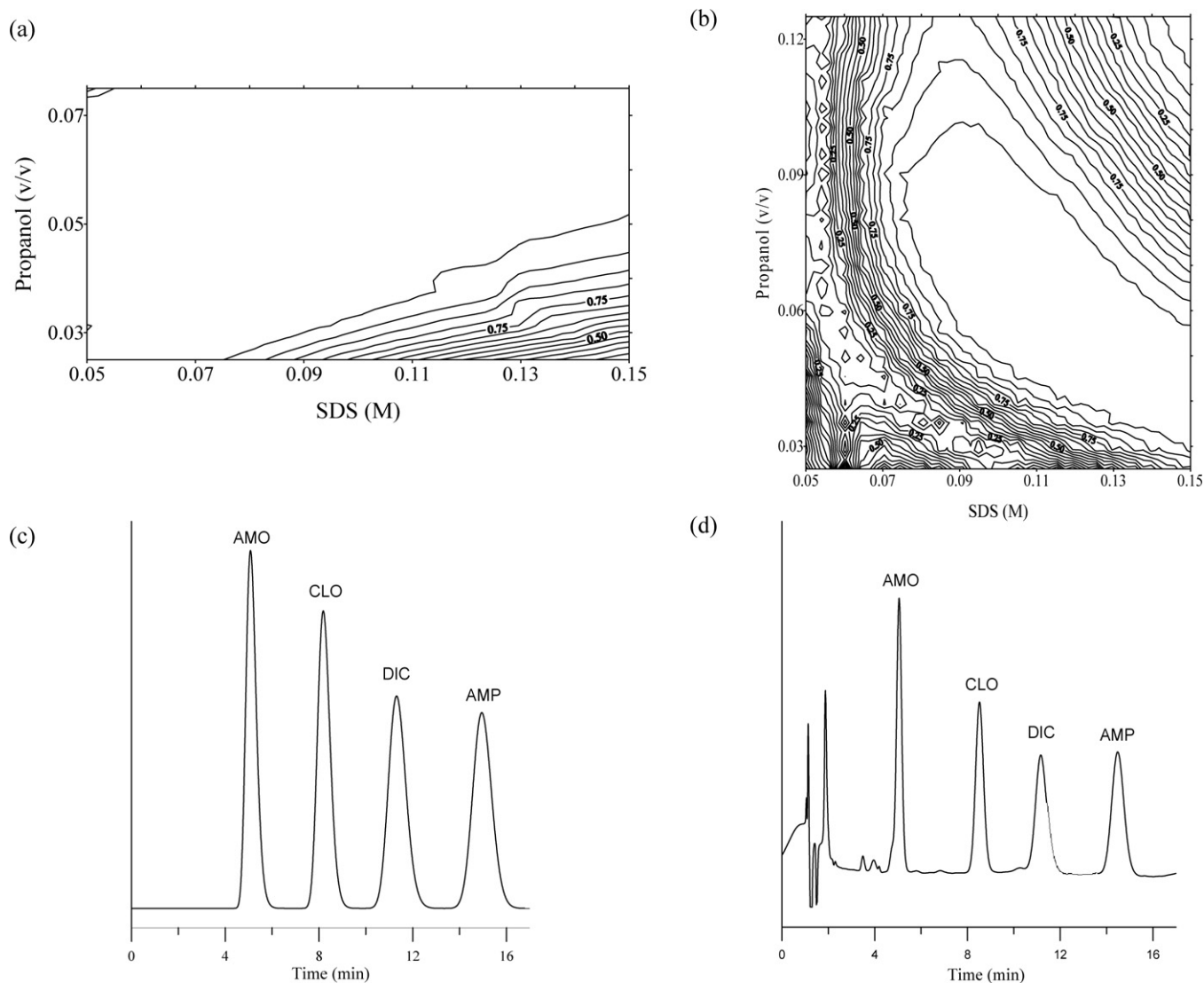


Fig. 2. Contour maps of global resolution for the separation of the four antibiotics using the Kromasil (a) or Zorbax column (b); simulated (c), and real chromatograms (d) for a mixture of AMO, AMP, CLO and DIC ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Mobile phase: 0.11 M SDS–6% propanol–pH 3, flow rate: 1 mL min^{-1} , UV detection at 210 nm.

pounds were observed throughout the factor space when both the surfactant and the organic solvent concentrations were changed (e.g., AMO and AMP on the one hand, and CLO and DIC on the other). Regarding the Zorbax C18 column, adequate retention times and efficiencies were obtained for the four compounds with no interferences by the urine matrix. In this case, the elution order of the antibiotics was the same in the whole variable space. Fig. 2a indicates that optimum resolution (values near one) is obtained for a broad region of SDS and propanol concentrations, which is scarcely modified except in two regions, which dramatically decrease due to an overlapping between peaks: (a) in a very narrow space at a low SDS concentration (0.05 M) and a high alcohol concentration (7.5%) where AMO and CLO overlapped; (b) in a space limited for the SDS concentrations between 0.075 M and 0.15 M, and up to 5% propanol, where DIC and AMP fully overlapped, or even a partial overlapping among AMP, CLO, and DIC occurs. Since the Zorbax column provides the best robustness (a major region where the compounds can be fully resolved at the baseline level), it was selected for further work.

A mobile phase of 0.11 M SDS–6% propanol–0.01 M NaH_2PO_4 at pH 3 was selected to analyse the antibiotics since it permitted their determination with analysis times below 16 min with good chromatographic resolution ($R = 0.993$). No interferences by the protein band or endogenous compounds were observed. The chromato-

graphic parameters (k , N and B/A) obtained with this mobile phase for the antibiotics were: 2.4, 1600 and 1.4; 11.1, 800 and 1.8; 5.6, 800 and 1.8; and 8.0, 800 and 1.7 for AMO, AMP, CLO and DIC, respectively. Fig. 2c shows the simulated chromatogram for the mixture of the four penicillins in the optimum mobile. The agreement between the simulated and experimental chromatograms is quite good (Fig. 2c and d).

3.4. Urine blank behaviour

The background signal of the urine samples, due to the proteins (wide band at the head of the chromatograms) and several endogenous compounds (peaks at diverse retention times), can seriously affect the detection of the antibiotics. However, diluting the urine sample before its injection reduced the width of the protein band and of some endogenous peaks, thus allowing the detection of those drugs that could overlap in the original sample, while also benefiting the column by increasing its useful life.

Several urine blanks were injected directly into the micellar chromatographic system after suitable dilution with a view to assessing the background signal. For all the penicillins, the sensitivity achieved after dilution in a 1:50 factor was adequate for their detection in urine, at least up to 12–14 h post-ingestion of the

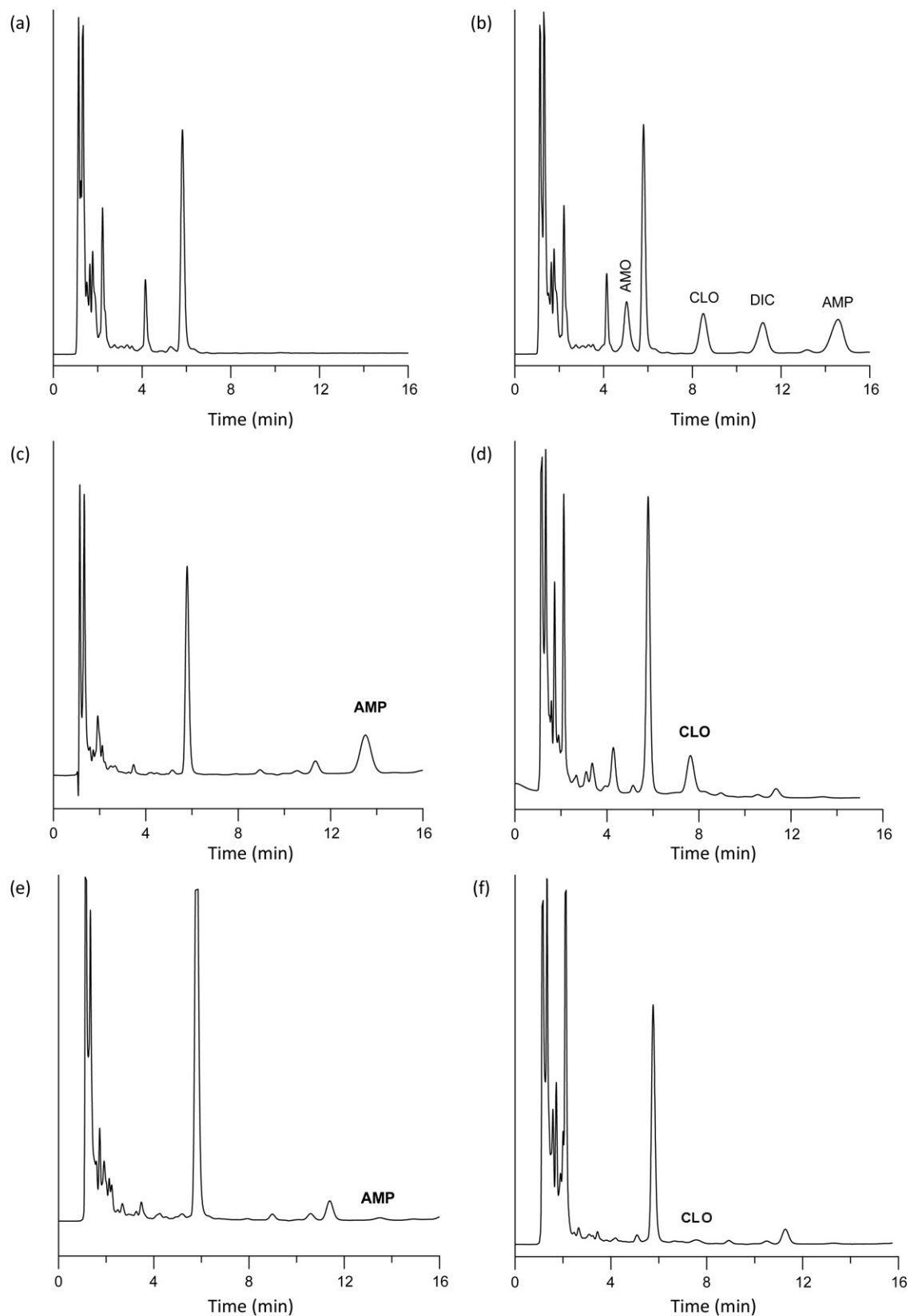


Fig. 3. Chromatograms of (a) urine blank, (b) urine spiked with the four penicillins ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$); (c) AMP and (d) CLO excreted in urine as an unchanged drug 2 h after oral ingestion; and (e) AMP and (f) CLO excreted 12 h after oral ingestion. All the samples were diluted at the 1:50 factor with 0.05 M SDS-pH 3. See Fig. 2 for the chromatographic conditions.

antibiotics. The profiles of both the protein band and the endogenous compounds for all the samples were similar to those shown in Fig. 3a. No additional peaks were found in the subsequent analyses. These results are compatible with routine analysis requirements.

3.5. Method Validation

The Food and Drug Administration (FDA) guideline was followed to validate the method [43]. The parameters evaluated were selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), precision and accuracy, recovery and robustness.

3.5.1. Selectivity

Six drug-free urine samples were selected as the controls and processed directly in the chromatographic system after convenient dilution. They were then analysed to determine the extent to which the endogenous components may contribute to interfere with the drug's retention time. No interference by the endogenous compounds at the penicillins' retention times was noted in the physiological matrices studied when the drug-free urine samples were compared with a urine-spiked sample (Fig. 3a and b).

3.5.2. Linearity

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks obtained at eight different concentrations (six replicates) in the range of 0.05–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the four penicillins and in the micellar media (standard calibration curve using only standard solutions) and urine (1:50 dilution factor). Calibration curves were constructed using the same amount of urine (blank), and afterwards different concentrations of the antibiotics were added. Thus, the matrix proportion was the same in the whole linear range studied. To study the variability of the calibration parameters, curves were obtained for 5 days over a 2-month period for a different set of standards. The slopes and intercepts were determined by the least-squares linear regression analysis method. The results in both matrices were similar (relative errors were below 1% in all cases). The correlation found was linear for all the antibiotics in the studied range of concentrations. The adjusted equations, determination coefficients (R^2) and coefficient variations (%) of the calibration slopes for each penicillin in urine are:

Amoxicillin	$y = 0.589x + 0.018$	$R^2 = 0.994$	CV(%) = 1.6
Ampicillin	$y = 0.557x - 0.034$	$R^2 = 0.997$	CV(%) = 1.2
Cloxacillin	$y = 0.436x - 0.031$	$R^2 = 0.994$	CV(%) = 6.7
Dicloxacillin	$y = 0.436x - 0.032$	$R^2 = 0.994$	CV(%) = 1.6

3.5.3. Limits of detection and quantification

The LODs for AMO, AMP, CLO and DIC in micellar and urine samples ($n = 10$) were determined with the $3s$ criterion ($3s/b$) [43] (three times the standard deviation of the lowest concentration solution included in the calibration divided by the slope of the calibration curve) using a series of 10 solutions of a low concentration. The results are based on not only the standard deviation of the response, but the slope of a specific calibration curve containing the analyte. The LODs (ng mL^{-1}) calculated from the standard calibration curve (prepared in SDS) and the urine calibration curve were: 1.5/4, 3.7/4.4, 10.4/10.4, and 11/15 for AMO, AMP, CLO and DIC, respectively. The LOQs for the four compounds in both matrices were selected as the lowest concentration used in the calibration curve (50 ng mL^{-1}).

3.5.4. Precision and accuracy

The intra- and inter-day precisions of the method were determined over a range of 0.5–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for all four penicillins in micellar media and urine-SDS (1:50 dilution factor) at four different concentrations. The results in both matrices were similar. The intra-day analysis was determined by injecting these test solutions six times on the same day, while the inter-day analyses correspond to the average of five measurements of the intra-day values taken on 5 days over a 3-month period performed by different analysts and equipment at the same four concentrations. Assay precision was assessed by expressing the SD (standard deviation) of the repeated measurements as a percentage of the mean value. Accuracy was investigated by comparing the concentrations of the measured peaks as calculated from the calibration lines by the linear regression analysis versus the nominal (added) concentration. The data show good precision (expressed as relative standard deviation, RSD, %) and accuracy (expressed as relative error, E_r , %) for this method, with values below 6% and 9% for all four analytes in urine-SDS, respectively (Table 2). Thus, these results prove to be good enough for routine analyses.

3.5.5. Robustness

In order to study the robustness of the method, six replicates of the standard solution of each penicillin at 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were injected into the chromatographic system in a set of mobile phases, where the following parameters were slightly changed: SDS concentration, propanol (%), flow rate, and pH. The results shown in Table 3 indicate that the slight variations to these parameters do not significantly alter the retention factor or the peak area of the compounds under study (average RSD \approx 6%). As expected, flow rate is the

Table 2

Intra-day ($n = 6$) and inter-day (over a period of five consecutive days) precisions, and accuracy data for the determination of the examined penicillins in spiked urine samples.

Analyte	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intra-day			Inter-day		
		Found (mean \pm SD) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	E_r (%)	Intra-day RSD (%)	Found (mean \pm SD) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	E_r (%)	Inter-day RSD (%)
AMO	0.5	0.522 \pm 0.007	4.4	1.3	0.517 \pm 0.008	3.4	1.5
	1	0.955 \pm 0.021	4.5	2.2	0.94 \pm 0.03	6.0	3.2
	5	4.89 \pm 0.19	2.2	3.9	4.94 \pm 0.08	1.2	1.6
	10	10.36 \pm 0.06	3.6	0.6	10.6 \pm 0.4	6.0	3.8
AMP	0.5	0.525 \pm 0.018	5.0	3.4	0.534 \pm 0.013	6.8	3.6
	1	0.926 \pm 0.018	7.4	1.9	0.918 \pm 0.011	8.2	1.2
	5	5.22 \pm 0.23	4.4	4.4	5.3 \pm 0.3	6.0	5.7
	10	9.82 \pm 0.06	1.8	0.6	10.2 \pm 0.6	2.0	5.9
CLO	0.5	0.519 \pm 0.010	3.8	2.0	0.533 \pm 0.019	6.6	3.6
	1	0.933 \pm 0.016	6.7	1.7	0.96 \pm 0.03	4.0	3.1
	5	4.62 \pm 0.07	7.6	1.5	4.84 \pm 0.23	3.2	4.8
	10	10.827 \pm 0.012	8.3	0.1	10.4 \pm 0.5	4.0	4.8
DIC	0.5	0.518 \pm 0.011	3.6	2.1	0.541 \pm 0.020	8.2	3.7
	1	0.93 \pm 0.03	7.0	3.2	0.97 \pm 0.03	3.0	3.1
	5	5.28 \pm 0.04	5.6	0.7	5.3 \pm 0.3	6.0	5.7
	10	10.63 \pm 0.11	6.3	1.0	10.61 \pm 0.14	6.1	1.3

Table 3
Robustness evaluation of the developed MLC method.

Chromatographic changes	Level	AMO		AMP		CLO		DIC	
		t_R (min)	Area	t_R (min)	Area	t_R (min)	Area	t_R (min)	Area
A: Flow rate (mL/min)									
0.9	-0.1	5.2	3.02	14.6	3.11	8.4	1.96	11.1	1.3
1	0	4.6	3.10	13.1	3.11	7.5	1.92	10.1	1.5
1.1	+0.1	4.6	2.94	11.9	3.11	7.3	2.13	9.2	1.4
Mean \pm SD		4.8 \pm 0.3	3.02 \pm 0.08	13.2 \pm 1.4	3.1 \pm 0.0	7.7 \pm 0.6	2.00 \pm 0.11	10.1 \pm 1.0	1.42 \pm 0.12
RSD (%)		6.3	2.6	10.6	0.0	7.8	5.5	9.9	8.4
B: SDS (M)									
0.105	-0.005	4.7	2.88	13.5	3.16	8.7	1.82	11.2	1.6
0.11	0	4.6	3.10	13.1	3.11	7.5	1.92	10.1	1.5
0.115	+0.005	4.5	2.88	13.1	3.30	7.3	1.67	9.5	1.6
Mean \pm SD		4.63 \pm 0.11	2.99 \pm 0.06	13.23 \pm 0.23	3.15 \pm 0.04	7.8 \pm 0.7	1.81 \pm 0.12	10.3 \pm 0.9	1.37 \pm 0.03
RSD (%)		2.4	2.0	1.7	1.3	9.0	6.6	8.7	2.2
C: Propanolol (% v/v)									
5.9	-0.1	4.4	3.09	13.0	3.16	7.6	1.98	10.0	1.56
6	0	4.6	3.10	13.1	3.11	7.5	1.92	10.1	1.55
6.1	+0.1	4.5	2.96	13.1	3.22	7.2	1.93	9.5	1.63
Mean \pm SD		4.51 \pm 0.12	2.99 \pm 0.06	13.07 \pm 0.06	3.14 \pm 0.03	7.43 \pm 0.21	1.95 \pm 0.06	9.9 \pm 0.3	1.37 \pm 0.03
RSD (%)		2.7	2.0	0.5	1.0	2.8	3.1	3.0	2.2
D: pH									
2.9	-0.1	5.2	3.08	13.6	3.07	7.1	1.99	10.0	1.54
3	0	4.6	3.10	13.1	3.11	7.5	1.92	10.1	1.55
3.1	+0.1	4.2	3.04	11.4	3.02	7.3	1.96	8.6	1.48
Mean \pm SD		4.7 \pm 0.5	3.07 \pm 0.03	12.7 \pm 1.2	3.07 \pm 0.04	7.3 \pm 0.2	1.85 \pm 0.12	9.6 \pm 0.8	1.34 \pm 0.07
RSD (%)		10.6	1.0	9.4	1.3	2.7	6.5	8.3	5.2

parameter that modifies the retention times or peak areas to the greatest extent (average RSD \approx 8.7%) because the conditions of this parameter were changed by $\pm 10\%$, and this variation could be significant for some of the studied compounds. A variation of $\pm 5\%$ to the flow rate conditions could prove more appropriate, and would originate lower RSD values.

3.5.6. Analysis of the marketed pharmaceutical formulations

Calibration curves were constructed as shown in Section 3.5.2. Ten commercial pharmaceuticals containing AMO, AMP, CLO and DIC were analysed, most of which are prescribed in Spain (Table 4). Ten samples of each pharmaceutical formulation were analysed, and six replicate injections were performed to obtain average antibiotic concentration values. Table 4 provides the declared and found contents, together with the label claim percentages, which are around 102.2%, while the residual standard deviations fall in the 0.07–1.8% range. Excellent accuracy (0.4–5.2%) and precision (0.1–2.4%) are observed for all the drug formulations. The results are in agreement with the manufactures' declared contents. The excipients were non-soluble, and were removed from the solution by filtration to prevent them from interfering in the analysis.

3.5.7. Determination of spiked biological samples

Recoveries of the four penicillins were determined by spiking the drug-free urine samples (1:50 factor dilution) with solutions of 0.05 M SDS at pH 3 containing known amounts of the drug at four different concentrations (0.5, 1, 5 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). For

comparative purposes, recoveries were also obtained in the SDS solutions. Spiked samples were processed and analysed following the procedure described above. Absolute recovery was measured by comparing the peak area of the spiked urine matrices with the non-spiked urine samples. The mean recovery rates for AMO were 100.2% in SDS and 104.6% in urine; for AMP, 100.2% in SDS and 102% in urine; for CLO, 99.0% in SDS and 99.2% in urine; and finally for DIC, 102.1% in SDS and 104.2% in urine. The data obtained show satisfactory recoveries for all four penicillin antibiotics.

It should be pointed out that the results in Sections 3.5.4 and 3.5.7 were obtained from two different and independent sets of experiments. Accuracy and precision were calculated using a batch of urine-spiked solutions with the penicillins, and the recovery data were obtained from a completely new batch, both prepared on different days. Intra- and inter-day precisions and accuracy values were performed and obtained over 5 days during a 3-month period, and recoveries were calculated on the same day by injecting the corresponding solutions several times and then calculating the average. The same concentrations were used in these sections. Sometimes accuracy and recovery are obtained from the same experiment, but we preferred to perform these studies independently to prove the usefulness of the developed procedure.

3.5.8. Drug control in real samples

Finally, the procedure was applied in pharmacokinetic studies of urine samples to demonstrate its usefulness. Urinary studies were conducted following the oral administration of three independent

Table 4
Precision and accuracy data from analysing the penicillins in drug formulations ($n=6$).

Pharmaceutical (laboratory)	Composition (mg)	Found (mg)	Label claim (%)	E_r (%)	RSD (%)
Amoxicillin Normon (Laboratorios Normon, Spain)	Amoxicillin (875), excipients (tablet)	878.4 \pm 0.6	100.4	0.4	0.1
Amoxicillin Ratiopharm (Ratiopharm España, Spain)	Amoxicillin (750), excipients (tablet)	786.4 \pm 2.2	104.9	4.9	0.3
Amoxicillin Cinfa (Laboratorios Cinfa, Spain)	Amoxicillin (500), excipients (capsule)	517.5 \pm 0.9	103.5	3.5	0.2
Amoxicillin Ardine (Laboratorio Reig Jofré, Sapin)	Amoxicillin (500), excipients (capsule)	496 \pm 3	99.2	0.8	0.6
Amoxicillin Sandoz (Sandoz farmacéutica, Spain)	Amoxicillin (500), excipients (tablet)	516.3 \pm 1.1	103.3	3.3	0.2
Ampicillin Britapen (Laboratorio Reig Jofré)	Ampicillin (500), Excipients (capsule)	526 \pm 11	105.2	5.2	2.1
Ampicillin Gobemicina (Laboratorio Normon)	Ampicillin (500), Excipients (capsule)	512 \pm 9	102.4	2.4	1.8
Cloxacillin Anaclosil (Laboratorio Reig Jofré)	Cloxacillin (500), Excipients (capsule)	505 \pm 9	101	1.0	1.8
Cloxacillin Orbenin (GlaxoSmithKline, Spain)	Cloxacillin (500), Excipients (capsule)	508 \pm 12	101.6	1.5	2.4
Pathocil (Sandoz Inc., USA)	Dicloxacillin (250), Excipients (tablet)	251.4 \pm 1.6	100.6	0.6	0.6

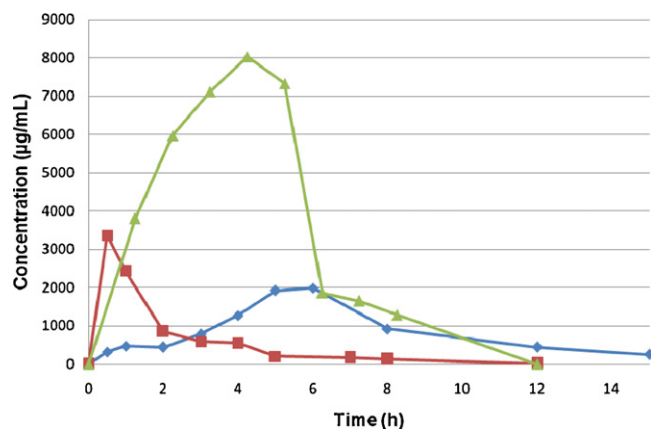


Fig. 4. Study of the urinary excretion of some penicillins after oral administration to healthy volunteers: AMO (▲), AMP (◆) and CLO (■). See Fig. 2 for the chromatographic conditions.

single doses of tablets containing 875 mg of AMO, 500 mg of AMP and 500 mg of CLO, respectively, to healthy volunteers. A sample was collected immediately before administering the drug to be used as a blank. Other urine samples were collected ten times a day, at appropriate times, and were refrigerated at +4 °C until analysed. Urine samples were diluted by the 1:50 factor, and injected directly into the chromatographic system with no treatments other than filtration. Fig. 4 shows the variation of the AMO, AMP, and CLO concentrations during urinary excretion, as determined in this work. The maximum AMO, AMP and CLO concentrations excreted in urine were found at 4 h, 6 h and 0.5 h after oral administration, respectively. The final quantity of AMO, AMP and CLO excreted after 6 h was 500 mg, 194 mg and 202 mg; that is, 57%, 39% and 40% of the ingested dose, respectively. These urinary excretion results are in agreement with bibliographical reports [3]. Fig. 3c and d reveal the chromatograms of AMP and CLO excreted 2 h after oral administration, while Fig. 3e and f depict the chromatograms of AMP and CLO excreted 12 h after oral administration. These results indicate that excretion studies can be performed under the proposed chromatographic conditions.

4. Conclusions

The MLC procedure described herein is useful to quantify four penicillins (amoxicillin, ampicillin, cloxacillin and dicloxacillin) with a total analysis time below 16 min. Compared to other methods developed for the determination of penicillins in urine samples, micellar mobile phases are less flammable, less expensive, less toxic, biodegradable, and can co-solubilise hydrophobic and hydrophilic analytes in this kind of matrices. The elution of hydrophobic and hydrophilic analytes in the same MLC run is possible without a gradient elution. One advantage of this procedure is the possibility of injecting urine samples directly into the chromatographic system with no previous treatment other than homogenisation, dilution and filtration, thus avoiding tedious extractions from matrices due to the solubilisation of proteins by the surfactant's micelles and monomers. The use of an interpretative optimisation strategy in MLC also makes it a more efficient and reliable mobile phase selection. The LOD values are in agreement with those reported in the literature and help to monitor these compounds in urine at therapeutic levels. However, urine was directly injected without a pre-treatment step, thus avoiding tedious extractions and possible sample loss. Validation was efficiently performed according to the FDA guideline with satisfactory results in the selectivity, linearity, precision, accuracy, recovery and

robustness studies. This procedure also allows pharmacokinetic studies to be conducted. Pharmaceutical formulations containing penicillins were analysed and obtained good claim percentages (around 100%). The results reveal that the procedure is sensitive enough for the routine analyses of antibiotics in both biological and pharmaceutical applications.

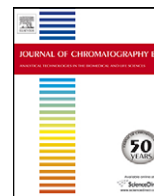
Acknowledgements

This work has been supported by project CTQ2007-64473/BQU funded by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). Maria Rambla-Alegre also wishes to thank the MEC for the FPU grant.

References

- [1] J.G. Hardman, L.E. Limbird, A.G. Gilman, Goodman and Gilman's the Pharmacological Bases of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, USA, 2001.
- [2] American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, USA, 1988.
- [3] Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, London, UK, 2004.
- [4] P.O. Erah, D.A. Barrett, P.N. Shaw, J. Chromatogr. B 705 (1998) 63.
- [5] D. Mainz, K. Borner, P. Koeppel, J. Kotwas, H. Lode, J. Antimicrob. Chemother. 50 (2002) 599.
- [6] M.A. Korany, M.H. Abdel-Hay, M.M. Bedair, A.A. Gazy, Talanta 36 (1989) 1253.
- [7] H. Liu, H. Wang, V.B. Sunderland, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 395.
- [8] M. Dousa, R. Hosmanova, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 373.
- [9] E. Benito-Peña, J.L. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 289.
- [10] H.J. Mascher, C. Kikuta, J. Chromatogr. A 812 (1998) 221.
- [11] W.A. Moats, R.D. Romanowski, J. Chromatogr. A 813 (1998) 237.
- [12] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1550.
- [13] M.I. Bailón-Pérez, A.M. García-Campaña, M. del Olmo-Iruela, L. Gámiz-Gracia, C. Cruces-Blanco, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8355.
- [14] L.K. Sorensen, L.K. Snor, T. Elkaer, H. Hansen, J. Chromatogr. B 734 (1999) 307.
- [15] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski, Anal. Chim. Acta 570 (2006) 46.
- [16] V.F. Samanidou, D.E. Giannakis, A. Papadaki, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1302.
- [17] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 406.
- [18] R. Fernández-Torres, M. Olías-Consentino, M.A. Bello-López, M. Callejón-Mochón, Talanta 81 (2010) 871.
- [19] S. Riediker, A. Rytz, R.H. Stadler, J. Chromatogr. A 1054 (2004) 359.
- [20] S. Ghidini, E. Zanardi, G. Varisco, R. Chizzolini, Food Addit. Contam. 20 (2003) 528.
- [21] C. Kukusamude, A. Santalad, S. Boonchiangma, R. Burakham, S. Srijaranai, O. Chailapakul, Talanta 81 (2010) 486.
- [22] E. Verdon, R. Fuselier, D. Hurtaud-Pessel, P. Couëdor, N. Cadieu, M. Laurentine, J. Chromatogr. A 882 (2000) 135.
- [23] B.C. McWhinney, S.C. Wallis, T. Hillister, J.A. Roberts, J. Lipman, J.P.J. Ungerer, J. Chromatogr. B 878 (2010) 2039.
- [24] S. Lihl, A. Rehorek, M. Petz, J. Chromatogr. A 729 (1996) 229.
- [25] V.F. Samanidou, S.A. Nisyriou, I.N. Papadoyannis, J. Sep. Sci. 30 (2007) 3193.
- [26] M. Marchetti, I. Schwaiger, E.R. Schmid, Fresenius J. Anal. Chem. 371 (2001) 64.
- [27] O. Alderete, D.F. González-Esquivel, L. Misael Del Rivero, N. Castro-Torres, J. Chromatogr. B 805 (2004) 353.
- [28] S. Joshi, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 795.
- [29] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1879.
- [30] A. Marzo, L. Dal Bo, J. Chromatogr. A 812 (1998) 17.
- [31] V.F. Samanidou, S.A. Nisyriou, I.N. Papadoyannis, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30 (2007) 1145.
- [32] G. Balizs, A. Hewitt, Anal. Chim. Acta 492 (2003) 105.
- [33] W.F. Smyth, Anal. Chim. Acta 492 (2003) 1.
- [34] M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, Electrophoresis 31 (2010) 229.
- [35] M.I. Bailón-Pérez, A.M. García-Campaña, M. del Olmo-Iruela, C. Cruces-Blanco, L.G. Gracia, Electrophoresis 30 (2009) 1708.
- [36] M.I. Bailón-Pérez, A.M. García-Campaña, C. Cruces-Blanco, M. del Olmo-Iruela, J. Chromatogr. A 1185 (2008) 273.
- [37] A. Thomas, O.K. Ukpoma, J.A. Inman, A.K. Kaul, J.H. Beeson, K.P. Roberts, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2008) 992.
- [38] Q. Zhang, N. Ye, X. Gu, X. Hao, N. Liu, Chin. J. Chromatogr. (Se Pu) 26 (2008) 682.
- [39] M.I. Bailón-Pérez, L. Cuadros-Rodríguez, C. Cruces-Blanco, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 746.
- [40] S. Carda-Broch, M.T. Gil-Agustí, M. Rambla-Alegre, I.I. Monferrer-Pons, J.S. Esteve-Romero, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 254.
- [41] J. Esteve-Romero, E. Ochoa-Aranda, D. Bose, M. Rambla-Alegre, J. Peris-Vicente, A. Martinavarro-Domínguez, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1557.
- [42] J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, D. Bose, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 75.

- [43] U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration, Guidance for Ind. Bioanal. Method Validation, 2001, www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf.
- [44] J.R. Torres-Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, New York, USA, 2000.
- [45] A.P. Kondrat'eva, V.P. Bruns, *Pharm. Chem. J.* 1 (1967) 696.
- [46] A. Berthod, M.C. García-Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, New York, USA, 2000.
- [47] J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.



Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection

Maria Rambla-Alegre*, Josep Esteve-Romero, Samuel Carda-Broch

Química Bionalítica, QFA, Universitat Jaume I, 12071 Castelló, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2009

Accepted 5 October 2009

Available online 9 October 2009

Keywords:

Quinolone
Direct injection
Micellar mobile phase
Urine
Antibiotics

ABSTRACT

A sensitive and robust method was developed and validated for the routine identification and quantification of five quinolones in urine samples directly injected into a micellar liquid chromatographic system without any pre-treatment step. Since the simultaneous elution of the five compounds was not resolved, two mobile phases have been proposed: (a) for ciprofloxacin and levofloxacin 0.15 M sodium dodecyl sulphate, 12.5% propanol and 0.5% triethylamine at pH 3.0 as the mobile phase and the detector at excitation wavelength 285 nm and emission wavelength 465 nm; and (b) for lomefloxacin, ofloxacin and moxifloxacin 0.05 M sodium dodecyl sulphate, 12.5% propanol and 0.5% triethylamine at pH 3.0 as the mobile phase and the detector at excitation wavelength 295 nm and emission wavelength 485 nm. Using these conditions, and in accordance with the food and drug analysis (FDA) guideline, the limit of quantification was 1 ng/mL, and the relative standard deviation and accuracy of the inter-day assay were 1.0–8.4% and 0.11–1.5%, respectively. Detection of the urinary excretion of four quinolones was followed up at 12 h after the healthy volunteers had taken the drug. No potential interference from metabolites was observed. This procedure permits the rapid and reproducible measurement of low levels of quinolones in a small amount of urine.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Quinolones are among the most important antibacterial agents used in human medicine. They are active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria through the inhibition of their DNA gyrase [1], are mainly used in the treatment of human and veterinary diseases, and are also very useful in preventing diseases in animals [2,3]. There is concern about the possibility of exposure to low levels of these compounds resulting in the development of resistance of human pathogens to antibiotics [4,5].

Several chromatographic methods have been reported for the determination of these compounds. High performance liquid chromatography (HPLC) has become an important tool for the routine determination of quinolones [6]. Several references about the determination of different quinolones by using HPLC with UV and/or fluorescence detection have been recently reported in biological fluids [7–11], food [12–14] and the environment [15,16]. Novel fluoroquinolones, such as moxifloxacin, have been also

analysed [17]. Chromatography coupled with ionization mass spectrometry has been reported for the analysis of quinolones in urine [18] and food [19,20]. Usually, it is a fast technique, but it requires complicated and expensive equipment, and a labour-intensive sample preparation procedure. Recently, capillary electrophoresis (CZE) methods have been developed for quinolones in biological and environmental samples [21,22].

Micellar liquid chromatography (MLC) is an attractive alternative to conventional HPLC methods using aqueous-organic mobile phases for the determination of drugs in physiological fluids with direct injection. MLC allows the analysis of complex matrices, usually without the aid of extraction [23,24] because micelles tend to bind proteins competitively, thereby releasing protein-bound drugs and proteins, thus considerably reducing the cost and analysis time. Proteins are solubilised in micellar media and washed harmlessly away to elute with the solvent front rather than precipitating into the column. In addition, MLC has proved to be a useful technique in urine analyses [25–28].

The aim of this work is the application of a rapid, sensitive and selective reversed-phase HPLC procedure with micellar mobile phases to determine ciprofloxacin, levofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin and moxifloxacin (Fig. 1) in urine samples using direct injection into two different sets of analytical conditions. The method has been validated according to Food and Drug Analysis (FDA) guidelines [29]. The procedure developed herein could also

* Corresponding author at: Àrea de Química Analítica, QFA, ESTCE, Universitat Jaume I, Av. Sos Baynat s/n 12071 Castelló, Spain. Tel.: +34 964 728099; fax: +34 964 728066.

E-mail address: mrambla@qfa.uji.es (M. Rambla-Alegre).

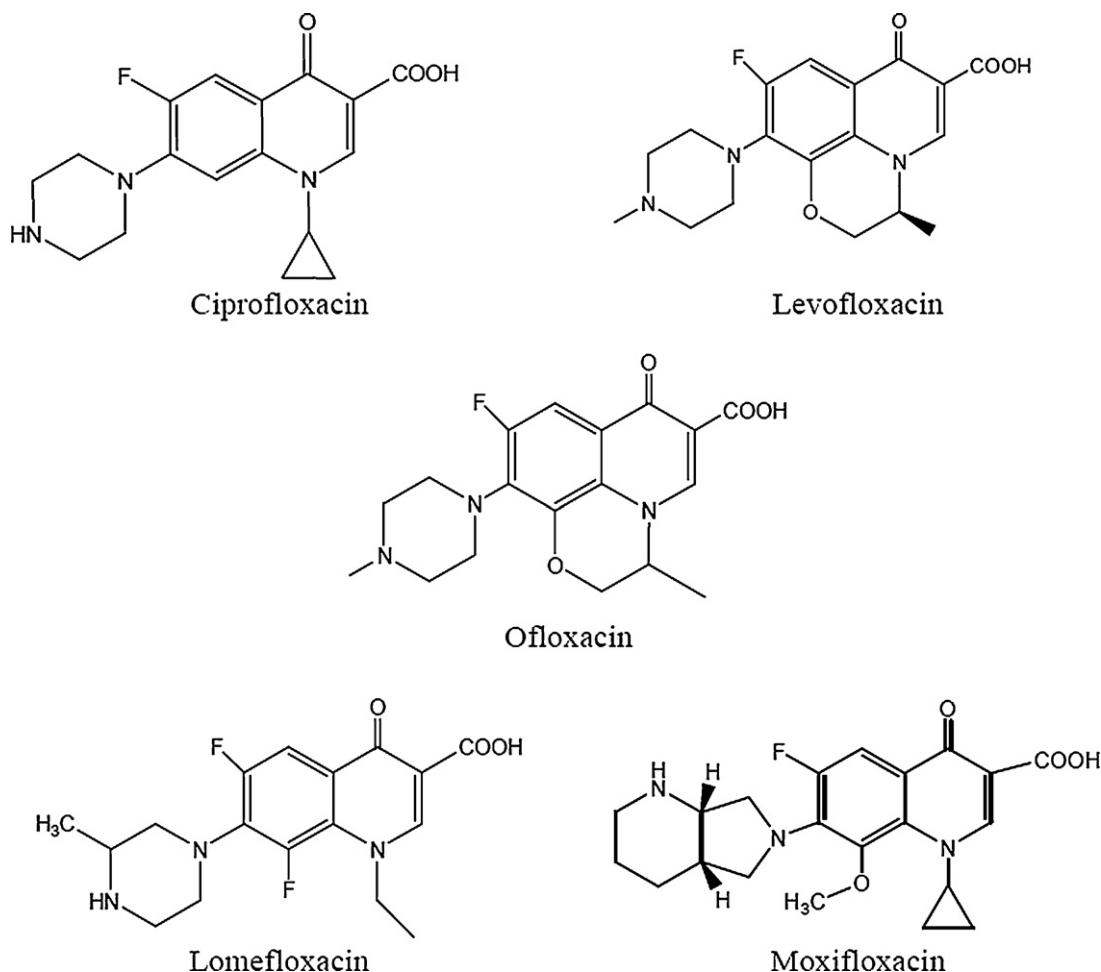


Fig. 1. Structures of the studied quinolones.

be useful in the area of quality control, routine analyses and pharmacokinetic studies.

2. Experimental

2.1. Reagents

Levofloxacin (LEV), Ciprofloxacin (CIP), Lomefloxacin (LOM), and Ofloxacin (OFL) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Moxifloxacin (MOX) was purchased from Bayer (Leverkusen, Germany). Sodium dodecyl sulphate (SDS) and sodium hydroxide were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dihydrogen phosphate and propanol were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Hydrochloric acid, methanol, ethanol and triethylamine (TEA) were acquired from J.T. Baker (Deventer, the Netherlands). Ultrapure water was used throughout (Millipore S.A.S., Molsheim, France).

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system was an Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, thermostatted autosampler tray and column compartments, and a fluorescence detector. The pH of the solutions was measured with a pH meter equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode (Crisson GLP 22, Barcelona). The balance used was a Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland). The vortex shaker and sonification unit were from Selecta (Barcelona).

The Agilent ChemStation (Rev. B.03.01) software was used for instrumental control and for chromatographic data collection. The Michrom software [30] was used for processing the chromatographic data and for optimisation studies.

The analytical separation was performed in a reversed-phase Kromasil C₁₈ (Scharlab) (150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size). Two mobile phases were employed to analyse the quinolones (a) 0.15 M SDS, 12.5% propanol and 0.5% TEA at pH 3.0 for CIP and LEV; and (b) 0.05 M SDS, 12.5% propanol and 0.5% TEA at pH 3.0 for LOM, OFL and MOX. The retention times were lower than 10 min and 22 min, respectively. Detection was performed with a fluorescent detector set at the following excitations and emission wavelengths: 285/465 nm for the first group and 295/485 nm for the second group of quinolones, respectively. The flow rate and injection volume were 1 mL/min and 20 μL, respectively. Chromatographic experiments were carried out at laboratory temperature.

2.3. Standard, samples and mobile phase preparation

A stock solution of 10 μg/mL of the five quinolones was prepared by dissolving the compounds in a few millilitres of ethanol, with the aid of an ultrasonic bath, and was finally filled up with 0.05 M SDS at pH 3.0. Urine samples were collected in Urine Collection Cups (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK). Two spiked stock solutions, also containing 10 μg/mL of the both groups of compounds, were prepared by dilution of 1 mL urine in a factor (1:25) with 0.05 M SDS at pH 3.0. Solutions were

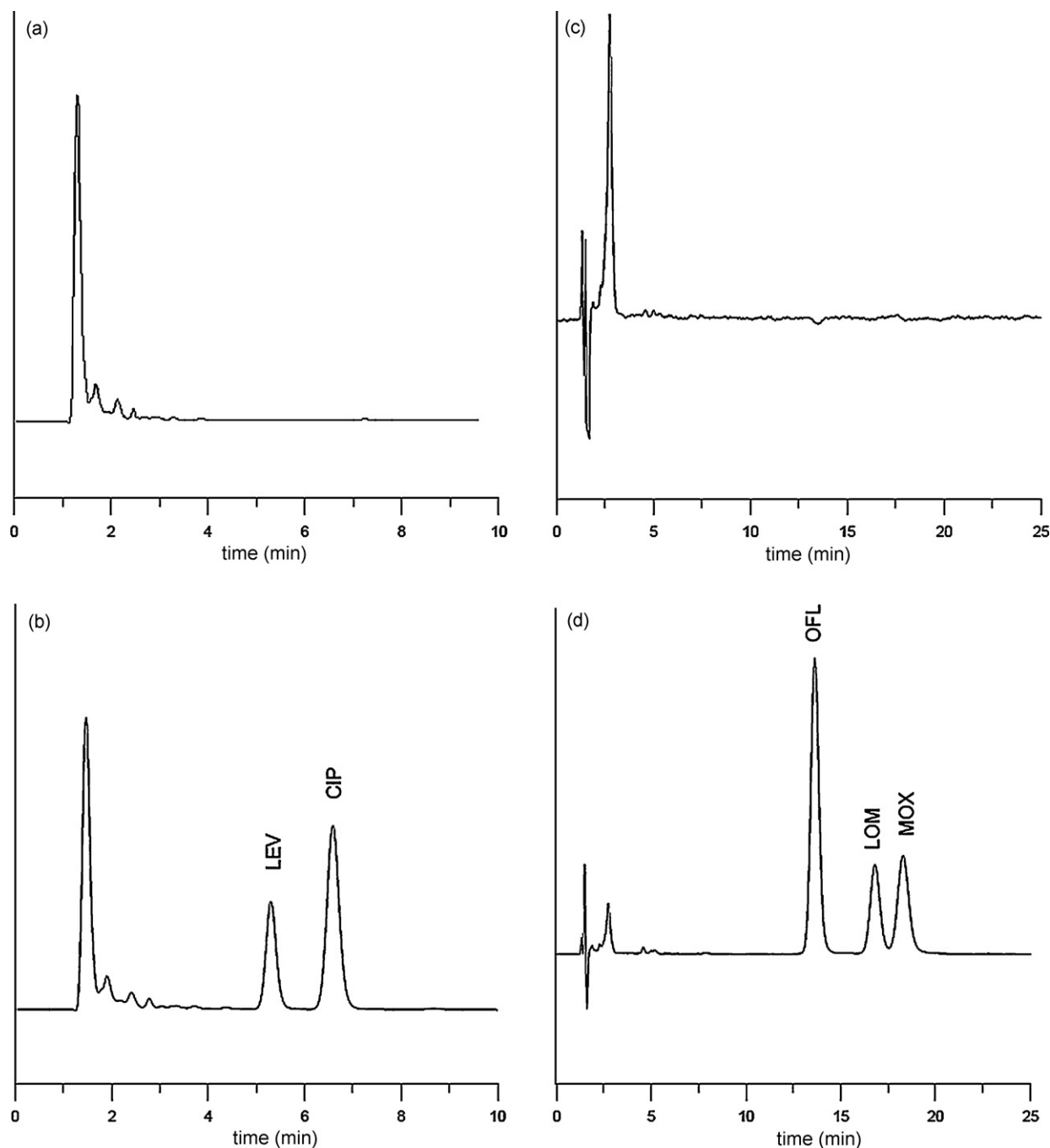


Fig. 2. Chromatograms of (a) urine blank, (b) urine spiked (100 ng/mL) with LEV and CIP using the mobile phase: 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5%TEA at pH 3.0 at FLD wavelength (285/465) nm; and (c) urine blank and (d) urine spiked (500 ng/mL) with OFL, LOM and MOX using the mobile phase: 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5%TEA at pH 3.0 at the FLD wavelength (295/485) nm. All the samples were diluted in a factor (1:25) with 0.05 M SDS.

prepared daily. The analyses of patients' urine were performed by diluting urine with 0.05 M SDS at pH 3.0 in different dilution factors, which was injected directly into the chromatographic system. All the solutions were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Micron Separations, Westboro, MA, USA) before analysis.

The micellar mobile phases were prepared by dissolving SDS in water, which were buffered with sodium dihydrogen phosphate 0.01 M at pH 3.0 using 0.1 M of hydrochloric acid. A small amount (0.5%) of TEA was added to increase the peak efficiencies. Then, propanol was added to achieve the desired concentration. Finally water was added up to the mark-up of the volumetric flask.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation strategy and mobile phase selection

Several studies were carried out to select efficient parameters for the analysis. Propanol yielded better efficiencies but larger retention times than butanol. However, the compounds could not be resolved from the protein band with butanol. Thus, propanol was preferred to optimise the separation of the compounds. Moreover, pH 3.0 was chosen because of the good retention times obtained with narrow and good efficiency. An amine (usually triethylamine, TEA) was used as a component of the mobile phase to protect silanol groups of the stationary

phase and to increase the peak efficiencies of the basic compounds.

The optimisation protocol began with the experimental design used for the drugs which consisted of five mobile phases: four located at the corners of a rectangular factor space and the fifth in its centre. The second step involved fitting the retention data to an adequate model (Eq. (1)) which, for the considered example, had four parameters. Errors below 3% were usually obtained for the prediction of the retention factors.

$$k = \frac{K_{AS}(1/1 + K_{AD}\varphi)}{1 + K_{AM}(1 + K_{MD}\varphi/1 + K_{AD}\varphi)} [M] \quad (1)$$

where [M] and φ are the concentrations of the surfactant and modifier; K_{AS} and K_{AM} correspond to the equilibria between the solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; K_{AD} and K_{MD} measure the relative variation in the concentration of the solute in bulk water and micelles due to the presence of a modifier, as compared to a pure micellar solution (without a modifier).

In order to find the best composition of the mobile phase, the five quinolones were injected into the mobile phases at pH 3.0, which contained SDS (M)/propanol (% v/v): (0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.1/7.5, 0.15/2.5, and 0.15/12.5), and the usual behaviour in MLC with SDS was observed. Thus, the retention factors decreased for SDS and propanol while increasing the concentration of both. On the other hand, efficiencies decreased when the surfactant concentration increased; conversely efficiencies increased with the higher concentrations of the modifier. Interpretative optimisation strategies can be assisted by computer simulation, which can mimic the methodology being followed by experienced chromatographers with less time and effort. We selected the most convenient mobile phase with the aid of the Michrom software by taking into account the factor of maximum resolution and the minimum analysis time [30]. This software allows for the graphic observation of the changes in the chromatograms when the user progressively varies the concentrations of the surfactant and modifier.

The simultaneous elution of the five drugs with the same mobile phase was firstly considered, but it was not possible due to an overlapping between CIP, LOM and MOX on the one side, and LEV and OFL on the other side. Then, the quinolones have been finally gathered in two different mobile phases. Moreover, quinolones do not present the same fluorescent maximum for excitation as they do for emission. Quinolones were divided into the two following groups: (a) CIP and LEV: mobile phase: 0.15 M SDS, 12.5% propanol and

Table 1
Linear regression data and the limits of detection.

Analyte	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	r^2	LOD (ng/mL)
Ciprofloxacin	0.0101 \pm 0.0004	-0.0226 \pm 0.0021	0.99997	0.3
Levofloxacin	0.0073 \pm 0.0005	-0.0055 \pm 0.0021	0.99997	0.2
Lomefloxacin	0.0117 \pm 0.0005	-0.0022 \pm 0.0022	0.99998	0.4
Moxifloxacin	0.0060 \pm 0.0004	-0.006 \pm 0.004	0.99996	0.5
Ofloxacin	0.0158 \pm 0.0003	-0.006 \pm 0.008	0.99998	0.4

0.5% TEA at pH 3.0. Fluorescence detector: excitation wavelength: 285 nm, emission wavelength 465 nm; and (b) OFL, MOX and LOM: mobile phase: 0.05 M SDS, 12.5% propanol and 0.5% TEA at pH 3.0. Fluorescence detection: excitation wavelength 295 nm, emission wavelength 485 nm. Fig. 2b and d shows the chromatograms for both groups.

The chromatographic parameters (retention factor (k), efficiency (N) and asymmetry factor (B/A)) for the compounds of the first group (CIP and LEV) were: 4.6, 1950 and 1.1 and 3.5, 1836 and 1.1, respectively. And the chromatographic parameters for the second group (LOM, MOX and OFL) were: 13.8, 2447 and 1.2; 15.0, 1650 and 1.4; and 11.0, 2384 and 1.2, respectively.

3.2. Method validation

Method validation was done following the FDA validation guide [29]. The parameters evaluated were: linearity, detection and quantification limits, precision and accuracy, selectivity, recovery and robustness.

3.2.1. Selectivity

Six selected control drug-free human urine samples were processed directly into the chromatographic system and analysed to determine the extent to which endogenous components may contribute to interfere with the retention time of the drug. No interference for endogenous compounds was found in the physiological matrix studied, as Fig. 2a and c depicts.

3.2.2. Linearity

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks obtained at eight different concentrations (six replicates), in the range of 1–1000 ng/mL in the urine matrix solution (1:25 dilution factor). To study the variability of the calibration parameter, curves were obtained for 5 days over a 2-month period

Table 2
Inter-day and intra-day precision and accuracy of analytes.

Analyte	Concentration added (ng/mL)	Found ^a (mean \pm SD) (μ g/mL)	Accuracy (%)	Intra-day RSD (%)	Found ^b (mean \pm SD) (ng/mL)	Accuracy (%)	Inter-day RSD (%)
Ciprofloxacin	5	5.02 \pm 0.20	0.4	4.0	4.99 \pm 0.06	0.2	5.6
	50	50.3 \pm 1.6	0.5	3.15	50.1 \pm 0.5	0.2	3.6
	500	498 \pm 7	0.5	1.4	509.3 \pm 2.1	0.4	3.3
Levofloxacin	5	5.01 \pm 0.07	0.12	1.4	5.00 \pm 0.05	0.2	8.2
	50	50.4 \pm 1.1	0.7	2.1	49.8 \pm 0.4	0.6	7.0
	500	499.8 \pm 5.4	0.04	1.1	499 \pm 3	0.7	6.7
Lomefloxacin	5	5.0 \pm 0.3	0.4	6.8	5.01 \pm 0.04	0.1	4.1
	50	49.3 \pm 0.7	1.4	1.3	49.41 \pm 0.24	1.2	4.6
	500	496.89 \pm 0.13	0.03	1.1	499.5 \pm 2.4	0.1	3.9
Moxifloxacin	5	4.91 \pm 0.16	1.9	3.2	5.00 \pm 0.12	0.04	8.4
	50	50.1 \pm 1.7	0.3	3.4	50.0 \pm 0.6	0.04	6.1
	500	497 \pm 5	0.6	1.0	497 \pm 4	0.6	6.7
Ofloxacin	5	5.1 \pm 0.3	1.7	5.9	5.04 \pm 0.03	0.8	7.8
	50	51.2 \pm 0.3	2.5	0.5	50.8 \pm 0.4	1.5	1.0
	500	496 \pm 5	0.7	1.0	497.8 \pm 2.1	0.4	1.7

^a $n=6$.

^b $n=5$.

Table 3
Robustness evaluation of the MLC method.

Chromatographic changes	Level	Ciprofloxacin ^a		Levofloxacin ^a		Ofloxacin ^b		Lomefloxacin ^b		Moxifloxacin ^b		
		t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	
(A) SDS concentration (M)												
(a) 0.145 (b) 0.045	−0.05	7.61	4.66	6.02	3.65	15.2	8.19	18.16	6.17	20.91	2.90	
0.15 0.05	0	6.61	4.10	5.4	3.66	13.7	7.61	16.8	5.51	18.48	2.75	
0.155 0.055	+0.05	6.28	4.66	5.23	3.12	13.4	7.57	16.7	5.84	17.94	2.64	
Mean ± SD		6.8 ± 0.7	4.5 ± 0.3	5.5 ± 0.4	3.5 ± 0.3	14.1 ± 0.9	7.8 ± 0.3	17.2 ± 0.8	5.84 ± 0.3	19.1 ± 1.6	2.76 ± 0.13	
RSD (%)		10.18	7.15	7.6	8.9	6.8	4.5	4.6	5.6	8.3	4.9	
(B) Percentage of propanol (v/v)												
12.4	−0.1	6.74	4.06	5.04	3.32	16.18	7.34	17.9	5.44	18.72	2.71	
12.5	0	6.61	4.10	5.4	3.66	13.7	7.61	16.8	5.51	18.48	2.75	
12.6	+0.1	6.68	3.57	5.25	3.23	13.53	8.32	16.47	5.76	17.53	2.87	
Mean ± SD		6.68 ± 0.07	3.9 ± 0.3	5.34 ± 0.08	3.40 ± 0.23	14.5 ± 1.5	7.8 ± 0.5	17.1 ± 0.7	5.57 ± 0.17	18.2 ± 0.6	2.78 ± 0.08	
RSD (%)		1.03	7.5	1.5	6.6	10.3	6.5	4.4	3.0	3.4	2.9	
(C) pH of mobile phase												
2.9	−0.1	6.72	3.58	5.41	3.98	14.18	7.48	17.93	5.44	19.18	2.76	
3	0	6.61	4.10	5.4	3.66	13.66	7.61	16.8	5.51	18.48	2.75	
3.1	+0.1	7.05	3.39	5.65	3.23	13.53	7.84	17.54	5.64	18.71	2.96	
Mean ± SD		6.79 ± 0.23	3.7 ± 0.4	5.47 ± 0.15	3.85 ± 0.17	14.2 ± 0.5	7.64 ± 0.18	17.4 ± 0.5	5.53 ± 0.10	18.8 ± 0.4	2.82 ± 0.12	
RSD (%)		3.4	5.5	2.8	4.5	3.7	2.3	3.7	1.8	3.7	4.14	
(D) Flow rate (mL/min)												
0.9	−0.1	7.50	3.58	6.04	3.79	15.71	6.85	19.48	6.66	21.08	2.83	
1	0	6.61	4.10	5.4	3.66	13.7	7.61	16.8	5.51	18.48	2.75	
1.1	+0.1	5.99	3.39	4.83	3.10	12.67	6.36	15.7	5.71	17.03	2.51	
Mean ± SD		6.7 ± 0.8	3.7 ± 0.4	5.4 ± 0.6	3.5 ± 0.4	14.0 ± 1.5	3.5 ± 0.4	17.3 ± 1.9	5.9 ± 0.6	18.9 ± 2.1	5.9 ± 0.6	
RSD (%)		11.3	10.01	11.24	10.5	11.04	9.01	11.23	10.31	10.88	6.15	
(E) Percentage of TEA (v/v)												
0.45	−0.05	6.66	4.54	5.35	3.45	14.6	7.75	18.6	5.88	18.62	2.79	
0.5	0	6.61	4.10	5.4	3.66	13.7	7.61	16.8	5.51	18.48	2.75	
0.55	+0.05	6.73	4.20	5.38	3.38	13.6	7.73	16.1	5.79	18.20	2.71	
Mean ± SD		6.66 ± 0.06	4.28 ± 0.23	5.36 ± 0.01	3.50 ± 0.14	14.0 ± 0.6	7.70 ± 0.08	16.8 ± 0.7	5.7 ± 0.19	18.44 ± 0.21	2.75 ± 0.03	
RSD (%)		0.9	5.3	0.23	4.12	4.22	1.01	4.0	3.4	1.15	1.23	

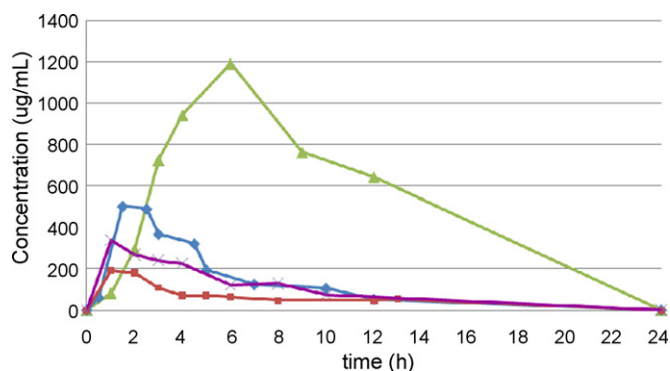


Fig. 3. Elimination curve of CIP (◆), LEV (▲), MOX (■) and OFL (×) in urine.

for a different set of standards. The slope and intercept were determined by the least squares linear regression analysis method. The results obtained are shown in Table 1. The linear correlation coefficients (r) were always higher than 0.99996.

3.2.3. Detection and quantification limits

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) are obtained according to the FDA validation guide [29]. The LOD for the five quinolones in urine ($n = 10$) was determined with the 3s criterion using a series of 10 solutions containing a low concentration of each compound (0.5 ng/mL). The LOQ in urine was selected as the lowest concentration used in the calibration curve. The LODs of CIP, LEV, MOX, OFL and LOM in urine-SDS solution were lower than 0.5 ng/mL (Table 1), while the LOQs were 1 ng/mL. It should be noted, both LODs and LOQs were in good agreement with the therapeutic levels in urine of these antibiotics.

3.2.4. Precision and accuracy

The intra- and inter-day precisions of the method were determined by analysing the five quinolones at three different concentrations (5, 50 and 500 ng/mL) in urine-SDS (1:25). The intra-day analyses were determined by injecting these three test solutions six times on the same day. The inter-day analysis was the average of six measurements of the intra-day values taken on 5 days over a 3-month period performed by different analysts and equipment at the same concentrations. The results, expressed as the percentage of the relative standard deviation and relative error (accuracy, %) for the intra- and inter-day values, are provided in Table 2. As seen, all the quinolones could be easily determined at the three concentration levels, and the obtained recoveries were quantitative in all cases with RSDs values lower than 8.4%. These results prove that the proposed method is suitable for the analysis of these antibiotics in urine samples. Thus, the procedure developed can be used in the quality control, routine analyses and pharmacokinetic studies.

3.2.5. Robustness

The robustness of the method was examined by replicate injections ($n = 6$) of a standard solution at 500 ng/mL with slight variations made to the chromatographic parameters (surfactant concentration, percentage of propanol, pH, percentage of triethylamine and flow rate). Negligible differences in the peak areas and less variability in the retention time were observed. The results, shown in Table 3, indicate that the selected factors remain unaffected by the slight variations made to these parameters. As expected, the variation of the flow rate shows the strongest influence on the retention of the studied compounds, unlike the other parameters.

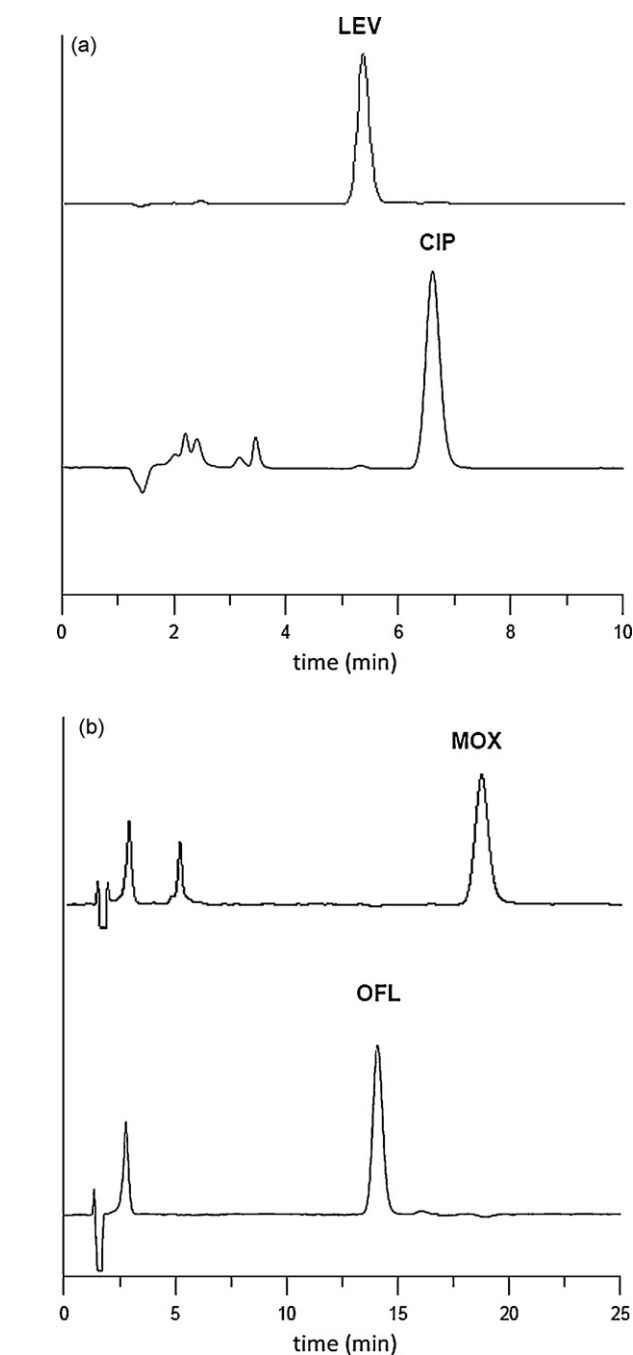


Fig. 4. Chromatograms of (a) CIP and LEV excreted in urine as unchanged drug 3 h after oral ingestion. Mobile phase: 0.15 M SDS–12.5% propanol–0.5%TEA at pH 3.0; and (b) OFL and MOX excreted in urine as unchanged drug 3 h after oral ingestion. Mobile phase: 0.05 M SDS–12.5% propanol–0.5%TEA at pH 3.0.

3.2.6. Recoveries

The quinolone recoveries from urine were determined by spiking drug-free urine diluted in a 1:25 factor with 0.05 M SDS at pH 3.0 with known amounts of the drug at five different concentrations (5–1000 ng/mL) within the calibration range (six replicates for each standard). The spiked samples were processed and analysed with the developed procedure. The relative (analytical) recovery was calculated by comparing the concentration obtained from the drug-supplemented urine with the actual added amounts. The results obtained show satisfactory recoveries for the five quinolones in the range of 96–103%. Fig. 2b and d depicts the chromatograms

obtained from the two groups of compounds in urine eluted in their optimum mobile phase.

3.2.7. Analysis of real urine samples

To determine the reliability of the assay, four urine samples from different volunteers were used. The matrix samples (in absence of quinolones) were chromatographed using the proposed procedure without any other treatment except filtration. Urinary studies were conducted following the oral administration of a single dose of a conventional tablet containing LEV (500 mg), CIP (500 mg), MOX (400 mg) and OFL (200 mg) to four different volunteers. A sample was collected just before administering the drug to be used as the blank. The other urine samples were collected at appropriate time intervals post-dose, approximately every 1 h, and were protected from light and refrigerated at 4 °C until analysed. Different dilutions of the urine samples were performed. The dilution factors for LEV, CIP, OFL and MOX were 0.025:25, 0.0125:25, 0.025:25 and 0.25:25, respectively, using 0.05 M SDS at pH 3.0. Fig. 3 shows the urine concentration profile of the four quinolones obtained.

The maximum concentration excreted in urine was found 6 h, 2 h, 1 h and 1 h after orally administering LEV, CIP, MOX and OFL, respectively. The final quantity of unchanged drug eliminated after 12 h was 448 mg (89%) for LEV, 290 mg (58%) for CIP, 92 mg (23%) for MOX, and 163 mg (82%) for OFL of the dose taken. These results are in accordance with the information found in the literature [31], which indicates that the quinolones excreted mainly as the unchanged drug in urine were 80–85% for LEV, 40–60% for CIP, 20% for MOX and 80% for OFL. Fig. 4 shows the chromatogram of (a) CIP and LEV, and (b) OFL and MOX excreted 3 h after oral administration. The peaks which could be assigned to the metabolites of the antibiotic or degradation products did not interfere in any analysis. All the compounds could be still detected up to 12 h after ingestion. These results show that pharmacokinetic studies can be performed under the proposed chromatographic conditions.

4. Conclusions

This assay, which has been designed to achieve high throughput samples in a short time for the preparation step, could be used to confirm and quantify urine samples originating from the screening process. The proposed chromatographic procedure provides good results for the determination of quinolones in urine in terms of linearity, accuracy, recoveries and robustness. Other commonly administered drugs do not interfere and the limit of detection is at the ng/mL level. This means that the proposed procedure is particularly useful for pharmacokinetic studies with healthy subjects and patients using small volumes of urine samples.

This method seems to be more sensitive than those reported previously [10,18,21]. Besides, according to the other methods, the retention time is quick enough for routine analysis [9,10,21,22]. Moreover, the proposed chromatographic procedure is also simpler than most methods reported where a previous extraction and/or an internal standard is required [9,18,21].

In conclusion, our results indicate that the MLC procedure can be used for the analysis of five quinolones, which are frequently prescribed drugs, in urine samples. Moreover, this method is sensi-

tive enough to undertake the quality control routine analyses and pharmacokinetic studies of the drug, bearing in mind that the urine samples were injected without any previous treatment.

Acknowledgements

This work has been supported by projects of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) CTQ 200764473/BQU and the Fundació Caixa Castelló-Bancaixa P1-1B2006-12. Maria Rambla-Alegre also thanks the MEC for the FPU grant.

References

- [1] American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, 1988.
- [2] D. Currie, L. Lynas, D.G. Kennedy, W.J. McCaughey, Food Addit. Contam. 15 (1998) 162.
- [3] Métodos de análisis de residuos de productos farmacéuticos y contaminantes para productos pesqueros de exportación (Programa de laboratorios, Norma Técnica 4), Servicio Nacional de Pesca, Departamento de Sanidad Pesquera, Chile, 2002, Enlace web: http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&task=view&id=253&Itemid=761 (05.03.09).
- [4] Food Chemical News, vol. 37, no 52, CRC Press, Washington, DC, 1996, p. 21.
- [5] Health and Consumer Protection. European Union Decision 2002/657/EC, Web: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis.en.htm.
- [6] H.-W. Sun, F.-X. Qiao, J. Chromatogr. A 1212 (2008) 1.
- [7] I.F. Al-Momani, Anal. Lett. 39 (2006) 741.
- [8] F. Barbato, G. Martino, L. Grumetto, M.I. Rotonda, Eur. J. Pharm. Sci. 30 (2007) 211.
- [9] Z. Vybíralová, M. Nobilis, J. Zoulova, J. Kvetina, P. Petr, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 851.
- [10] J.L. Vilchez, L. Araujo, A. Prieto, A. Navalón, Anal. Chim. Acta 516 (2004) 135.
- [11] F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz-de-la-Peña, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1242.
- [12] V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 531.
- [13] E.A. Christodoulou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, J. Chromatogr. B 859 (2007) 246.
- [14] S.-J. Zhao, C. Li, H.Y. Jiang, B.-Y. Li, J.-Z. Shen, Chin. J. Anal. Chem. 35 (2007) 786.
- [15] E. Turiel, A. Martín-Esteban, J.L. Tadeo, Anal. Chim. Acta 562 (2006) 30.
- [16] M. Seifrtová, A. Pena, C.M. Lino, P. Solich, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 799.
- [17] S. Tatar-Ulu, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 320.
- [18] O. Ballesteros, I. Toro, V. Saenz-Nebot, A. Navalon, J.L. Vilches, J. Barbosa, J. Chromatogr. B 798 (2003) 137.
- [19] R. Romero-González, J.C. López-Martínez, E. Gómez-Milán, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, J. Chromatogr. B 857 (2007) 142.
- [20] M.P. Hermo, E. Nemetlu, S. Kir, D. Barrón, J. Barbosa, Anal. Chim. Acta 613 (2008) 98.
- [21] M. Ferdig, A. Kaleta, T.D.T. Vo, W. Buchberger, J. Chromatogr. A 1047 (2004) 305.
- [22] S. Wei, J. Lin, H. Li, J.M. Lin, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 333.
- [23] A. Berthod, M.C. García-Ávarez-Coque, Micellar Liquid Chromatography, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [24] M.C. García-Ávarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, J. Chromatogr. A 780 (1997) 129.
- [25] J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, D. Bose, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 75.
- [26] S. Carda-Broch, M.T. Gil-Agustí, L.L. Monferrer-Pons, J.S. Esteve-Romero, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 254.
- [27] M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, Anal. Chim. Acta 633 (2009) 250.
- [28] M. Rambla-Alegre, M.T. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero, J. Chromatogr. B 839 (2006) 89.
- [29] Guidance for Industry. Bioanalytical, Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA, May 2001.
- [30] J.R. Torres-Lapasió, Michrom Software, Marcel Dekker, New York, USA, 2000.
- [31] Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, London (UK), 2004.

SIMULTANEOUS SEPARATION AND DETERMINATION OF QUINOLONES IN PHARMACEUTICALS BY MICELLAR LIQUID CHROMATOGRAPHY

Maria Angeles Collado-Sánchez, Maria Rambla-Alegre, Samuel Carda-Broch, and Josep Esteve-Romero

Àrea de Química Analítica, QFA, Universitat Jaume I, Castelló, Spain

□ *A rapid and simple liquid chromatographic procedure using micellar mobile phases is reported for the separation and determination of four quinolones (pipemidic acid, levofloxacin, norfloxacin, and moxifloxacin) in pharmaceuticals.*

This purpose was achieved without any previous pretreatment step in a C₁₈ column using a micellar mobile phase of 0.15 M sodium dodecyl sulphate, 2.5% propanol, and 0.5% triethylamine at pH 3, with retention times below 12 min. For detection, the diode-array UV-Vis set at 276 nm was used. The limits of detection and quantification were between 8–51 and 28–171 ng/mL, respectively. This method was validated in terms of intra-day and inter-day precision and accuracy, and robustness. Calibration curves over the concentration range of 0.1–50 µg/mL were linear ($r^2 > 0.9997$). Good claim percentages (96–106%) were obtained in the analysis of pharmaceutical formulations. The results show that the procedure is suitable for the routine analysis of drugs.

Keywords direct injection, micellar mobile phase, pharmaceutical formulation, quinolone, SDS

INTRODUCTION

Quinolones and fluoroquinolones are synthetic antibiotics whose action is based on their anti-DNA activity. Since nalidixic acid was discovered,^[1] a number of structure modifications to the quinolone nucleus have been performed to increase antimicrobial activity and to enhance the pharmacokinetic performance of these drugs. The general structure consists of a 1-substituted-1,4-oxopyridine-3-carboxylic moiety combined with either an aromatic or heteroaromatic ring. Fluoroquinolones are quinolones with a fluorine atom at position 6 of the quinolone naphthyridine or benzoaxazine ring systems, and belong to the second generation of quinolones. They are

Correspondence: Maria Rambla-Alegre, Àrea de Química Analítica, QFA, Universitat Jaume I, 12071 Castelló, Spain. E-mail: mrambla@qfa.uji.es

characterised by their greater effectiveness against bacterial activity,^[2] and are used in both human and veterinary medicine. In humans, they are used to treat an extensive range of diseases, including urinary, respiratory, and gastrointestinal tract infections.^[3]

The analysis of quinolones has traditionally been performed using microbiological methods. However, this technique is time consuming and offers poor precision and specificity. Other non-routine techniques, such as terbium (III)-sensitised luminescence,^[4] capillary electrophoresis,^[5-7] or immunoaffinity chromatography,^[8] have also been applied.

Last generation LC-MS-(MS) equipment has also been used,^[9-11] although this equipment is very expensive and only a few laboratories can afford such instrumentation. High performance liquid chromatography (HPLC) has become an important tool for the analysis of single and various combinations of quinolones in biological fluids, foods, environmental samples, and pharmaceutical preparations using either UV or fluorescence as the detection method.^[12-27]

Micellar chromatographic (MLC) methods offer the advantages of the direct injection of samples with no pretreatment other than filtration and the low toxicity of the mobile phases employed.^[28] MLC has proven to be a

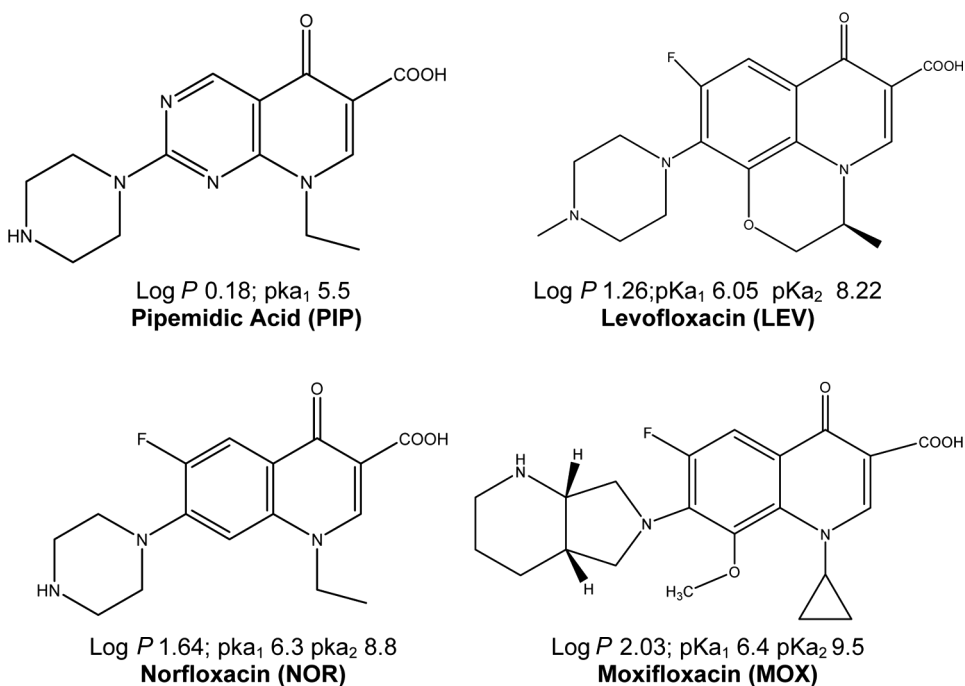


FIGURE 1 Structures, octanol-water partition coefficient ($\text{log } P$) and acid-based constants of the studied quinolones.^[34,36]

useful technique in the determination of diverse groups of drugs, such as thiazide diuretics,^[29,30] furosemide,^[31] and trazodone^[32] in pharmaceutical formulations.

In this work, a simple chromatographic procedure with micellar mobile phases of Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) for the simultaneous determination of pipemidic acid, levofloxacin, norfloxacin, and moxifloxacin (Figure 1) has been developed and applied to control numerous pharmaceuticals in several dosage forms, and validated according to the ICH harmonised tripartite guideline.^[33] Although these compounds are not administered together, the proposed method allowed the determination and quantification of the four quinolones in a single chromatographic run without modifications being necessary for each compound separately, which make the proposed method more economic and faster.

EXPERIMENTAL

Reagents and Samples

Pipemidic acid (PIP) and norfloxacin (NOR) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), moxifloxacin (MOX) from Bayer (Leverkusen, Germany), and levofloxacin (LEV) from Fluka (Milan, Italy). Distilled deionised water was used throughout. Sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium dihydrogen phosphate, and methanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Propanol was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Hydrochloric acid and triethylamine were acquired from J. T. Baker (Deventer, the Netherlands).

Instrumentation

The pH of the solutions was measured with a Crison GLP 22 (Barcelona), equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode. The balance used was a Mettler-Toledo A×105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland). The vortex shaker and sonification unit were acquired from Selecta (Barcelona). The chromatographic system was an Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler, and a UV-Visible detector.

Chromatographic Conditions

A reversed phase Kromasil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size) (Scharlab) was used. The selected mobile phase was 0.15 M SDS, 2.5% (v/v) propanol and 0.5% triethylamine at pH 3. The flow rate

and injection volume were 1 mL/min and 20 μ L, respectively. Experiments were carried out at room temperature and detection was performed at 276 nm. Chromatographic signals were acquired and processed with an Agilent ChemStation (Rev. A.10.01).

Mobile and Standard Solutions Preparation

The micellar mobile phase was prepared using SDS and 0.5% (v/v) of triethylamine, which was buffered with sodium dihydrogen phosphate 0.01 M at pH 3 using HCl 0.1 M and, lastly, propanol was added to obtain the desired concentration.

Stock solutions of 50 μ g/mL of each compound were prepared. Drugs were dissolved in ethanol with the help of an ultrasonic bath and topped up to the mark on the volumetric flask with a 0.1 M SDS solution buffered with phosphate at pH 3. For the analysis of the drugs, several standard solutions were prepared in the 1–25 μ g/mL range. Fresh solutions were prepared periodically.

Pharmaceutical Sample Preparation

The pharmaceuticals analysed were tablets and coated capsules. The average weight per tablet was calculated from ten units. Tablets were ground and reduced to a fine homogeneous powder in a mortar. Several portions of this powder were accurately weighed and sonicated in the presence of ethanol (5% v/v of the final content) in an ultrasonic bath. Then 0.1 M SDS solution at pH 3 was added to favour the extraction of the analyte, and the ultrasonic bath was used again. The excipients in the tablets were not soluble in the micellar medium. Therefore, sample solutions were filtered before being injected into the chromatograph. However, filtration was always performed directly into the autosampler vials through 0.45 μ m nylon membranes (Micron Separations, MA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Mobile Phase Selection

Preliminary studies were carried out to select an efficient method for the analysis of four quinolones. Parameters, such as detection wavelength, mobile phase composition, percentages, and optimum pH, have been thoroughly studied.

Several mobile phases were investigated using different alcohols and percentages. Propanol yielded better efficiencies but larger retentions than butanol. However, the peaks of the compounds could not be resolved with

butanol. Thus, propanol was preferred to optimise the separation of the four drugs.

Quinolones have two ionisable functional groups: carboxylic acid and N₄ of the piperazine ring. The carboxylic group is normally a stronger acid than the ammonium group and has a pka₁ value ranging from 5.5 to 9.5 in water. The pka values and octanol-water partition coefficients (log *P*) are shown in Figure 1.^[34–36] Among the different pH media tested, pH 3 was chosen because good retention times were obtained with narrow and well resolved peaks. Furthermore, efficiencies deteriorated when the pH of the mobile phase was increased.

Bonded silica phases are problematic from the point of view of pH stability and residual chemical activity of the unprotected silica support, which can induce tailing peaks and variable retention times for basic compounds. Using an amine, such as thiethylamine (TEA), is a common practice to protect the silanol groups of the stationary phase in order to increase peak efficiencies for basic compounds with amine groups. The addition of TEA enhanced the efficiencies of the four quinolones. However, this amine behaved as another modifier and the retention factors of the compounds lowered. For these reasons, the TEA concentration was limited to 0.5%.

Optimization Strategy

An optimization study for the mixture of PIP, LEV, NOR, and MOX was done. An adequate control of the concentrations of both the surfactant and modifier can lead to chromatograms presenting a good resolution and sufficient elution strength.

In order to optimize the mobile phase composition, the retention equation of the four quinolones was obtained using a reduced (five) and selected number of mobile phases, four located at the corners of a rectangular factor space and the fifth in its centre. The limits of the factor space (surfactant and alcohol) were in the 0.05 M to 0.15 M and 2.5 to 12.5% ranges for the concentration of SDS and the volume of propanol, respectively. The errors in the retention factors predicted with these equations were below 2% for all the compounds. The retention factors (*k*), efficiencies (*N*), and asymmetry factors (*B/A*) of the four compounds were measured and processed with the Michrom software,^[37,38] which helps to model the compounds retention by taking into account the maximum resolution factor and the minimum analysis time. The equation used was:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\varphi}{1 + K_{AD}\varphi} [M]} \quad (1)$$

where $[M]$ and φ are the concentrations of the surfactant and modifier; K_{AS} and K_{AM} correspond to the equilibria between the solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; K_{AD} and K_{MD} measure the relative variation in the concentration of the solute in bulk water and micelles due to the presence of a modifier, as compared to a pure micellar solution (without a modifier).

The global resolution diagram, and the simulated and real chromatograms for the optimum mobile phase obtained are depicted in Figure 2. As can be seen in Figure 2a, resolution values close to one (maximum value) can be obtained in a narrow region of SDS (0.12–0.15 M) and propanol (2.5–3.5% (v/v)). The best resolution value was obtained for a composition of 0.15 M SDS–2.5% propanol–0.5% TEA–0.01 M NaH_2PO_4

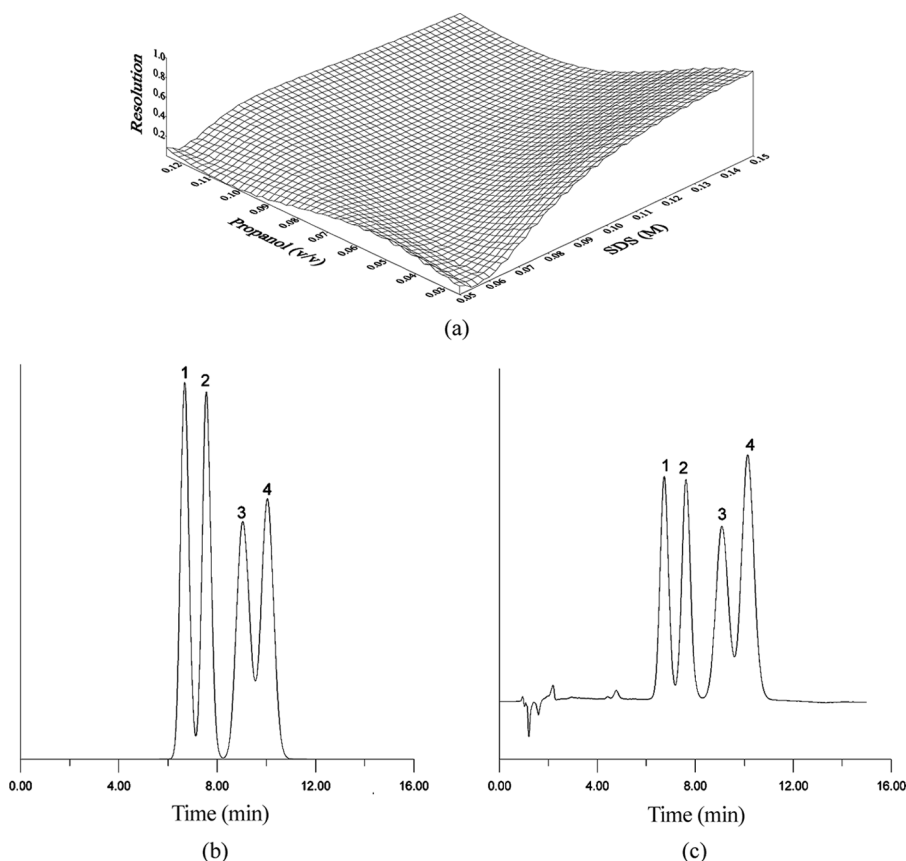


FIGURE 2 (a) Global resolution diagram, (b) simulated, and (c) real chromatogram for a mixture of (1) PIP (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (2) LEV (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (3) MOX (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and (4) NOR (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mobile phase: 0.15 M SDS–2.5% 1-propanol–0.5% thiethylamine–pH 3, flow rate: 1 mL/min, UV detection at 276 nm.

at pH 3 with an analysis time below 12 minutes. Thus, this mobile phase was selected as optimum. Figure 2b and 2c show the simulated and experimental chromatogram for the mixture of the four quinolones in the optimum mobile phase. The agreement between both is excellent. The chromatographic parameters (k , N , and B/A) obtained were: 6.6, 1900, and 1.1; 5.7, 1500, and 1.1; 9.1, 1700, and 1.0; and 8.1, 1100, and 1.2 for PIP, LEV, NOR, and MOX, respectively.

VALIDATION

The ICH harmonised tripartite guideline^[33] was followed to validate the method.

Linearity

Under the selected chromatographic conditions, the linear range of the signal response for each drug was studied over the concentration range of 0.1 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Seven different concentration levels (0.1, 0.5, 1, 5, 15, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were obtained for each standard solution, and were conveniently diluted with 0.1 M SDS solution at pH 3. Each solution was injected into the chromatographic system ($n=6$), and the average value of the peak areas was plotted against the concentrations. Curves were adjusted for linear regression with the least mean squares method. All the calibration plots in the concentration range studied were linear and with correlation coefficients (r^2) higher than 0.9997, as shown in Table 1.

Precision and Accuracy

In order to determine the intra-day precision and accuracy of the method, four known concentrations (0.5, 5, 25, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of each drug were analysed on the same day ($n=6$). Inter-day precision and accuracy were also evaluated over five consecutive days by performing six successive injections each day of the same concentrations. The results are

TABLE 1 Linear Regression Data and the Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ) for PIP, LEV, NOR, and MOX

Analyte	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Pipemidic Acid	2.67 \pm 0.19	-0.27 \pm 0.16	0.9998	8	28
Levofloxacin	0.83 \pm 0.03	-0.149 \pm 0.021	0.9997	56	171
Norfloxacin	2.47 \pm 0.14	-0.09 \pm 0.07	0.9999	33	100
Moxifloxacin	0.405 \pm 0.024	-0.0199 \pm 0.016	0.9999	14	43

summarized in Table 2. The low variability and high precision of the results obtained in different days are evident, which indicate the usefulness of the method.

Limits of Detection and Quantification

The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for PIP, LEV, NOR, and MOX ($n = 10$) were determined with the 3.3s and 10s criterion, respectively, using a series of 10 solutions containing a low concentration. The results were based not only on the standard deviation of the response, but also on the slope of a specific calibration curve containing the analyte. Both LODs and LOQs are summarised in Table 1 according to the ICH harmonised tripartite guideline.^[33] The values of the limits obtained were in the ng/mL range being sensitive enough for routine analysis.

Robustness

The robustness of the method was evaluated in terms of SDS (M), percentage of 1-propanol (%) (v/v), pH, percentage of thiethylamine (%) (v/v), and the flow rate of the mobile phase by six replicate injections of a standard solution at 5 µg/mL. The RSD (%) of the retention times

TABLE 2 Inter-Day and Intra-Day Precision and Accuracy of Analytes

Analyte	Concentration Added (µg/mL)	Found ^a (mean ± SD) (µg/mL)	Accuracy (%)	Intra-Day C.V. (%)	Found ^b (mean ± SD) (µg/mL)	Accuracy (%)	Inter-Day C.V. (%)
Pipemidic Acid	0.5	0.505 ± 0.008	1.6	2.1	0.501 ± 0.007	0.3	3.0
	5	4.97 ± 0.15	0.6	3.2	5.00 ± 0.08	0.1	5.1
	25	24.75 ± 0.13	1.0	0.5	24.7 ± 0.3	0.4	3.9
	50	50.17 ± 0.19	0.3	0.4	50.11 ± 0.18	0.2	5.2
Levofloxacin	0.5	0.4888 ± 0.0011	2.2	0.4	0.499 ± 0.010	0.2	2.8
	5	4.88 ± 0.08	2.3	1.7	5.03 ± 0.09	0.6	4.9
	25	24.51 ± 0.14	2.0	0.6	25.2 ± 0.4	0.7	6.4
	50	50.3 ± 0.6	0.6	1.0	50.16 ± 0.13	0.3	6.3
Norfloxacin	0.5	0.505 ± 0.006	1.0	0.1	0.498 ± 0.006	0.3	2.4
	5	4.90 ± 0.17	1.9	3.5	4.99 ± 0.08	0.1	4.7
	25	25.20 ± 0.06	0.8	0.3	24.9 ± 0.5	0.4	3.9
	50	49.9 ± 0.3	0.2	0.7	50.05 ± 0.13	0.1	5.4
Moxifloxacin	0.5	0.495 ± 0.007	1.0	1.4	0.496 ± 0.007	0.6	4.6
	5	4.89 ± 0.06	2.1	1.3	4.97 ± 0.03	0.6	4.3
	25	24.4 ± 0.3	2.3	1.2	24.85 ± 0.14	0.6	4.4
	50	50.1 ± 0.9	0.2	1.8	50.15 ± 0.14	0.3	4.3

^a $n = 6$, ^b $n = 5$.

calculated from these variations is shown in Table 3 and was lower than 11.0%. Variation of the flow rate values (0.9, 1, 1.1 mL/min) had a stronger influence on the retention of the studied compounds than other parameters. However, the variations in all the parameters had no significant effect on resolution, peak area and peak shape.

Analysis of Pharmaceutical Formulations

The contents of nineteen pharmaceutical formulations, commercially available in Spain, were determined. Calibration curves were constructed by measuring the areas of the chromatographic peaks of the duplicate injections of the PIP, LEV, NOR, and MOX solutions at five increasing concentrations in the 1–25 µg/mL range. For each drug, six injections were

TABLE 3 Evaluation of the Robustness of the MLC Method

Chromatographic changes	t_R (min)				
	Level	PIP	LEV	NOR	MOX
A: Flow rate (mL/min)					
0.9	-0.1	7.7	7.4	11.3	10.23
1	0	7.6	6.7	10.08	9.06
1.1	+0.1	6.7	6.10	9.18	8.24
Mean ± SD		7.7 ± 0.7	6.7 ± 0.7	10.2 ± 1.0	9.2 ± 1.0
RSD (%)		9.7	10.0	10.3	10.9
B: SDS concentration (M)					
0.145	-0.05	7.7	6.8	10.3	9.23
0.15	0	7.6	6.7	10.08	9.06
0.155	+0.05	7.6	6.7	10.06	9.08
Mean ± SD		7.64 ± 0.03	6.76 ± 0.08	10.17 ± 0.16	9.13 ± 0.09
RSD (%)		0.34	1.12	1.6	1.01
C: Percentage of propanol (v/v)					
2.4	-0.1	8.3	7.3	11.20	9.9
2.5	0	7.6	6.7	10.08	9.06
2.6	+0.1	6.07	6.7	10.0	9.3
Mean ± SD		7.8 ± 0.4	6.9 ± 0.3	10.4 ± 0.7	9.3 ± 0.5
RSD (%)		5.21	4.8	6.4	5.7
D: pH of mobile phase					
2.9	-0.1	7.7	6.7	10.19	9.14
3	0	7.6	6.7	10.08	9.06
3.1	+0.1	7.7	6.7	10.21	9.11
Mean ± SD		7.65 ± 0.03	6.734 ± 0.021	10.16 ± 0.07	9.10 ± 0.04
RSD (%)		0.3	0.3	0.7	0.4
E: Percentage of TEA (v/v)					
0.45	-0.05	7.7	6.7	10.18	9.10
0.5	0	7.6	6.7	10.08	9.06
0.55	+0.05	7.6	6.7	10.11	9.02
Mean ± SD		7.63 ± 0.03	6.721 ± 0.014	10.13 ± 0.05	9.06 ± 0.04
RSD (%)		0.4	0.2	0.5	0.5

performed using 10 µg/mL of each compound. Figure 3 illustrates the chromatograms of the pharmaceuticals: pipemidic acid (a), levofloxacin (b), norfloxacin (c), and moxifloxacin (d). The excipients were eluted with the dead time or did not absorb at the measuring wavelength.

The labelled composition of the formulations, recoveries, and CV (%) values are shown in Table 4. The label claim percentage values were in the 96–106% range and the coefficient of variation in the range of 0.2–1.8%. As observed, the results obtained are in accordance with the labelled values.

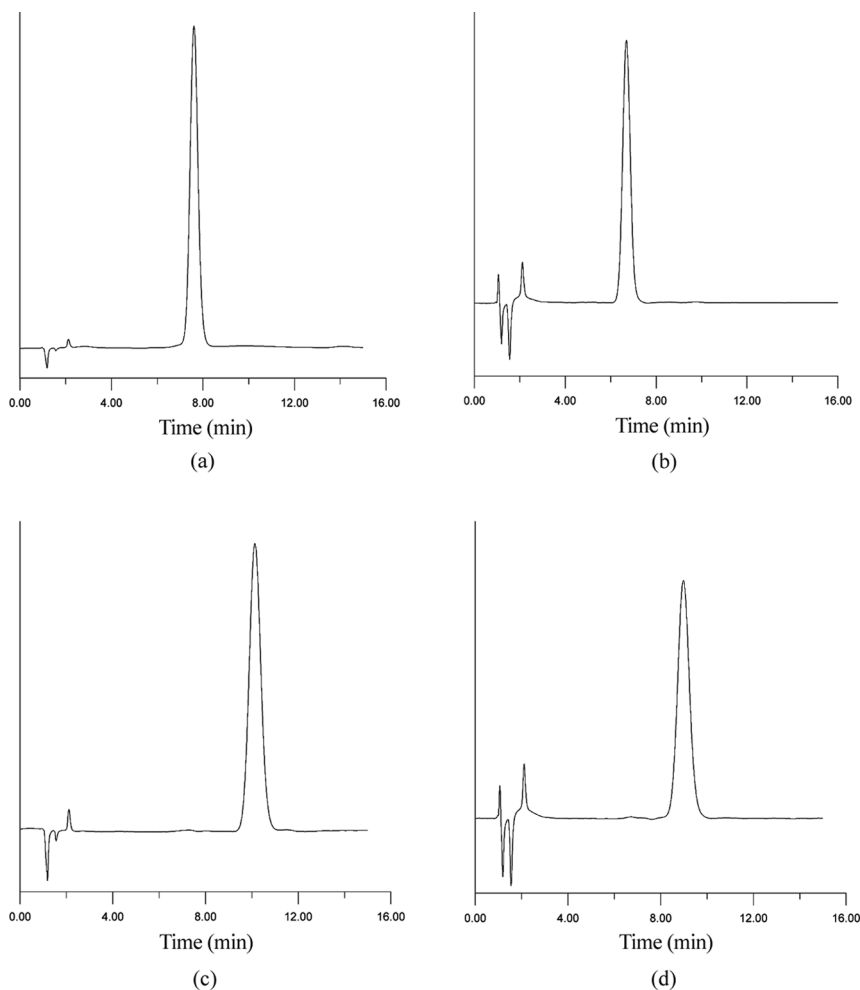


FIGURE 3 Chromatogram of (a) pipemidic acid (Nuril, 400 mg), (b) levofloxacin (Stada, 500 mg), (c) norfloxacin (Sadoz, 400 mg), and (d) moxifloxacin (Actira, 400 mg) pharmaceutical application (10 µg/mL). Mobile phase: 0.15 M SDS –2.5% 1-propanol –0.5% thiethylamine – pH 3, flow rate: 1 mL/min, UV detection at 276 nm.

TABLE 4 Recoveries of Pharmaceutical Formulations (n = 6)

Pharmaceutical (Laboratory)	Composition (mg)	Found (mg)	Label Claim (%)	C.V. (%)
Urisan	Per capsule: Pipemidic acid (400), excipients	415 ± 7	103.7	1.7
Galusan	Per capsule: Pipemidic acid (400), excipients	420 ± 8	104.9	1.8
Nuril	Per capsule: Pipemidic acid (400), excipients	421 ± 4	105.3	0.8
Normon	Per tablet: Levofloxacin (500), excipients	500.0 ± 1.7	100.0	0.3
Stada	Per tablet: Levofloxacin (500), excipients	485 ± 3	96.8	0.6
Tavanic	Per tablet: Levofloxacin (500), excipients	483.7 ± 1.0	96.7	0.21
Amicrobin	Per capsule: Norfloxacin (400), excipients	417.6 ± 1.3	104.4	0.3
Stada	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	407.0 ± 1.8	101.7	0.4
Nalion	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	423.7 ± 1.9	105.9	0.4
Uroctal	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	422.2 ± 1.3	105.5	0.3
Noroxin	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	383.9 ± 1.7	96.0	0.4
Norflok	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	420.3 ± 0.7	105.1	0.17
Normon	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	393.5 ± 0.6	98.4	0.6
Sadoz	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	393 ± 4	98.3	1.14
Bexal	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	421.0 ± 1.5	105.3	0.4
Esclebin	Per tablet: Norfloxacin (400), excipients	384.7 ± 1.8	96.2	0.5
Octegra	Per tablet: Moxifloxacin (400), excipients	394.4 ± 1.9	98.6	0.5
Proflox	Per tablet: Moxifloxacin (400), excipients	406.8 ± 1.6	101.7	0.4
Actira	Per tablet: Moxifloxacin (400), excipients	413 ± 6	103.3	1.3

CONCLUSIONS

The analytical method developed can be used to simultaneously separate and quantify an antibiotic mixture consisting of pipemidic acid, levofloxacin, norfloxacin, and moxifloxacin. Good sensitivity, linearity, and robustness were obtained. RSD values were lower than 2% and 6.4% for intra- and inter-day analyses, respectively. The recoveries in the

pharmaceutical samples were within a range of 96–106%, and no interferences from excipients were observed.

The proposed method is fast, precise, accurate, sensitive, and efficient, and the pharmaceutical formulation of the individual antibiotics studied in this research work can be routinely analysed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects P1-1B2006-12 and CTQ2007-64473/BQU, funded by Foundation Caixa Castelló-Bancaixa-Universitat Jaume I and the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), respectively. Maria Rambla-Alegre also wishes to thank the MEC for the FPU grant.

REFERENCES

1. Leshner, G.Y.; Froelich, E.D.; Gruet, M.D.; Bailey, J.H.; Brudage, R.P. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 1063–1068.
2. Jackson, L.C.; Machado, L.A.; Hamilton, M.L. *Acta Medica.* **1998**, *8*, 5–8.
3. American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, 1988.
4. Hernández-Arteros, J.A.; Companó, R.; Ferrer, R.; Prat, M.D.D. *Analyst.* **2000**, *125*, 1155–1158.
5. Fan, Y.; Gan, X.; Li, S.; Qin, W. *Electrophoresis.* **2007**, *28*, 4101–4107.
6. Sun, H.; Zharo, W.; He, P. *Chromatographia.* **2008**, *68*, 425–429.
7. Ferdig, M.; Kaleta, A.; Vo, T.D.T.; Buchberger, W. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1047*, 305–311.
8. Holtzapfle, C.K.; Buckley, S.A.; Stanker, L.H. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2963–2968.
9. Yue, Z.; Lin, X.; Tang, S.; Chen, X.; Ji, C.; Hua, H.; Liu, Y. *Chin. J. Chromatogr. (Se Pu).* **2007**, *25*, 491–495.
10. Hernando, M.D.; Mezcuca, M.; Suárez-Barcelona, J.M.; Fernández-Alba, A.R. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *562*, 176–184.
11. Romero-González, R.; López-Martínez, J.C.; Gómez-Milán, E.; Garrido-Frenich, A.; Martínez-Vidal, J.L. *J. Chromatogr. B.* **2007**, *857*, 142–148.
12. Hermo, M.P.; Nemetlu, E.; Kir, S.; Barrón, D.; Barbosa, J. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *613*, 98–107.
13. Cañada-Cañada, F.; Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz-Peña, A. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1242–1249.
14. Santoro, M.I.R.M.; Kassab, N.M.; Singh, A.K.; Kedor-Hackman, E.R.M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 179–184.
15. Shervington, L.A.; Abba, M.; Hussain, B.; Donnelly, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 769–775.
16. Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Salinas, F.; González-Gómez, D. *Talanta.* **2004**, *62*, 853–860.
17. Vílchez, J.L.; Araujo, L.; Prieto, A.; Navalón, A. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *516*, 135–140.
18. Vybíralová, Z.; Nobilis, M.; Zoulova, J.; Kvetina, J.; Petr, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 851–858.
19. Tatar Ulu, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 320–324.
20. Barbato, F.; di Martino, G.; Grumetto, L.; la Rotonda, M.I. *European J. Pharm. Sci.* **2007**, *30*, 211–219.
21. Christodoulou, E.A.; Samanidou, V.F.; Papadoyannis, I.N. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 119–127.
22. Zhao, S.J.; Jiang, H.Y.; Ding, S.Y.; Wang, G.Q.; Li, C.; Shen, J.Z. *Chromatographia.* **2007**, *65*, 539–544.
23. Christodoulou, E.A.; Samanidou, V.F.; Papadoyannis, I.N. *J. Chromatogr. B.* **2007**, *859*, 246–255.
24. Marazueta, M.D.; Moreno-Bondi, M.C. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1034*, 25–32.
25. Huang, J.F.; Lin, B.; Yu, Q.W.; Feng, Y.Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1228–1235.
26. Rodríguez-Díaz, R.C.; Aguilar-Caballos, M.P.; Gomez-Hens, A. *Anal. Letts.* **2004**, *37*, 1163–1175.

27. Seifrtová, M.; Pena, A.; Lino, C.M.; Solich, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 799–805.
28. Berthod, A.; García-Álvarez-Coque, M.C. *Micellar Liquid Chromatography*; Marcel-Dekker, Inc.: New York, USA, 2000.
29. Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J.; García-Álvarez-Coque, M.C. *Analyst.* **1998**, *123*, 301–306.
30. Ruiz-Ángel, M.J.; Gil-Agustí, M.T.; Esteve-Romero, J.; Carda-Broch, S. *LC-GC Europe.* **2004**, *18*, 32–40.
31. Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J.; García-Álvarez-Coque, M.C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 803–817.
32. Carda-Broch, S.; Gil-Agustí, M.T.; Monferrer-Pons, L.I.; Esteve-Romero, J. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1156*, 254–258.
33. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A> (30.04.09)
34. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*; Pharmaceutical Press: London, UK, 2004.
35. Moxifloxacin, Tuberculosis **2008**, *88*, 127–131.
36. Levofloxacin, Tuberculosis **2008**, *88*, 119–121.
37. Torres-Lapasió, J.R.; García-Álvarez-Coque, M.C.; Baeza-Baeza, J.J. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *348*, 187–196.
38. Torres-Lapasió, J.R. *Michrom Software*; Marcel-Dekker, Inc.: New York, USA, 2000.

Determination of sulfonamides in milk after precolumn derivatisation by micellar liquid chromatography

Mónica Ana Raviolo^b, Maria Rambla-Alegre^a, Jenifer Clausell-Tormos^c,
Maria-Elisa Capella-Peiró^a, Samuel Carda-Broch^a, Josep Esteve-Romero^{a,*}

^a Àrea de Química Analítica, Q.F.A., Universitat Jaume I, Campus Riu Sec, 12080 Castelló, Spain

^b Dpto. de Farmacia, Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

^c Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS), Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Received 27 February 2007; received in revised form 30 April 2007; accepted 2 May 2007

Available online 6 May 2007

Abstract

A simple method to identify and determine six sulfonamides (sodium sulfacetamide, sulfamethizole, sulfaguanidine, sulfamerazine, sulfathiazole and sulfamethoxazole) in milk by micellar liquid chromatography (MLC) is reported. The assay makes use of a precolumn diazotisation-coupling derivatisation including the formation of an azo dye that can be detected at 490 nm. Furthermore, the use of MLC as an analytical tool allows the direct injection of non-purified samples. The separation was performed with an 80 mM SDS-8.5% propanol eluent at pH 7. Analysis times are below 16 min with a complete resolution. Linearities ($r > 0.9999$), as well as intra- and inter-day precision (below 2.7%), were studied in the validation of the method. The limits of detection and quantification ranged from approximately 0.72 to 0.94 and 2.4 to 3.1 ng mL⁻¹, respectively. The detection limit was below the maximum residue limit established by the European Community. Finally, recoveries in spiked milk samples were in the 83–103% range.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sulfonamides; Azo dye precolumn derivatisation; Micellar liquid chromatography; Milk

1. Introduction

Sulfonamides are widely used to prevent and control a number of veterinary diseases, such as gastrointestinal and respiratory infections, as well as growth-promoting purposes and as a prophylactic [1–4]. When inappropriate abusive antibiotic-based treatments are applied to treat livestock diseases, undesirable residues can remain in both the animal tissues and biofluids, including milk. These residues are a great public health concern due to the risk of developing drug resistance, which leads to an inefficiency of this medicine for therapeutic use [5,6]. Consequently, in order to prevent health problems, the European Community has adopted a maximum sulfonamide residue level of 100 µg of total sulfonamides kg⁻¹ in edible animal tissue, including milk [5]. Therefore, the determination of such residues in meat and other animal by-products, such as

milk used for human consumption, has become an important task.

Several analytical methods have been developed to determine sulfonamides in animal tissue and biofluids using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV, fluorescence, or mass spectrometry [2,4,7,8–11]. Other methods include gas chromatography [12,13], capillary zone electrophoresis [3,14,15] and micellar electrokinetic capillary chromatography [16]. The difficulties involved in the analysis of complex biological matrices are the presence of interferences that are co-extracted. For this reason, the methods mentioned above need previous treatment of the sample, which includes several steps, such as extraction with organic solvent [4,13], solid-phase extraction [1,7] or centrifugal ultrafiltration [9,17]. The sample treatment can generate variable and low recoveries and, moreover, this process can be toxic due to the use of methylene chloride, acetonitrile, and methanol for the extraction and/or mobile phase of the HPLC.

Micellar liquid chromatography (MLC) is an alternative method to HPLC [18–20]. In MLC, the mobile phase is

* Corresponding author. Tel.: +34 964 728092; fax: +34 964 728066.

E-mail address: josep.esteve@qfa.uji.es (J. Esteve-Romero).

composed of a surfactant at a higher concentration than the critical micellar concentration and an organic modifier, such as propanol, butanol or pentanol, which decrease the retention factor and increase efficiency. The exact prediction of any solute retention is possible through micellar mobile phases by utilising models that could also be used to optimise the separation of solute mixtures [21,22]. One of the main advantages that MLC offers is the possibility of determining drugs in complex matrices without previously having to extract the proteins present in the different samples. In recent years, MLC has proved to be a useful technique in the analysis of diverse groups of substances in different matrices [23–26]. MLC uses mobile phases that are non-toxic, non-flammable, biodegradable and relatively inexpensive in comparison to other methods.

On the other hand, the sulfonamides are arylamines and contain a primary aromatic amine (Fig. 1). For this reason they can be derivatised and quantified in the visible band, by the formation of azo dyes using the diazotisation-coupling reaction. Derivatisation [27,28] includes a first reaction of diazotisation with sodium nitrite, a second step for elimination of excess sodium nitrite by reaction with sulfamic acid, and finally coupling with the Bratton–Marshall reagent [*N*-1(naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride or NED]. The use of a micellar medium of sodium dodecyl sulfate (SDS) offers some advantages such as the fact that it requires no changes in pH, decreases reaction times and enhances the molar absorption of the azo dyes [29–31].

The present paper describes a procedure for simplified sample preparation for simultaneous determination of six sulfonamides in milk. The strategy of forming chromogen sulfonamides together with the use of micellar liquid chromatography increases selectiveness in biological matrices. Moreover, MLC is used as an analytical method allowing direct injection of

non-purified samples. It is fast, selective, economical and does not cause any environmental pollution. In consequence, it offers important savings in costs and labour.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The sulfonamides studied were: sodium sulfacetamide, sulfamethizole, sulfaguandine, sulfamerazine, sulfathiazole and sulfamethoxazole, all from Sigma (St. Louis, USA). The sodium nitrite, sulfamic acid, *N*-(1-naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride, sodium dodecyl sulfate, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, disodium hydrogenphosphate, sodium dihydrogenphosphate, hydrochloric acid and sodium hydroxide used were from Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions and mobile phases were prepared in ultrapure water (Millipore S.A.S., Molsheim, France). The solutions and the mobile phases were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Micron Separations, Westboro, MA, USA).

2.2. Instrumentation

The chromatographic system used for the optimisation procedure and for validation of the method was an Agilent Technologies model 1100 (Palo Alto, CA, USA). It was equipped with a quaternary pump, an autosampler with 2 mL vials fitted with a Rheodyne valve (Cotati, CA, USA), and a diode array detector (range 190–700 nm). A Kromasil 100 C18 column (5 μm particle size, 250 mm \times 4.6 mm i.d., from Scharlab (Barcelona, Spain) thermostated at 25 $^{\circ}\text{C}$ was used in the separations. The flow rate, injection volume and wavelength detection were 1 mL min^{-1} , 20 μL and 490 nm, respectively. The signal

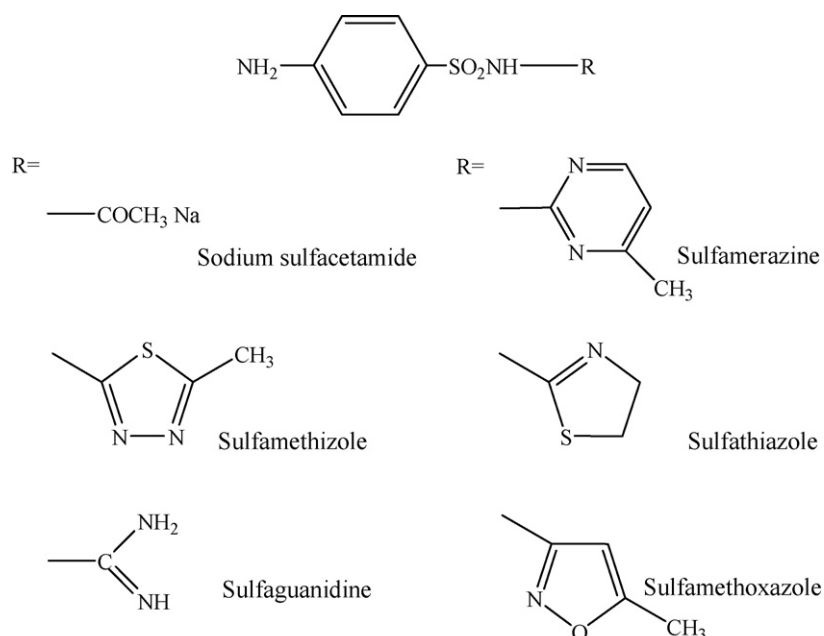


Fig. 1. Structure of the sulfonamides.

was acquired by a personal computer connected to the chromatograph by means of a Hewlett Packard Chemstation. Michrom software [21,22] was used for chromatographic data treatment. A GLP 22 potentiometer (Crison, Barcelona) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode was used to perform pH measurements. The analytical balance used was a Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland).

2.3. Preparation of solutions, samples and mobile phases

For optimisation studies, stock solutions ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) of each sulfonamide were prepared in water. For application studies, commercial milk was purchased in the local market and fortified with the sulfonamides; it was then injected into the chromatograph without any pretreatment other than derivatisation and filtration. Stock and milk solutions were stored at 4°C .

The micellar mobile phase was prepared using SDS, which was buffered with disodium hydrogenphosphate 10 mM at pH 7 using 100 mM of sodium hydroxide, and 1-propanol, 1-butanol or 1-pentanol was added to achieve the desired concentration.

2.4. Derivatisation procedure

Different volumes from the solutions of sulfonamides (water or milk) were introduced into a 25 mL volumetric flask, together with 10 mL of a 50 mM SDS–150 mM HCl solution and 1 mL of 100 mM sodium nitrite. After 5 min, 1 mL of 300 mM sulfamic acid was added and the mixture was left to react for an additional 10 min. Finally, 0.5 mL of 30 mM NED was added, and the volume was completed with water. The azo dyes were formed immediately and were stable for at least 1 month, with the exception of sodium sulfacetamide. The degradation of this compound was observed by the attenuation of the chromatographic peak and the appearance of a second peak. For this reason, the sulfacetamide azo dye was always injected within 1 h of its preparation, and under these conditions only one peak was observed.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation strategy and mobile phase selection

In order to find the best composition of the mobile phase that allows the simultaneous analysis of the six sulfonamides considered in this study, each of them was injected in mobile phases at pH 7 containing SDS (mM)/modifier (% , v/v): SDS/pentanol (50/1, 50/5, 100/3, 100/5, 125/3, 150/1, 150/3, 150/5), SDS/butanol (50/1, 50/4, 50/7, 75/5.5, 100/4, 100/7, 150/1, 150/7), SDS/propanol (50/2.5, 50/12.5, 100/2.5, 100/7.5, 125/5, 150/2.5, 150/7.5, 150/12.5). From the peaks that were obtained in these mobile phases, measurements of different parameters for each of the sulfonamides were determined, namely, capacity factor (k), efficiency (N) and asymmetry factor (B/A). These data were used together with a mathematical model (Eq. (1)) and an interpretative optimization procedure to predict

the chromatogram resolution of the six sulfonamides [19].

$$k = \frac{K_{AS}(1/1 + K_{AD}\phi)}{1 + K_{AM}(1 + K_{MD}\phi/1 + K_{AD}\phi)[M]} \quad (1)$$

When pentanol and butanol were used, overlapping of some of the compounds took place, whereas propanol allows the complete resolution of the six sulfonamides. Using SDS–propanol mobile phases and under the criteria of maximum resolution–minimum analysis time, the mobile phase that was selected as being optimal was 80 mM SDS–8.5% (v/v) propanol–pH 7. In this mobile phase, the parameter values for each sulfonamide (t_{ret} , k , N and B/A) were 4.5, 1.7, 2300, 1.2 for sodium sulfacetamide; 5.0, 2.1, 1800, 1.1 for sulfamethizole; 7.0, 3.4, 1600, 1.1 for sulfaguanidine; 9.9, 5.2, 1700, 1.1 for sulfamerazine; 11.6, 6.5, 1000, 1.0 for sulfathiazole and 13.2, 7.3, 1700, 1.3 for sulfamethoxazole, respectively.

3.2. Milk blank behaviour

When milk blanks are injected directly into a micellar chromatographic system consisting of 80 mM SDS–8.5% (v/v) propanol–pH 7, and the wavelength used for the detection is 260 nm, (maximum absorption of sulfonamides without derivatisation), the chromatogram (Fig. 2a) shows bigger peaks at short times (below 4 min) for the main components of milk, including proteins [32]. On the other hand, the chromatogram of the same milk matrix treated with the diazotisation and coupling derivatisation, detected at 490 nm in this case, corresponding to the maximum absorption of derivatised sulfonamides buffered at pH 7, shows three small peaks at 1.5, 2.0, and 3.6 (Fig. 2b). Note the change of scale because in the scale in Fig. 2a, the three peaks from Fig. 2b are minimised. These three peaks must be assigned to some endogenous compounds that undergo derivatisation or display a yellow colour but, in any case, the important thing is that these peaks did not interfere with the determination of the sulfonamides. Fig. 2c shows a spiked milk sample containing 25 ng mL^{-1} of each sulfonamide that was derivatised.

3.3. Method validation

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks (triplicate injections) obtained at nine different concentrations, in the range $0.2\text{--}20 \mu\text{g mL}^{-1}$ for sodium sulfacetamide, sulfamethizole, sulfamerazine and sulfamethoxazole and eight concentrations, in the range $0.2\text{--}10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for sulfaguanidine and sulfathiazole. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) for sulfonamides were determined with the 3 s and 10 s criteria, respectively, using 10 injections of a milk blank. Table 1 shows the slopes, intercepts, and regression coefficients of the calibration curves, LOD and LOQ. As shown in this table, satisfactory regression coefficients ($r > 0.9999$) for the calibration curves were obtained. Moreover, the LOD of each sulfonamide ranged from approximately 0.72 to 0.94 ng mL^{-1} , values that were below the maximum residue limit established by the European Community [5] and were comparable to or even better than reported methods [4,17,32].

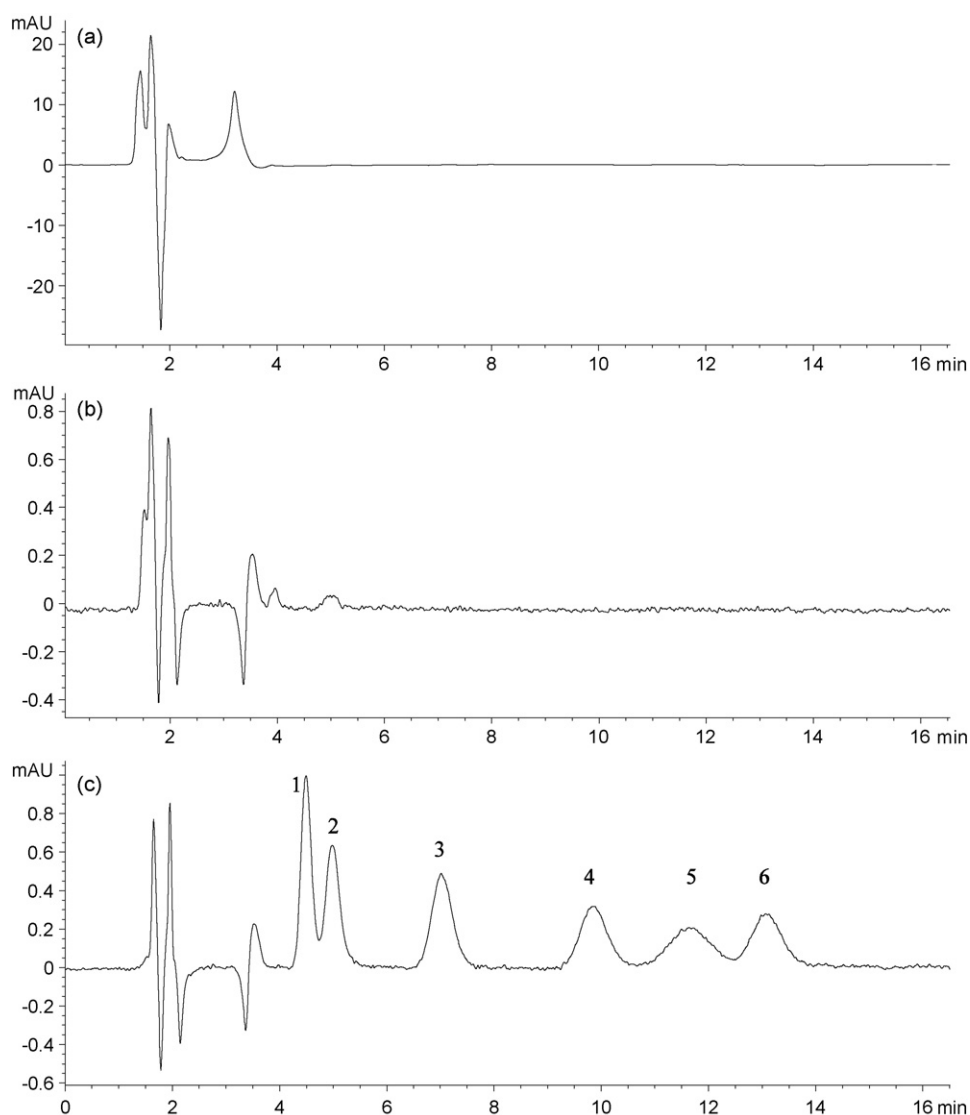


Fig. 2. Chromatograms obtained from milk samples: (a) blank milk at 260 nm; (b) blank milk treated with the diazotization and coupling reagents at 490 nm; (c) milk spiked with 25 ng mL^{-1} of each sulfonamide. Sulfonamides and retention times (min) were: (1) sodium sulfacetamide, 4.5, (2) sulfamethiazole, 5.0, (3) sulfaguandine, 7.0, (4) sulfamerazine, 9.9, (5) sulfathiazole, 11.6, and (6) sulfamethoxazole, 13.2.

Precision, defined as the relative standard deviation or coefficient of variation, was determined by intra and inter assays. These were determined at low, medium and high concentrations, according to the calibration curve ranges (Table 2). Intra-day precision was calculated by measuring the areas of the peaks obtained from 10 injections of three test solutions

on the same day, and intra-assay values were taken on 10 days over a 3-month period, at three different drug concentrations. As shown in Table 2, the overall mean precision, defined as the percentage of the relative standard deviation (% C.V.), was 0.41–2.65% and 0.27–3.72% for intra- and inter-day values, respectively.

Table 1

Parameters of the calibration curves: slope, intercept, regression coefficient (r), limit of detection (LOD, ng mL^{-1}) and quantification (LOQ, ng mL^{-1}) for the sulfonamides studied

Compound	Slope ^a	Intercept ^a	n	r	LOD	LOQ
Sulfacetamide	109.846 ± 0.286	-3.274 ± 2.422	9	0.9999	0.82	2.7
Sulfamethizole	109.934 ± 0.071	-4.942 ± 0.571	9	0.9999	0.82	2.7
Sulfaguandine	124.537 ± 0.112	-5.333 ± 0.600	8	0.9999	0.72	2.4
Sulfamerazine	96.095 ± 0.182	1.204 ± 1.531	9	0.9999	0.94	3.1
Sulfathiazole	121.833 ± 0.115	-4.117 ± 0.620	8	0.9999	0.74	2.5
Sulfamethoxazole	113.034 ± 0.149	0.772 ± 1.190	9	0.9999	0.79	2.7

^a Average \pm standard deviation of n measurements.

Table 2
Intra- and inter-day precision (%C.V.)

Compound	Intra			Inter		
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₁	c ₂	c ₃
Sulfacetamide	2.26	1.61	1.08	1.64	0.52	0.27
Sulfamethizole	1.53	0.71	0.83	3.72	0.63	0.29
Sulfaguanidine	1.91	0.85	0.83	2.53	1.05	0.41
Sulfamerazine	1.94	0.41	0.98	3.14	0.98	0.33
Sulfathiazole	2.65	0.92	0.52	2.66	0.82	1.45
Sulfamethoxazole	1.72	0.67	0.49	2.06	0.77	0.65

c₁, c₂ and c₃ were 0.4, 6 and 17.5 µg mL⁻¹ for sulfacetamide, sulfamethizole, sulfamerazine and sulfamethoxazole and 0.4, 6 and 10 µg mL⁻¹ for sulfaguanidine and sulfathiazole.

Table 3
Recovery of sulfonamides spiked samples (n = 10), by triplicate measurements at three different spiking levels in milk samples

Compound	Recovery (%) ^a		
	c ₁	c ₂	c ₃
Sulfacetamide	99.60 ± 1.94	97.30 ± 0.73	94.93 ± 0.97
Sulfamethizole	101.43 ± 0.70	91.73 ± 1.51	97.67 ± 1.20
Sulfaguanidine	95.03 ± 5.93	90.47 ± 3.25	83.68 ± 1.63
Sulfamerazine	99.47 ± 0.75	98.53 ± 1.37	103.00 ± 0.65
Sulfathiazole	95.14 ± 3.68	93.76 ± 0.18	100.56 ± 1.55
Sulfamethoxazole	92.97 ± 1.68	95.53 ± 1.44	95.07 ± 3.57

^a Average ± standard deviation of triplicate measurements; c₁, c₂ and c₃ were 0.4, 6 and 17.5 µg mL⁻¹ for sulfacetamide, sulfamethizole, sulfamerazine and sulfamethoxazole and 0.4, 6 and 10 µg mL⁻¹ for sulfaguanidine and sulfathiazole.

3.4. Analysis of spiked milk samples

The sample recovery of this newly developed procedure was examined by adding sulfonamides to sulfonamide-free milk samples and then evaluating them. Table 3 summarises the recoveries from milk samples (n = 10), by triplicate measurements at three different spiking levels: 0.4, 6, and 17.5 µg mL⁻¹ for sodium sulfacetamide, sulfamethizole, sulfamerazine and sulfamethoxazole and 0.4, 6 and 10 µg mL⁻¹ for sulfaguanidine and sulfathiazole. Good recoveries ranging from 83.68 to 103.00% were determined, which means that this sample preparation method was suitable for the analysis of sulfonamide in milk samples.

4. Conclusions

The method proposed in this work offers several advantages. Derivatisation of sulfonamides with NED is simple, fast and reproducible, with absorptivities at visible wavelengths that improve the signal-to-noise ratio when dealing with complex samples (e.g. milk). This method does not require complex procedures such as sample extraction and/or sample cleaning, and there is no need for large volumes of samples and solvents. Results indicate that the procedure described here is useful for the screening and quantification of the six sulfonamides in milk. Analysis times are below 16 min, with LODs and LOQs that are smaller than or similar to the values reported in the literature. Finally, it can be concluded that our method of MLC is sim-

ple, has a low degree of toxicity and the risk of polluting the environment by using organic solvents is reduced.

Acknowledgements

This work was supported by the *Fundació Caixa Castelló-Bancaixa* project P1-1B2006-12. Mónica Ana Raviolo is also grateful to this foundation for her grant. Maria Rambla-Alegre thanks also MEC for the FPU grant.

References

- [1] D.E. Dixon Holland, S.E. Katz, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74 (1991) 784.
- [2] C. Cavaliere, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 558.
- [3] M.R.S. Fuh, S.Y. Chu, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 215.
- [4] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 259.
- [5] Establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Council Regulation No. 2377/90 of EEC.
- [6] 22nd FAO Regional Conference for Europe, July 2000.
- [7] C. Hartig, T. Storm, M. Jekel, J. Chromatogr. A 854 (1999) 163.
- [8] N. Furusawa, J. Chromatogr. A 898 (2000) 185.
- [9] N. Furusawa, Biomed. Chromatogr. 15 (2001) 235.
- [10] G. Stoev, A. Michailova, J. Chromatogr. A 871 (2000) 37.
- [11] Y. Wen, M. Zhang, Q. Zhao, Y.Q. Feng, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 8468.
- [12] G. Carignan, K. Carrier, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74 (1991) 479.
- [13] J.A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer, J. Chromatogr. B 729 (1999) 127.
- [14] M.T. Ackermans, J.L. Beckers, F.M. Everaerts, H. Hoogland, M.J.H. Tomassen, J. Chromatogr. A 596 (1992) 101.
- [15] A.L. Bricio Santos, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, Electrophoresis 26 (2005) 1567.
- [16] C.E. Lin, W.C. Lin, Y.C. Chen, S.W. Wang, J. Chromatogr. A 792 (1997) 37.
- [17] N. Furusawa, K. Kishida, J. Fresenius, J. Anal. Chem. 371 (2001) 1031.
- [18] D.W. Armstrong, F. Nome, Anal. Chem. 53 (1981) 1662.
- [19] A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, Micellar Liquid Chromatography, Marcel-Dekker, New York, USA, 2000.
- [20] J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Gil-Agustí, M. Capella-Peiró, D. Bose, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 75.
- [21] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, J.J. Baeza-Baeza, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 187.
- [22] J.R. Torres-Lapasió, Michrom Software, Marcel-Dekker, New York, USA, 2000.
- [23] A. Martinavarro-Domínguez, M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, J. Marcos-Tomas, J. Esteve-Romero, Clin. Chem. 48 (2002) 1696.
- [24] M.E. Capella-Peiró, D. Bose, A. Martinavarro-Domínguez, M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, J. Chromatogr. B 780 (2002) 241.
- [25] M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, Anal. Biochem. 309 (2002) 261.
- [26] M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, A. Martinavarro-Domínguez, J. Esteve-Romero, Chromatographia 57 (2003) 51.
- [27] J. March, March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure, fifth ed., Wiley-Interscience, New York, USA, 2001.
- [28] L.G. Wade Jr., Organic Chemistry, fourth ed., Prentice Hall, New Jersey, USA, 1999.
- [29] M.C. Garcia-Alvarez-Coque, E.F. Simo-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J. Esteve-Romero, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 237.
- [30] E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, J. Chromatogr. B 670 (1995) 183.
- [31] J. Esteve-Romero, E.F. Simó-Alfonso, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, G. Ramis-Ramos, Trends Anal. Chem. 14 (1995) 29.
- [32] R.D. Caballero, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 24 (2001) 117.

Quinolones control in milk and eggs samples by liquid chromatography using a surfactant-mediated mobile phase

M. Rambla-Alegre · M. A. Collado-Sánchez ·
J. Esteve-Romero · S. Carda-Broch

Received: 12 August 2010 / Revised: 15 October 2010 / Accepted: 2 November 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Four quinolones (danofloxacin, difloxacin, flumequine and marbofloxacin) were determined in milk and egg samples by a simplified high-performance liquid chromatographic procedure using a micellar mobile phase. No extraction was needed to precipitate the proteins from the matrices since they were solubilised in micelles. The only pretreatment steps required were homogenisation, dilution and filtration before injecting the sample into the chromatographic system. An adequate resolution of the quinolones was achieved by a chemometrics approach where retention was modelled as a first step using the retention factors in only five mobile phases. Afterwards, an optimisation criterion was applied to consider the position and shape of the chromatographic peaks. Analytical separation involved a C18 reversed-phase column, a hybrid micellar mobile phase of 0.05 M sodium dodecyl sulphate, 10% (v/v) butanol and 0.5% (v/v) triethylamine buffered at pH 3 and fluorimetric detection. Quinolones were eluted in less than 15 min without the protein band or other endogenous compounds from the food matrices interfering. The calculated relevant validation parameters, e.g., decision limit (CC_{α}), detection capability (CC_{β}), repeatability, within-laboratory reproducibility, recoveries and robustness, were acceptable and complied with European Commission Decision 2002/657/EC. Finally, the proposed method was successfully employed in quantifying the four quinolones in spiked egg and milk samples.

Keywords Quinolone · Micellar liquid chromatography · Food samples · Egg · Milk · Validation

Introduction

Veterinary drugs have become an integral part of livestock production and play an important role in maintaining animal welfare, mainly for disease prevention, curing infections, controlling the risk of transmitting disease to humans and increasing animals' productive capacity. The routine use of veterinary medicines for these purposes may lead to the presence of drug residues in animal food products if appropriate withdrawal times are not respected which can, in turn, imply pathogen resistance to antibiotics used in human medicines [1, 2]. Food surveillance programmes established to enforce legislation on drug residues in animal products rely heavily on fast, accurate analytical screening methods. To protect consumers from exposure to levels of residue that might pose a health risk, the European Union has introduced legislation on the authorisation of veterinary drugs and has established the maximum residue levels (MRLs) of such drugs in different edible animal tissues [3, 4]. Therefore, there is a continuous need for reliable analytical methods to determine if drugs comply with national and international regulations and requirements in all areas of food quality and safety.

Quinolones are a group of structurally related antibacterial agents used in human and veterinary medicine. The 6-fluorinated piperazinyl derivatives, fluoroquinolones, offer a wide range of antibacterial activities and are increasingly used in veterinary medicine as they effectively treat bacterial infections [5]. Antibiotics are essential for controlling mastitis and other bacterial problems in dairy herds [6, 7], and their passage into milk can cause major

Published in the special issue *Advances in Analytical Separations* with Guest Editors Yolanda Pico and Joan O. Grimalt.

M. Rambla-Alegre (✉) · M. A. Collado-Sánchez ·
J. Esteve-Romero · S. Carda-Broch
Àrea de Química Analítica, QFA, ESTCE, Universitat Jaume I,
12071, Castellón de la Plana, Spain
e-mail: mrambla@qfa.uji.es

problems for a receiving dairy. This intolerance of antibiotic residues stems from the fact that some adults are hypersensitive to antibiotics, and allergic reactions, and even death, may result from ingestion [6]. In addition, the use of quinolones in laying hens has been forbidden in the European Union [4] because these antimicrobial residues are possibly transferred and accumulate in eggs destined for human consumption.

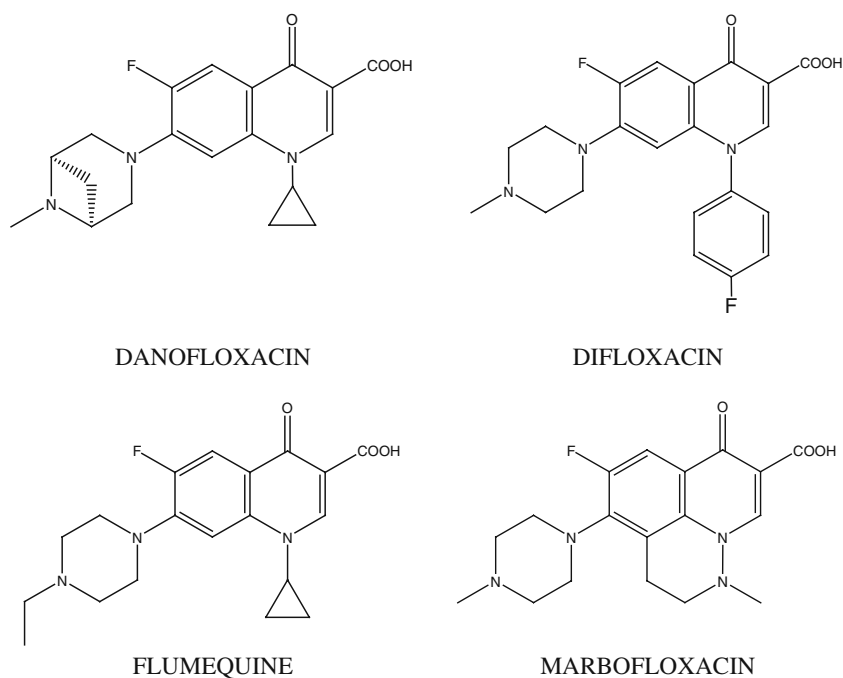
The determination of quinolones in complex food samples requires an extraction step of the analyte from the matrix, followed by different clean-up steps that involve liquid–liquid extraction (LLE) [8, 9], solid-phase extraction (SPE) [10, 11], dialysis [12] or supercritical fluid extraction (SFE) [13]. Recently, Kinsella et al. presented a comprehensive review on current trends in sample preparation to isolate veterinary drugs and growth promoters from foods. Turbulent-flow chromatography coupled with tandem mass spectrometry (TFC-LC-MS/MS) is a technique that eliminates time-consuming simple clean-up steps, increases productivity and reduces solvent consumption without harming sensitivity or productivity [14]. Along these lines, Stolker et al. have developed a method that automates the extraction procedure [15]. Capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) are the most used separation techniques. CE [16, 17] has become a powerful separation technique because its analysis times are shorter than those of HPLC, and it uses smaller volumes of reagents and samples. However, due to the low volume of sample injected, sensitivity is not as good, and HPLC is, therefore, a frequently used technique.

Many studies into multi-residue analyses of quinolones in milk [18–24] and eggs [24–30] have been recently published in the literature. Most methods involve HPLC with UV [18, 21, 24, 25], fluorescence [18, 20, 26], or mass spectroscopy detection [18, 19, 22–24, 27–30].

Micellar liquid chromatography (MLC), which uses a surfactant solution as the mobile phase and whose concentration is above the critical micellar concentration, is an alternative to conventional HPLC. MLC allows biological or food samples to be analysed without having to eliminate proteins. Therefore, it cuts costs and analysis times considerably. It makes the simultaneous elution of hydrophobic and hydrophilic analytes possible [31] without a gradient elution being necessary. The stable and reproducible behaviour of micellar mobile phases enables the accurate prediction of solutes retention with a model that can be further used to optimise the separation of mixtures of solutes [31]. In addition, one of the main applications of MLC is the possibility of directly injecting the sample into the column thanks to micellar aggregates' ability to dissolve sample proteins and other compounds.

This paper reports a simple, selective and sensitive LC method with fluorescence detection for the simultaneous determination of four fluoroquinolones; danofloxacin, difloxacin, flumequine and marbofloxacin (Fig. 1); in milk and egg samples using a surfactant-mediated mobile phase. According to an EU regulation [4], the MRLs of the quinolones under study in bovine, ovine and caprine milk are 30 µg/kg for danofloxacin, 50 µg/kg for flumequine and 75 µg/kg for marbofloxacin. Since this EU regulation

Fig. 1 Structures of the studied quinolones



does not establish the MRL for difloxacin, we selected it to be 100 µg/kg. As quinolones are prohibited in poultry eggs, they have no MRL value. So, we decided to maintain the same MRL values as those established in milk. The proposed method was applied to determine these compounds in a large number of bovine milk and egg samples.

Experimental

Chemicals and reagents

The antibiotic substances flumequine (FLU) and marbofloxacin (MAR) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Difloxacin (DIF) and danofloxacin (DAN) came from Fluka (Buchs SG, Switzerland). Sodium dodecyl sulphate (SDS, 99% purity) and sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany). 1-propanol and 1-butanol (both HPLC-grade), sodium dihydrogen phosphate 1-hydrate were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Methanol, ethanol (both HPLC-grade), hydrochloric acid and triethylamine came from J.T. Baker (Deventer, the Netherlands). Ultrapure water was used throughout (Millipore S.A.S., Molsheim, France). Nylon filters were obtained from Sartorius-Stedim (Goettingen, Germany) and Micron Separations (Westboro, MA, USA). A large number of bovine and caprine milk and egg samples were purchased in local supermarkets.

Equipment and software

The HPLC analysis was carried out in an Agilent Technologies Series 1100 apparatus (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, a thermostatted autosampler tray and column compartments, and a fluorescence detector. Instrumental control and chromatographic data acquisition were done with the Agilent ChemStation (Rev. B.03.01) software. The chromatographic data were processed with the Michrom software [32] from a peak measurement to the achievement of the optimal mobile phase.

A Crison GLP 22 (Barcelona) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode was used to measure the experimental pH of the solutions. The analytical balance employed was a Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland). The vortex shaker and sonication unit were obtained from Selecta (Barcelona).

Chromatographic conditions

A reversed-phase Kromasil C₁₈ analytical column (Scharlab; 150 mm×4.6 mm, 5-µm particle size) was used to separate the studied quinolones. A fluorescence detection programme was run at the following times and excitation/

emission wavelengths: 0–9.30 min, 260/366 nm for FLU and 9.30–20 min, 280/450 nm for MAR, DAN and DIF. The flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 20 µL and the column temperature was maintained at 25 °C. The micellar mobile phase used was 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% triethylamine buffered at pH 3 with 0.01 M NaH₂PO₄ H₂O. The mobile phase was filtered through 0.45-µm nylon membranes (Sartorius-Stedim).

Mobile phase and standard solutions preparation

The micellar mobile phases were prepared by weighing the appropriate amounts of SDS and sodium dihydrogen phosphate. These reagents were dissolved in ultrapure water and 0.5% (v/v) triethylamine was added, then the pH was adjusted as required. Finally, butanol was added to achieve the desired organic solvent concentration, and water was added up to the volumetric flask mark-up.

Individual stock standard solutions of quinolones were prepared (DAN, DIF, FLU and MAR) at a concentration of 10 µg/mL by dissolving pure substances in 5% ethanol with the aid of an ultrasonic bath, and by finally filling them up with 0.05 M SDS pH 3. These solutions were stored at 4 °C in amber glass. Working solutions were prepared daily at the appropriate dilutions of the concentrated stock solutions. All the solutions were directly filtered into vials through 0.45 µm nylon membranes (Micron Separations) before analysis.

Preparation of milk and egg samples

Liquid milk (5 mL) and egg (2.5 mL) sample aliquots were homogenised in a 25-mL volumetric flask with a solution of 0.05 M SDS at pH 3. The final solution was shaken continuously for 2 min. Then the supernatant was directly filtered through 0.45 µm nylon syringe membranes (Micron Separations) for the milk samples, or a vacuum pump was used with the 0.45 µm nylon membranes with the egg samples (Sartorius-Stedim). The filtered solutions were finally placed directly into autosampler vials.

Method validation

The method was validated to meet the criteria specified by EC Decision 2002/657/EC [33]. The method validation studies used spiked milk and egg samples. The method was checked for selectivity, linearity, decision limit (CC_α), detection capability (CC_β), limits of detection and quantification, recoveries, accuracy and precision. Robustness studies were also done. It should be pointed out that the values of the studied parameters did not depend on the matrix evaluated. Several different milk and egg samples were assayed for this purpose.

Results and discussion

Optimisation of the chromatographic conditions

pH selection

In the micellar media, the values of the dissociation constants can change in relation to those in pure water. Several studies have shown how these values shift for some compounds in certain cationic, anionic and non-ionic surfactants [34]. The pH variation of the mobile phase contributes to the separation capability of those compounds whose dissociation constants have an intermediate value. The differences between these values have been attributed to the properties of the solvent in the interfacial and bulk phases, which include contribution from the micellar surface potential for the charged micelles. The anionic surfactant in the micellar solution should increase the stability of the protonated species of the compounds and, consequently, their protonation constants.

The quinolones under study have a 7-piperazinyl group in structure (Fig. 1). The reported dissociation constants values are $pK_{a1} \approx 5.5\text{--}6.6$ and $pK_{a2} \approx 7.2\text{--}8.9$ [35]. Quinolones exist mostly in a cationic form at an acidic pH, in an anionic form at a basic pH, and as a zwitterionic form at a neutral pH. The retention of the four studied quinolones lowered when the pH of the mobile phase increased, and eluted at the dead volume at pH 7 (data not shown). The best resolution and adequate retention times for all four compounds were achieved at pH 3. Thus, pH 3 was selected as the optimum pH to analyse the four quinolones.

Chromatographic behaviour of the studied quinolones

The retention of the quinolones in a C18 column with pure micellar eluents (without a modifier) was relatively high according to its octanol–water partition coefficient values, ranging between 0.89 and 1.6 [36, 37]. Thus, an organic solvent was added to lower the retention times. The use of hybrid micellar mobile phases with variable surfactant and modifier concentrations usually leads to changes in the retention factors (k), efficiencies (N) and asymmetries (B/A) of the chromatographic peaks. An adequate control of the concentrations of both additives is therefore necessary to achieve chromatograms with good resolution and sufficient elution strength. In this work, propanol, butanol and pentanol were considered. It is important to consider that the selection of an alcohol directly relates to the polarity of the compounds under study. Therefore, the use of propanol or butanol was preferred given its moderate elution strength. Propanol yields better efficiencies but greater retentions than butanol when the quinolones were eluted with them. Moreover, the peaks of the compounds can be

satisfactorily resolved with adequate retention times by using butanol (data not shown). For this reason, mobile phases with SDS–butanol at pH 3 were selected to carry out the optimisation procedure. Triethylamine (TEA) is commonly added to conventional aqueous-organic mobile phases to reduce the peak tailing of basic compounds at a low pH (2.5–4.0) and to enhance peak efficiencies. However, the retention times changed in the presence of the amine, and retention lowered for all the compounds. Thus, the adequacy of the added TEA for the determination of quinolones was also considered by bearing this in mind. In the absence of TEA, the asymmetry factors (B/A) of the compounds were higher than 2.5, which means that the chromatographic peaks were very asymmetrical. By adding this reagent, peaks became quite symmetrical. The optimisation process was carried out using 0.5% TEA in the mobile phases. This low amount only modifies the retention of the chromatographic peaks slightly. The selected TEA concentration provided adequate asymmetries, efficiencies and retention times.

Mobile phase selection

In liquid chromatography, interpretive optimisation strategies can be more efficient and reliable than sequential approaches. These strategies can be assisted by computer simulation which mimics the methodology followed by experienced chromatographers, but uses less time and effort. We selected the most convenient mobile phase with the help of the Michrom software [32]. This software enables the changes in chromatograms to be graphically depicted when the user progressively varies the concentration of the surfactant and organic solvent. The mathematical model used to describe the retention behaviour of the eluted compounds was [31]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1+K_{AD}\phi}}{1 + K_{AM} \frac{1+K_{MD}\phi}{1+K_{AD}\phi}} [M] \quad (1)$$

where k is the retention factor, $[M]$ and ϕ are the concentrations of the surfactant and organic solvent, respectively, K_{AS} and K_{AM} correspond to the equilibria between the solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; K_{AD} and K_{MD} measure the relative variation in the concentration of the solute in bulk water and micelles due to the presence of a modifier as compared to a pure micellar solution (without a modifier). To determine the parameters in Eq. 1, the experimental design needs to contain the retention data of at least five mobile phases. The prediction errors with this equation are frequently below 5%.

The description of the peak shape (required to simulate those chromatograms containing asymmetrical peaks) was performed with a modified Gaussian model. In this model,

a linear equation substitutes the standard deviation of the Gaussian curve [38]:

$$h(t) = He^{(-1/2)(|t-t_R|/|s_0+s_1(t-t_R)|)^2} \quad (2)$$

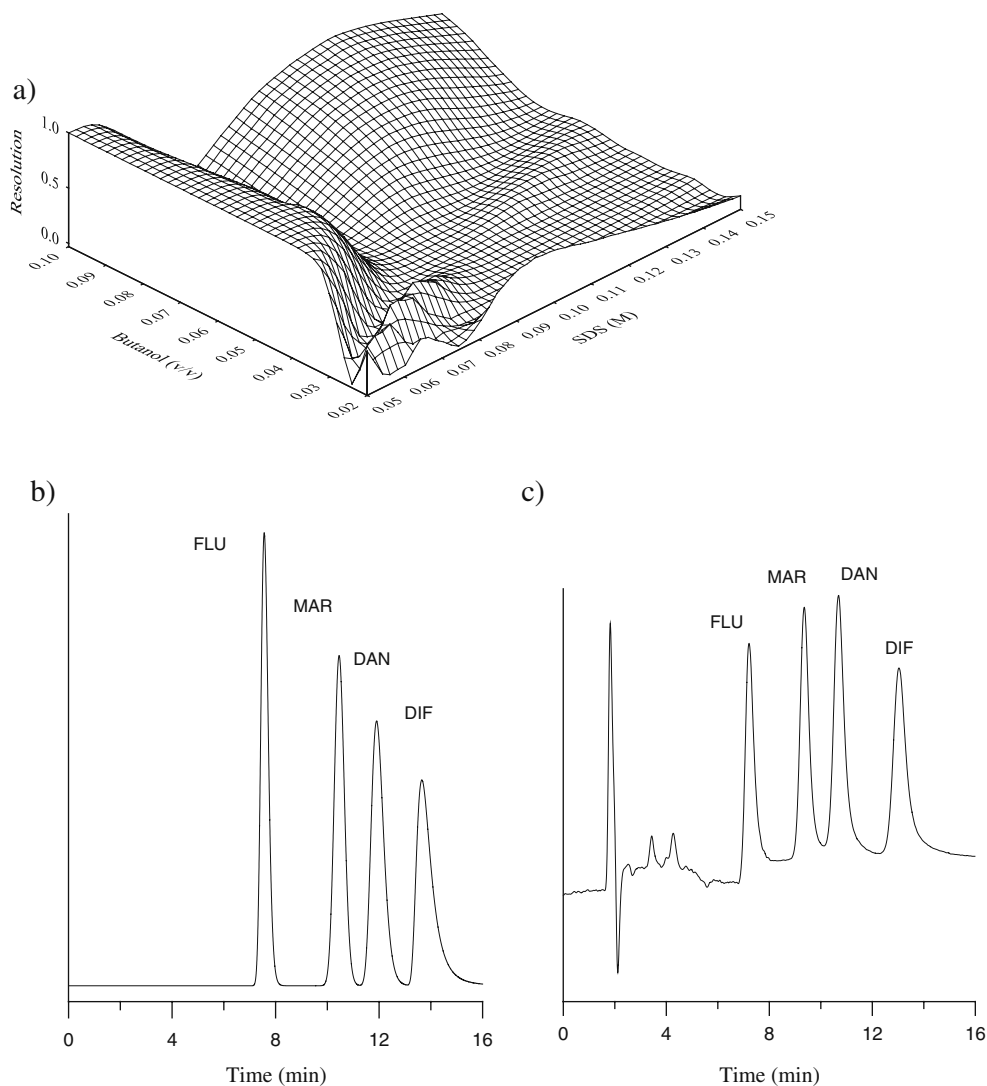
where H is the peak height, t_R the retention time, s_0 a measurement of the peak width at the maximum, and s_1 a factor that quantifies the peak distortion. The s_0 and s_1 coefficients were calculated by the interpolation of the efficiencies and asymmetry factors obtained in the mobile phases of the experimental design of the solutes.

The experimental design used consisted in five mobile phases: four located at the corners of a rectangular factor space and one in the centre. The factor space limits (surfactant and alcohol) were in the 0.05 to 0.15 M and the 2% to 10% ranges for SDS concentration and butanol volume, respectively. These concentration ratios were selected to avoid excessive retention times or an elution near the void volume. The optimum mobile phase for

quinolones separation should be obtained through the complete separation criterion (maximum resolution) in an appropriate analysis time.

Figure 2a shows the three-dimensional resolution diagram of the four quinolones. An examination of the response surface revealed the complexity of separating the mixture. Resolution was very low in nearly all the variable space considered due to two or more chromatographic peaks frequently overlapping. We should also point out that there were several inversions in the elution order of compounds throughout the factor space when both the surfactant and organic concentrations were changed, which made it more difficult to obtain the best mobile phase composition (e.g., FLU and MAR on the one hand, and DAN and DIF on the other hand, changed their elution order, usually at a high surfactant concentration and a low organic solvent concentration). These changes in the elution order gave rise to numerous peaks overlapping along the factor space and, consequently, lead to poor resolution. Satisfactory resolution was only

Fig. 2 The global resolution diagram (a), and the predicted (b) and experimental (c) chromatograms obtained. Mobile phase: 0.05 M SDS-10% butanol-0.5% TEA-pH 3. Quinolone concentration: danofloxacin (0.5 µg/mL), difloxacin (0.05 µg/mL), flumequine (1 µg/mL) and marbofloxacin (0.5 µg/mL)



achieved in a narrow region for the SDS concentrations between 0.05 and 0.057 M, and between 4.4% and 10% for butanol (Fig. 2a). The selected mobile phase was 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% triethylamine, for which the quinolones peaks resolved well in under 15 min. The chromatographic parameters (t_R , k , N and B/A) obtained in this mobile phase were: 10.7, 5.6, 2400 and 1.4 for DAN, 13.0, 7.0, 1900 and 1.6 for DIF, 7.2, 3.4, 1300, 1.6 for FLU, and 9.4, 4.8, 2600, 1.3 for MAR. The prediction capability of the interpretive strategy, which was assessed by comparing the predicted and experimental chromatograms for a mixture of the four quinolones eluted with this mobile phase, was checked and found satisfactory (Fig. 2b and c).

Validation study

Assay selectivity

Selectivity was assessed by the absence of any interference at the elution times of the studied analytes in the same chromatographic run, as shown in the blank chromatograms of Fig. 3a (top) and b (top). To validate selectivity, 10 blank samples of the different milk and egg samples were analysed without spiking. In the blanks, the protein band and a large number of unknown peaks appeared before the quinolones' retention, but were sufficiently separate to avoid overlapping. Stabilising agents (ethanol) and the

other quinolones used for bovine, ovine and caprine treatment (sarafloxacin and oxolinic acid) were spiked at their respective MRL concentrations (30 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively) into the milk and egg samples to assess any possible interference in the method. No compound eluted at the studied quinolones' retention times.

Linearity

The linearity of the analytical method was verified at seven different concentration levels (six replicates); limit of quantification (LOQ), $0.5 \times \text{MRL}$, $1 \times \text{MRL}$, $1.5 \times \text{MRL}$, $2 \times \text{MRL}$, $4 \times \text{MRL}$ and $6 \times \text{MRL}$ in the milk and egg samples (1:5 and 1:10 dilution factors, respectively); in order to cover the whole work range. The calibration parameters (slope and intercept) were obtained by plotting the response of the respective quinolone peak area versus the standard quinolone concentration using the least square linear regression analysis. The adjusted parameters obtained are shown in Table 1. The correlation coefficients (R) were always higher than 0.99.

Limits of detection and quantification

The limits of detection (LOD) of the four quinolones in the milk and egg samples were calculated with the 3s criterion (three times the standard deviation of the lowest concentration solution included in the calibration divided by the

Fig. 3 Chromatograms of (a) blank (top) and spiked milk samples (1.5 x MRL concentration; bottom), and (b) blank (top) and spiked egg sample (MRL concentration; bottom). Mobile phase: 0.05 M SDS–10% butanol–0.5% TEA, pH 3

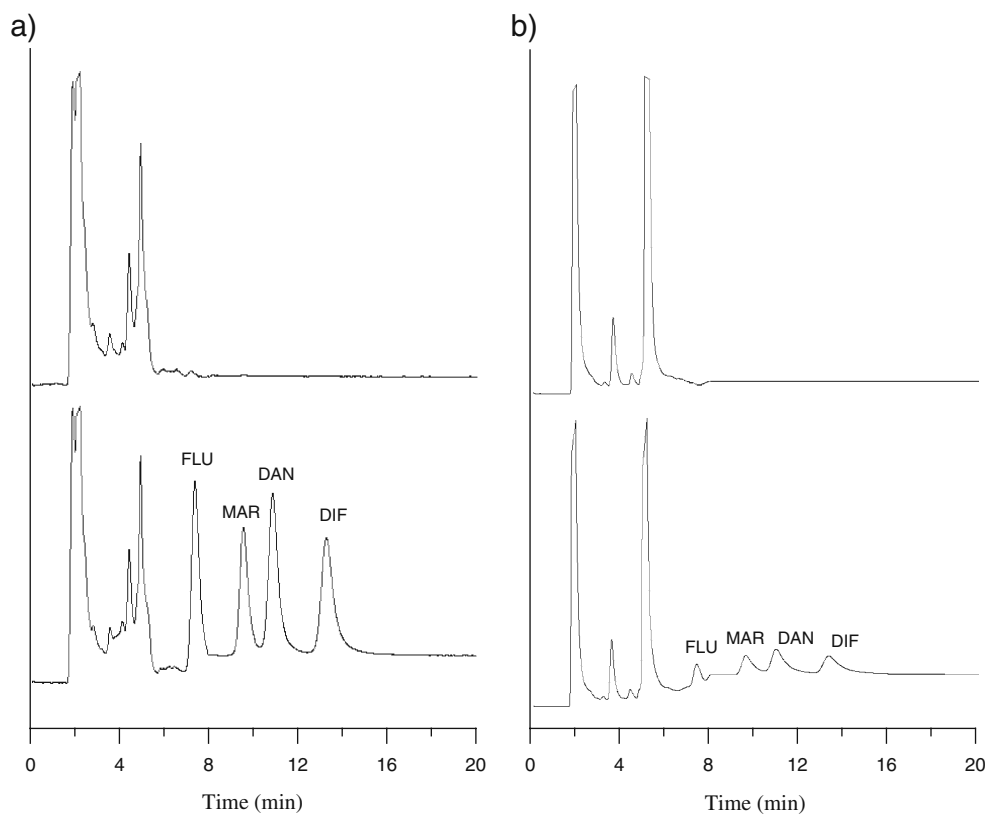


Table 1 Linear regression data, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), decision limits (CC_{α}) and detection capabilities (CC_{β}) at the LOQ levels of the method and at the MRLs for quinolones

Analyte	Danofloxacin	Difloxacin	Flumequine	Marbofloxacin
Linear range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.5–180	1–600	6–300	4–450
Slope \pm SD	22.3 \pm 0.7	3.46 \pm 0.19	0.179 \pm 0.014	0.215 \pm 0.007
Intercept \pm SD	-87 \pm 8	-56 \pm 17	-2.0 \pm 1.0	-0.5 \pm 0.3
<i>R</i>	0.996	0.997	0.998	0.998
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.03	0.13	1.8	1.2
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.5	1	6	4
CC_{α} ($\mu\text{g}/\text{kg}$) LOQ	0.514 \pm 0.014	1.07 \pm 0.07	6.6 \pm 0.6	4.6 \pm 0.6
CC_{α} ($\mu\text{g}/\text{kg}$) MRL	30.18 \pm 0.18	100.7 \pm 0.7	51.9 \pm 1.9	76.3 \pm 1.3
CC_{β} ($\mu\text{g}/\text{kg}$) LOQ	0.529 \pm 0.016	1.20 \pm 0.12	6.9 \pm 0.3	5.4 \pm 0.8
CC_{β} ($\mu\text{g}/\text{kg}$) MRL	31.1 \pm 0.9	102.6 \pm 1.9	54.1 \pm 2.2	79 \pm 3

slope of the calibration curve using a series of 10 solutions containing a low concentration of each compound). The results are based on the standard deviation of the response and on the slope of a specific calibration curve containing the analyte. The LOQ in the milk and egg samples were selected as the lowest concentration used in the calibration curve. By considering that the MRLs established for the quinolones in bovine, ovine and caprine milk comprised between 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for DAN and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for DIF, the proposed method proved sensitive enough to analyse the quinolones studied in the bovine, ovine and caprine milk samples because the LOD and LOQ values obtained (Table 1) were below the MRLs established for these compounds according to EU Regulation 2377/90 [4].

Decision limit and detection capability

European Decision 2002/657/EC [33] on the performance of analytical methods and the interpretation of the results

recommends calculating two statistical limits, CC_{α} (decision limit) and CC_{β} (detection capability), which assess the critical concentrations above which the method reliably distinguishes and quantifies a substance by considering the method's variability and the statistical risk of making a wrong decision. CC_{α} is the limit at and above which a sample can be concluded to be non-compliant with an error probability of α . CC_{β} , defined as the smallest content of the substance to be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β .

CC_{α} values were determined by analysing blank samples fortified with quinolones at the MRL concentration. CC_{α} values were calculated as the mean values of the concentrations found plus 1.64 times the corresponding standard deviations (SD; e.g., $CC_{\alpha} = C_{\text{found}} + 1.64 \times \text{SD}$). On the other hand, CC_{β} values were obtained as CC_{α} levels plus 1.64 times the corresponding standard deviation. A statistical analysis for CC_{α} and CC_{β} was performed at the 95% confidence level by analysing at least 20 blank materials

Table 2 Intra-day ($n=6$) and inter-day (over a period of five consecutive days) precision and accuracy data for the determination of quinolones

Analyte	Concentration added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intra-day			Inter-day		
		Found (mean \pm sd) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Accuracy E_r (%)	Precision RSD (%)	Found (mean \pm sd) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Accuracy E_r (%)	Precision RSD (%)
Danofloxacin	15	15.90 \pm 0.10	6.0	0.6	16.15 \pm 0.21	7.7	1.3
	30	27.59 \pm 0.11	8.0	0.4	27.9 \pm 0.8	7.0	2.9
	45	46.7 \pm 1.1	3.8	2.4	47.0 \pm 0.6	4.4	1.3
Difloxacin	50	51.5 \pm 0.4	3.0	0.8	49 \pm 4	2.0	8.2
	100	100.9 \pm 1.1	0.9	1.1	99 \pm 6	1.0	6.1
	150	137.4 \pm 1.7	8.4	1.2	139.9 \pm 2.3	6.7	1.6
Flumequine	25	26.9 \pm 1.1	7.6	4.1	26.3 \pm 1.1	5.2	4.2
	50	52.6 \pm 0.6	5.2	1.1	51.6 \pm 2.2	3.2	4.3
	75	79.4 \pm 1.4	5.9	1.8	79.6 \pm 1.4	6.1	1.8
Marbofloxacin	37.5	34.8 \pm 0.7	7.2	2.0	34.8 \pm 2.1	7.2	6.0
	75	72.8 \pm 2.5	2.9	3.4	70 \pm 3	6.7	4.3
	112.5	121.6 \pm 1.0	8.1	0.8	118 \pm 6	5.1	5.3

per fortified matrix. Table 1 summarises the CC_{α} and CC_{β} values obtained for milk and egg samples at the LOQ level and at the MRL concentration for each quinolone. The obtained values indicate that the established limits can be detected in the food samples studied.

Precision and accuracy

To assess intra-day precision, also known as within-day repeatability, three sets ($0.5 \times$ MRL, $1 \times$ MRL and $1.5 \times$ MRL) were prepared and analysed. The intra-day analysis was determined by injecting these three test solutions six times on the same day.

To study the reproducibility of the method (inter-day repeatability) on five consecutive days, the same experi-

mental procedure was followed at the aforementioned concentration levels (measurement for six samples per day, analysed in quintuplicate). Precision (expressed as the percentage of the relative standard deviation, RSD), and the absolute value of accuracy (expressed as the relative error, E_r), are summarised in Table 2. The method was found to be precise and accurate as RSD (%) and E_r (%) were below 8.4%. These results indicate that the proposed method is useful for the routine analyses of the quinolones studied in milk and egg samples.

Robustness

The robustness of an analytical method is the measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate

Table 3 Assessing the robustness of the MLC method

Chromatographic changes	Level	Danofloxacin		Difloxacin		Flumequine		Marbofloxacin	
		t_R (min)	Area	t_R (min)	Area	t_R (min)	Area	t_R (min)	Area
A: SDS concentration (M)									
0.045	-0.005	11.4	589.8	14.1	281.9	7.1	11.0	10.6	15.9
0.05	0	10.8	545.2	13.2	287.1	7.1	11.7	9.5	14.5
0.055	+0.005	9.9	616.7	11.9	253.1	6.4	11.8	8.8	15.0
Mean \pm SD		10.7 \pm 0.8	580 \pm 40	13.1 \pm 1.1	274 \pm 18	6.9 \pm 0.4	11.5 \pm 0.4	9.6 \pm 0.9	15.1 \pm 0.7
RSD (%)		7.4	6.2	8.4	6.7	6.1	3.7	9.4	4.8
B: Percentage of butanol (v/v)									
9.9	-0.1	10.8	591.2	13.2	263.1	7.5	11.1	9.6	15.1
10.0	0	10.8	545.2	13.2	287.1	7.1	11.7	9.5	14.5
10.1	+0.1	10.4	592.1	11.4	290.6	6.5	11.6	9.3	15.2
Mean \pm SD		10.6 \pm 0.3	580 \pm 30	12.6 \pm 1.1	280 \pm 15	7.0 \pm 0.5	11.5 \pm 0.3	3.78 \pm 0.05	14.9 \pm 0.4
RSD (%)		2.4	5.2	8.5	5.3	7.8	2.6	2.9	2.5
C: pH of mobile phase									
2.9	-0.1	10.8	576.8	13.6	288.4	7.2	11.6	9.6	13.8
3	0	10.8	545.2	13.2	287.1	7.1	11.7	9.5	14.5
3.1	+0.1	11.1	571.6	11.9	292.6	6.3	12.1	9.0	15.0
Mean \pm SD		10.6 \pm 0.3	564 \pm 17	12.9 \pm 0.9	289 \pm 3	6.9 \pm 0.4	11.8 \pm 0.3	9.4 \pm 0.3	14.4 \pm 0.6
RSD (%)		3.2	3.0	6.8	1.0	5.8	2.3	3.6	4.0
D: Flow rate (mL/min)									
0.9	-0.1	10.9	533.8	13.2	267.4	7.3	12.3	10.6	16.3
1	0	10.8	545.21	13.2	287.1	7.1	11.7	9.5	14.5
1.1	+0.1	9.6	500.9	11.7	276.5	6.1	11.7	8.7	16.03
Mean \pm SD		10.4 \pm 0.7	527 \pm 23	12.7 \pm 0.8	277 \pm 10	6.8 \pm 0.6	11.9 \pm 0.4	9.6 \pm 0.9	15.6 \pm 1.0
RSD (%)		6.7	4.4	6.6	3.6	8.9	3.0	9.9	6.2
E: Percentage of TEA (v/v)									
0.45	-0.05	11.2	597.3	13.8	278.6	6.7	11.9	9.7	14.7
0.5	0	10.8	545.21	13.2	287.1	7.1	11.7	9.5	14.5
0.55	+0.05	10.5	607.4	12.9	313.5	6.6	12.0	9.19	13.2
Mean \pm SD		10.8 \pm 0.4	580 \pm 30	13.3 \pm 0.5	293 \pm 18	6.8 \pm 0.3	11.87 \pm 0.17	9.5 \pm 0.3	14.1 \pm 0.8
RSD (%)		3.6	5.7	3.6	6.2	3.9	1.5	2.9	6.0

variations in the method parameters, and it provides an indication of reliability during normal usage. The first step in a robustness test [39] is to identify the critical factors which are expected to influence method performance. Normally in liquid chromatography, approximately 50 factors may be of some influence. However, only a small group of them is expected to be critical (to cause a significant effect with minor changes). In which case, five factors were selected to be examined in the robustness test, namely: (A) SDS concentration, (B) percentage of butanol, (C) pH of the buffer used in the mobile phase, (D) flow rate and (E) percentage of triethylamine.

In this work, the effect of these factors is interpreted as the deviation that takes place in response to the modified values (−0.005 or +0.005 for SDS concentration; −0.05 or +0.05 for TEA; and −0.1 or +0.1 for the rest of parameters) in relation to the nominal level (coded as 0), which is estimated by the relative standard deviation (Table 3).

To estimate the robustness of the method, six replicates of the standard solutions of each quinolone at the MRL concentrations were injected into the chromatographic system at the nominal and modified levels of the study variables. In order to obtain the most complete picture possible of the method, it is important to measure any useful parameter. For the HPLC experiments, the most relevant parameters are peak height, peak area, retention time and resolution [39]. In this case, the effect of the selected factors on the peak areas and retention times of all the analytes was evaluated. No significant differences in the peak areas or variability in the retention times were observed. The results shown in Table 3 indicate that the selected factors remain sufficiently unaffected by the slight variations made to these parameters (RSD<6%, average). As expected, flow rate and SDS concentration variation had the strongest influence on the retention of the studied compounds (RSD<10%), unlike the other parameters. This result was expected because the conditions of both parameters changed by ±10%, and this

Table 4 Recovery (%) from different types of commercial milk and eggs samples spiked with the four quinolones at three different concentrations (n=6)

Sample	Supplier	Danofloxacin (µg/kg)			Difloxacin (µg/kg)			Flumequine (µg/kg)			Marbofloxacin (µg/kg)		
		Added conc. (µg/kg)			Added conc. (µg/kg)			Added conc. (µg/kg)			Added conc. (µg/kg)		
		15	30	45	50	100	150	25	50	75	37.5	75	112.5
Goat's milk	S.C.A. Ganadera del Valle de los Pedroches (Córdoba, Spain)	108	100.7	108.8	100.8	107.3	108.3	97.2	106.4	109.6	96.5	100.5	109.3
Semi-skimmed milk	Lactiber Corporación Alimentaria S.L. (Piélagos, Spain)	102.3	108.7	104.7	106.2	99	110.4	109.6	100	109.3	97.1	97.3	106.6
Skimmed milk	Puleva Food S.L. (Granada, Spain)	106.9	96.7	106.3	98.8	101	109.3	98.8	101.6	101.5	100.3	99.2	107.6
Wholemilk		110.8	101.5	105.6	103.8	100.5	106.7	103.2	99	106.9	104.8	105.6	99.7
Fresh skimmed milk	Lactiber Corporación Alimentaria S.L.	107	97.2	107.5	107.4	99.6	107.3	99.2	96	100.4	100.5	106.8	107.4
Fresh semi-skimmed milk		101.2	102.4	109.5	100.6	98.8	103.9	106.1	103	107.1	103.7	99.5	106.7
Fresh whole milk		103.3	101.4	110.7	101.4	101.8	102.5	108.2	108.2	107.1	104.3	99.2	109.6
Omega 3 milk		101.3	98.7	108.9	101	99	98.5	98.6	97.2	100.4	98.4	101.3	106.6
Skimmed milk	Grupo Leche Pascual (Burgos, Spain)	104	98.9	109.3	98.8	103.7	102	107.2	98.2	97.3	103.2	103.7	104
Peques 3 milk	Puleva Food S.L.	106	100.3	108	100.8	94.7	98.7	98.4	97.1	98.3	97.5	98.1	99.5
Cre +1 milk	Puleva Food S.L.	103.3	104	104.5	102.8	97.2	101.3	98.8	107	104	103.2	101.7	104.4
Condensed milk	El Castillo (Pontevedra, Spain)	100	110.7	107.6	99.8	94.3	102	102.9	103	108.4	98.4	102.3	108.4
Egg quality no. 1	Codornices Guillén S.L. (Quart de Poblet, Spain)	107.3	106.7	108.9	106	101.9	102.7	100.4	106	106.4	97.9	99.3	104.9
Egg quality no.3	Huevos Guillén, S.L. (Quart de Poblet, Spain)	108.2	98.7	103.3	101.6	101.5	100.5	106.4	106.2	109.5	98.4	99.1	109
Fresh chicken egg	Gift	100.3	99	108.9	99.4	100.7	106	103.6	104.4	105.5	101.1	100.7	105.1
Quail egg	Codornices Guillén S.L.	113.7	101.7	107.3	100.2	101.2	104.4	102.9	105.6	105.7	97.3	101.3	102.2

Unless otherwise stated, all milk samples were bovine milk

variation could be significant for some of the studied compounds. A $\pm 5\%$ variation in the flow rate and SDS concentration conditions could be more appropriate, and would originate lower RSD values.

Analysing milk and egg samples

The proposed method was used to determine the four quinolones in spiked milk and egg samples, most of which were obtained from a local supermarket. Chicken eggs were a kind gift.

Samples were spiked at the following three quinolones concentration levels: $0.5\times$ MRL, MRL and $1.5\times$ MRL. Six replicates of each concentration were injected into the chromatograph. Recoveries were performed by comparing the analytical results of the quinolones extracted from the milk and egg samples fortified with unextracted standards prepared at the same concentration as the blank extracts. The data obtained (Table 4) show satisfactory recoveries for all the compounds, and the results fall in the range of 94.3–113.7%. Figure 3a (bottom) and b (bottom) depict the two chromatograms obtained from the two different chromatographic sets of spiked milk and egg samples of the four quinolones analysed with the optimum mobile phase, respectively. These chromatograms reveal how a surveillance programme for quinolones residues can be performed under the proposed chromatographic conditions. We found no evidence of the presence of quinolone residues in any of the real samples analysed.

Conclusion

The proposed procedure is useful for food quality testing and control areas to determine the content of quinolones in milk and egg samples. Moreover, it allows the simultaneous determination of quinolones residues in different milk and egg matrices with high sensitivity. One advantage of this procedure is the possibility of injecting milk and egg samples directly into the chromatographic system with no previous treatment other than homogenisation, dilution and filtration, thus avoiding tedious extractions from matrices. Validation according to EC 2377/90 regulation provides satisfactory results in terms of sensitivity, linearity, accuracy, recoveries and robustness at the $\mu\text{g}/\text{kg}$ level.

It is noteworthy that the use of micellar mobile phases endows the procedure advantages such as non toxicity, no flammability, biodegradability and low cost.

Acknowledgements This work has been supported by project from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) CTQ 200764473/BQU. Maria Rambla-Alegre also wishes to thank the MEC for her FPU grant.

References

1. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ (2002) *Clin Infect Dis* 34(suppl 3): S93–S106
2. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE (2000) *Int J Antimicrob Agents* 14:327–335
3. The White Paper on Food Safety (2000) European commission, Brussels. http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_en.pdf. Accessed 1 May 2010
4. Council Regulation (EEC) (1990) 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Commun* L224:1–20
5. Impens S, De Brabander HF, De Wasch K, Van Ginkel L, Stephany R, Schilt R, Van Eeckout N, Van Peteghem C (2000) Conference on residues of veterinary drugs in food. Proceedings of Euroresidue IV. Veldhoven, The Netherlands, pp 622–626
6. Jones GM, Seymour EH (1988) *J Dairy Sci* 71:1691–1699
7. Oliver SP, Maki JL, Dowlen HH (1990) *J Food Prot* 53:693–696
8. García I, Sarabia L, Ortiz MC, Aldama JM (2005) *J Chromatogr A* 1085:190–198
9. Verdon E, Couedor P, Roudaut B, Sanders P (2005) *J AOAC Int* 88:1179–1192
10. Huang JF, Lin B, Yu QW, Feng YQ (2006) *Anal Bioanal Chem* 384:1228–1235
11. Cinquina AL, Roberti P, Giannetti L, Longo F, Draisci R, Fagiolo A, Brizioli NR (2003) *J Chromatogr A* 987:221–226
12. Lolo M, Pedreira S, Fente C, Vázquez BI, Franco CM, Cepeda A (2005) *J Agric Food Chem* 53:2849–2852
13. Shim JH, Lee MH, Kim MR, Lee CJ, Kim IS (2003) *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1342–1348
14. Kinsella B, O'Mahony J, Malone E, Moloney M, Cantwell H, Furey A, Danaher M (2009) *J Chromatogr A* 1216:7977–8015
15. Stolker AAM, Peters RJB, Zuiderent R, DiBussolo JM, Martins CPB (2010) *Anal Bioanal Chem* 397:2841–2849
16. Wang Y, Baeyens WRG, Huang C, Fei G, He L, Ouyang J (2009) *Talanta* 77:1667–1674
17. Lara FJ, García-Campaña AM, Ales-Barrero F, Bosque-Sendra JM, García-Ayuso LE (2006) *Anal Chem* 78:7665–7673
18. Hermo MP, Nemutlu E, Kır S, Barrón D, Barbosa J (2008) *Anal Chim Acta* 613:98–107
19. Aguilera-Luiz MM, Martínez-Vidal JL, Romero-González R, Garrido-Frenich A (2008) *J Chromatogr A* 1205:10–16
20. Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA (2009) *J Chromatogr A* 1216:7281–7287
21. Chung HH, Lee JB, Chung YH, Lee KG (2009) *Food Chem* 113:297–301
22. Tang Q, Yang T, Tan X, Luo J (2009) *J Agric Food Chem* 57:4535–4539
23. Bohm DA, Stachel CS, Gowik P (2009) *J Chromatogr A* 1216:8217–8223
24. Zhang H, Ren Y, Bao X (2009) *J Pharm Biomed Anal* 49:367–374
25. Christodoulou EA, Samanidou VF, Papadoyannis IN (2007) *J Chromatogr B* 859:246–255
26. Hassouan MK, Ballesteros O, Taoufik J, Vilchez JL, Cabrera-Aguilera M, Navalón A (2007) *J Chromatogr B* 852:625–630
27. Shen J, Li H, Jiang H, Zhou D, Xu F, Li J, Ding S (2008) *J AOAC Int* 91:1499–1506
28. Bogialli S, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Laganà A, Tramontana G (2009) *J Chromatogr A* 1216:794–800
29. Peters RJB, Bolck YJC, Rutgers P, Stolker AAM, Nielen MWF (2009) *J Chromatogr A* 1216:8206–8216
30. Garrido-Frenich A, Aguilera-Luiz M, Martínez-Vidal JL, Romero-González R (2010) *Anal Chim Acta* 661:150–160

31. Berthod A, García-Álvarez-Coque MC (2000) *Micellar liquid chromatography*. Marcel Dekker, New York, USA
32. Torres-Lapasió JR (2000) *Michrom software*. Marcel Dekker, New York, USA
33. Commission Decision 2002/657/EC (2002) 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Commun* L221:8–36
34. Jaiswal PV, Ijeri VS (2005) *Colloids Surf B: Biointerfaces* 46:45–51
35. Hernández-Arteseros JA, Barbosa J, Compañó R, Prat MD (2002) *J Chromatogr A* 945:1–24
36. American Hospital Formulary Service, *Drug Information* (1988) American society of health-system pharmacists, Bethesda, MD
37. Hansch CC (1990) In: Sammes RG, Taylor JB (eds) *Comprehensive medicinal chemistry*, vol 6. Pergamon, Oxford
38. Torres-Lapasió JR, Baeza-Baeza JJ, García-Álvarez-Coque MC (1997) *Anal Chem* 69:3822–3832
39. Van Leeuwen JA, Vandeginste BGM, Kateman G, Mulholland M, Cleland A (1990) *Anal Chim Acta* 228:145–153



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC

M. Rambla-Alegre, J. Peris-Vicente, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch *

Àrea de Química Analítica, QFA, ESTCE, Universitat Jaume I, 12071 Castelló, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2009

Received in revised form 14 May 2010

Accepted 31 May 2010

Keywords:

Quinolone

SDS

Micellar liquid chromatography

Fish

Validation

European Union Decision 2002/657/EC

ABSTRACT

A simple and sensitive method was optimised and validated for the simultaneous analysis of five quinolones (oxolinic acid, flumequine, enrofloxacin, difloxacin and sarafloxacin) in different fish muscles. Analytical separation was performed in less than 18 min using a C₁₈ column with fluorescence detection and a micellar solution of 0.065 M sodium dodecyl sulphate, 12.5% propanol and 0.5% triethylamine buffered at pH 3 as the mobile phase. The method was fully validated in accordance with European Union Decision 2002/657/EC. Selectivity, linearity, decision limit, detection capability, detection and quantification limits, recoveries, and robustness were determined. Therefore, the micellar method was successfully applied to quantitatively determine quinolones in spiked muscle fishes, and the recoveries obtained were in the 87–110% range. High extraction efficiency for the quinolones was obtained without matrix interference in the extraction process and in the subsequent chromatographic determination. No organic solvent was used during the pretreatment step.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Quinolones are among the most important antibacterial agents used in human medicine, and are active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria through the inhibition of their DNA gyrase (AHFS, 1988). Their main use is in the treatment of human and veterinary diseases, and they prove very useful in preventing diseases in animals (Currie, Lynas, Kennedy, & McCaughey, 1998). They are well absorbed after oral administration and distribute extensively in tissues. Such characteristics make these drugs suitable to act as the therapy for a large number of infections on fish farms. These practices imply the drug residues persisting in edible tissue derived from treated animals and, therefore, maximum permitted levels have been set for most of them. Accordingly, their residues need to be controlled because there is concern about the possibility of exposure to low levels of these compounds, which may result in the development of resistance of human pathogens to antibiotics (Council Regulation (EEC) No 2377/90, 1990).

Studies have been published on different liquid chromatographic methods based on fluorescence and UV detection of quinolones in biological fluids (Espinosa-Mansilla, de la Pena, Gomez, & Lopez, 2006), food (Christodoulou, Samanidou, & Papadoyannis,

2007; Huang, Lin, Yu, & Feng, 2006; Karbiwnyk, Carr, Turnipseed, Andersen, & Miller, 2007; Marazuela & Moreno-Bondi, 2004; Pecorelli, Galarini, Bibi, Floridi, & Casciarri, 2003; Su, Chang, Chang, Chang, & Chou, 2003; Zhou et al., 2009) and environmental samples (Andreu, Blasco, & Pico, 2007; Golet, Strehler, Alder, & Giger, 2002). The latest generation of high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) equipment allows the multiresidue determination of quinolones in different matrices (Diaz-Cruz & Barcelo, 2007; Hermo, Nemetlu, Kir, Barron, & Barbosa, 2008; Paschoal, Reyes, & Rath, 2009; Romero-Gonzalez, Lopez-Martinez, Gomez-Milan, Garrido-Frenich, & Martinez-Vidal, 2007; Samanidou, Evaggelopoulou, Trotsmuller, Guo, & Lankmayr, 2008). However, this equipment is very expensive and only a few laboratories can afford it. Other non-routine techniques such as terbium(III)-sensitised luminescence (Hernandez-Arteseros, Compano, Ferrer, & Prat, 2000), capillary electrophoresis (Barron, Jimenez-Lozano, Bailac, & Barbosa, 2002) or immunoaffinity chromatography (Holtzapple, Buckley, & Stanker, 1999) methods, have also been developed.

Furthermore, one of the main problems involved in multiresidue antibiotic analyses in real samples is that the procedures required for the extraction, cleanup and preconcentration of the matrix analytes before the instrumental analysis are tedious and complex. Micellar liquid chromatography (MLC) (Esteve-Romero, Carda-Broch, Gil-Agusti, Capella-Peiro, & Bose, 2005) is an attractive alternative to conventional HPLC methods that uses a surfactant solution above the critical micellar concentration instead of

* Corresponding author. Tel.: +34 964 728095; fax: +34 964 728066.

E-mail address: scarda@qfa.uji.es (S. Carda-Broch).

aqueous-organic solvents as mobile phases for the determination of compounds in a variety of matrices (e.g., physiological fluids and food) with direct injection. MLC allows the analysis of complex matrices, usually without the aid of extraction because micelles tend to bind proteins competitively, thereby releasing protein-bound drugs and proteins, thus considerably reducing the cost and analysis time. Proteins are solubilised in micellar media and washed harmlessly away to elute with the solvent front rather than precipitating into the column.

The aim of this work was to apply a multiresidue HPLC procedure with micellar mobile phases to simultaneously determine five quinolones (difloxacin, enrofloxacin, flumequine, oxolinic acid and sarafloxacin) in fish muscle samples. Through [Council Regulation No 2377/90 \(1990\)](#), the European Union has established maximum residue limits (MRLs) in samples of animal origin. According to this regulation, the MRLs of the studied quinolones in fish muscle are 300 µg/kg for difloxacin, 100 µg/kg for enrofloxacin, 600 µg/kg for flumequine, 100 µg/kg for oxolinic acid and 30 µg/kg for sarafloxacin. Therefore, analytical methods are required to check food samples before they are sent to markets. The method was validated in line with [Commission Decision 2002/657/EC \(2002\)](#) in terms of selectivity, linearity, decision limit, detection capability, precision, and robustness. The procedure developed herein could also prove useful to determine quinolones in fish samples.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

Oxolinic acid (OXO, >97%) and flumequine (FLU, >98%) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Enrofloxacin (ENR, >98%), difloxacin (DIF, 99.8%) and sarafloxacin (SAR, 97.2%) were purchased from Fluka (Buchs SG, Switzerland). Sodium dodecyl sulphate (SDS, 99%) and sodium hydroxide (99%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dihydrogen phosphate 1-hydrate (99%) and n-propanol (HPLC grade) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Hydrochloric acid (37–38%), methanol, ethanol (both HPLC grade) and triethylamine (99.5%) came from J.T. Baker (Deventer, the Netherlands). Ultrapure water was used throughout (Millipore S.A.S., Molsheim, France). Nylon filters were obtained from Sartorius-Stedim (Goettinge, Germany) and Micron Separations (Westboro, MA, USA).

2.2. Chromatographic conditions and instrumentation

The chromatographic system used was an Agilent Technologies Series 1100 (Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, thermostated autosampler tray and column compartments, and a fluorescence detector. The Agilent ChemStation (Rev. B.03.01) software was used for both instrumental control and chromatographic data acquisition. The Michrom software ([Torres-Lapasió, 2000](#)) was used for chromatographic data processing and optimisation studies.

The elution conditions were optimised. The experimental design consisting of five mobile phases (four located at the corners of a rectangular factor space and the fifth in its centre) buffered at pH 3 was used to examine the chromatographic behaviour of the 5 compounds. Thus, the quinolones were injected into the following mobile phases, SDS (M) / propanol (% v/v): 0.05/2.5, 0.05/12.5, 0.1/7.5, 0.15/2.5, and 0.15/12.5, all containing 0.5% TEA. Furthermore, the model employed for these predictions was ([Berthod & García-Álvarez-Coque, 2000](#)):

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD}\phi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD}\phi}{1 + K_{AD}\phi}} [M]$$

where k is the retention factor, $[M]$ and ϕ are the concentrations of the surfactant and modifier; K_{AS} and K_{AM} correspond to the equilibria between the solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; K_{AD} and K_{MD} measure the relative variation in the concentration of the solute in bulk water and micelles due to the presence of a modifier, as compared to a pure micellar solution (without a modifier).

The analytical separation was performed in a reversed-phase Kromasil C₁₈ column (Scharlab) (150 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size). A fluorescence detection programme was run at the following times and excitation/emission wavelengths (0–10 min: 260/366 nm when OXO and FLU were detected, 10–20 min: 280/450 nm when ENR, DIF and SAR were detected). The flow rate and injection volume were 1 mL/min and 20 µL, respectively. The chromatographic runs were carried out at room temperature.

The pH of the solutions was measured with a Crison potentiometer (Model micropH 2001, Barcelona) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode. The analytical balance used was a Mettler-Toledo AX105 Delta-Range (Greifensee, Switzerland). The vortex shaker and sonification unit were obtained from Selecta (Barcelona).

2.3. Preparation of standard and mobile phase solutions

The micellar mobile phases were prepared by weighing the appropriate amounts of SDS and sodium dihydrogen phosphate. These reagents were dissolved in ultrapure water and 0.5% (v/v) triethylamine was added, then the pH was adjusted to the desired value. Finally, propanol was added to achieve the desired concentration of the organic solvent and then water was added up to the mark-up of the volumetric flask.

Individual stock standard solutions at a concentration of 20 µg/mL for DIF, ENRO, FLU, OXO and SAR were prepared every 2 months. All stock solutions were prepared by dissolving pure substances in 5% ethanol with the aid of an ultrasonic bath, and they were finally filled up with micellar solution of 0.05 M SDS-pH 3. Stock solutions were stored at 4 °C. All working standards were prepared every day with the appropriate dilutions of the concentrated stock solutions. All solutions were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Micron Separations) before analysis.

2.4. Preparation of fish muscle samples

Fish samples of gilthead (Greece), salmon (Norway), trout (Rioja, Spain), sea bass (Santa Pola, Spain), mussel (Galicia, Spain), prawn (Honduras), and turbot (Galicia) were purchased in a local market.

Extraction conditions in fish muscle samples were optimised as follows: fish samples were finely ground using a mincer (Model MZ10, Petra Electric, Burgau, Germany) at 5000 rpm for 5 min. Afterwards, 5 g of homogenised meat was mixed with 50 mL of 0.05 M SDS solution buffered at pH 3, and it was shaken continuously for 1 h. Then, the supernatant was filtered with a vacuum pump through 0.45 µm nylon membranes with a diameter of 47 mm (Sartorius-Stedim), and it was then placed directly into the autosampler vials.

2.5. Method validation

Method validation was performed to meet the criteria specified by [European Commission Decision 2002/657/EC \(2002\)](#).

To verify the absence of interfering endogenous compounds around the retention time of the analytes, 10 blank samples of different fishes were analysed. Stabilising agents (chloramphenicol and ethanol) and other quinolones used (ofloxacin and

marbofloxacin) were spiked into the fish muscle to evaluate any possible interference in the method.

Linearity and sensitivity were checked by injecting the analytes at different concentration levels in order to cover the whole working range. Calibration curves of the spiked blank fish samples for each quinolone were calculated by using a least squares linear regression analysis then plotting the peak area of each analyte versus the analyte concentration. The limit of detection (LOD) was based on the $3s$ criterion using a series of 10 solutions containing a low concentration of each compound. Finally, the limit of quantification (LOQ) was selected as the lowest concentration used in the calibration curve (FDA, 2001).

Decision limits (CC_α) and detection capability (CC_β), which are new criteria in accordance with European Commission Decision 2002/657/EC (2002), were also calculated. For the measurement of CC_α , blank samples were spiked at the respective LOQ level and the MRL concentration of all the quinolones. CC_α was calculated as the theoretical concentrations at the permitted limit plus 1.64 times the corresponding standard deviation (e.g., $CC_\alpha = C_{MRL} + 1.64 \cdot SD$). To obtain the CC_β values, several samples were spiked at the obtained CC_α levels and injected into the chromatographic system. The CC_β calculation was done using the theoretical value of CC_α previously obtained plus 1.64 times the corresponding standard deviation (e.g., $CC_\beta = CC_\alpha + 1.64 \cdot SD$).

Accuracy and precision were also studied by analysing three different concentration levels corresponding to 0.5xMRL, the MRL and 1.5xMRL. Finally, the robustness of the method was evaluated.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation strategy and mobile phase selection

Peak tailing and lengthy retention often occur when the separation of basic compounds, such as quinolones, on silicate HPLC columns is performed. Consequently, the use of an amine (usually triethylamine, TEA) at a low pH (2.5–4.0) as an additive in the mobile phase to protect the silanol groups of the stationary phase is recommended. The piperazinyl moiety of these quinolones results in them having two dissociation constants ($pK_{a1} \approx 3.4$ – 5.7 and $pK_2 \approx 7.2$ – 8.5) (Babic, Horvat, Pavlovic, & Kastelan-Macan, 2007; Hansch, 1990; Hu et al., 2007; Zorita, Martensson, & Mathiasson, 2009). They exist mostly in the cationic form at an acidic pH, in the anionic form at a basic pH, and in the zwitterionic form at a neutral pH. As a result, low pH values are ideal for their separation. In addition, the presence of TEA improves peak efficiencies.

Most analytical procedures in micellar liquid chromatography require the addition of an organic solvent, which also increases the peak efficiency. Usually, it is a short-chain alcohol such as propanol, butanol or pentanol. It is important to consider that the selection of alcohol is directly related to the polarity of the compounds under study.

The quinolones under study have a moderate hydrophobicity (octanol–water partition coefficients, $\log P_{o/w}$, ranging between 0.7–1.6). Therefore, the use of propanol or butanol was preferred. Butanol affords high efficiencies but the five quinolones could not be resolved from the protein front elution band. For this reason, propanol was preferred to carry out the optimisation procedure.

The optimisation criterion was to obtain a mobile phase that allows the complete separation (maximum resolution) in an appropriate analysis time. Interpretative optimisation strategies can be assisted by computer simulation with the aid of the Michrom software (Torres-Lapasíó, 2000), which can graphically mimic the methodology followed by experienced chromatographers with reduced time and effort. The results corroborate the usual behaviour, that is to say, retention times (t_R) increased when the

concentration of surfactant and modifier decreased. Furthermore, the resolution increased at decreasing surfactant concentrations (Berthod & García-Álvarez-Coque, 2000). On the one hand, efficiencies increased at higher concentrations of the modifier; and decreased when surfactant concentrations increased. Errors below 2.8% were obtained for the prediction of retention factors.

The global resolution diagram is depicted in Fig. 1a which shows how resolution values near one (maximum value) can be obtained using mobile phases that contain propanol at a concentration higher than 7.5% and a SDS concentration of below 0.1 M. The best resolution value was obtained for a composition of 0.05 M SDS – 12.5% propanol – 0.5% TEA ($R = 0.99997$) with an analysis time of 23 min. However a good resolution ($R = 0.9998$) was also achieved in 0.065 M SDS – 12.5% propanol – 0.5% TEA reducing the analysis time up to 18 min. The method developed is designed to be used for routine analysis. Thus, it is interesting to shorten the analysis time without damaging the resolution. This was achieved by only increasing the SDS concentration from 0.05 to 0.065 M. The resolution at both SDS concentrations is practically the same. Therefore, the last mobile phase was selected to carry out the method validation. The chromatographic parameters (t_R ; k ; N , efficiencies; and B/A , asymmetry factors) obtained for the quinolones using this mobile phase were: OXO (4.1, 1.9, 1500, 1.5), FLU (8.9, 5.4, 2400, 1.2), ENR (12.3, 7.8, 2000, 1.3), DIF (14.4, 9.3, 2000, 1.3) and SAR (16.6, 10.9, 2200, 1.4). Fig. 1b shows the simulated chromatogram for the mixture of the five quinolones in the selected mobile phase. The agreement between the simulated and experimental chromatograms (Fig. 1c) is optimum.

3.2. Optimisation of sample preparation

The optimisation of sample preparation focused on the extraction of 5 quinolones from fish muscle without the aid of organic solvents. Firstly, the fish muscle was diluted ten times in a micellar solution of 0.05 M SDS solution buffered at pH 3 and shaken for 15 min. After centrifugation at 3000 rpm for 5 min, the supernatant obtained was again diluted (1:10) in order to filter the fish sample directly through a nylon microfilter into the autosampler. However, an improvement of sensibility was observed when the extraction of quinolones from biological matrices was only diluted once and shaken for 1 h. Then, the supernatant was filtered through a nylon membrane with the aid of a vacuum pump, which avoids the need for a second dilution.

3.3. Method validation

Validation was done according to the European Union regulation 2002/657/EC decision (2002). The parameters evaluated were: selectivity, linearity, detection and quantification limits, decision limits, detection capabilities, precision, accuracy, recovery and robustness.

3.3.1. Selectivity

No interference for endogenous compounds was found in the fish matrices studied, as seen in Figs. 2a and 2b (top). Figs. 2a and 2b (bottom) show the two chromatograms obtained from the two different chromatographic sets of a spiked gilthead and mussel samples of the five fluoroquinolones, respectively, analysed with the optimum mobile phase. Peaks that could be assigned to fish endogenous compounds do not interfere with those of the analytes.

3.3.2. Linearity and sensitivity

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks obtained at twelve increasing concentrations (six replicates) in the fish matrix solutions (1:10 dilution factor)

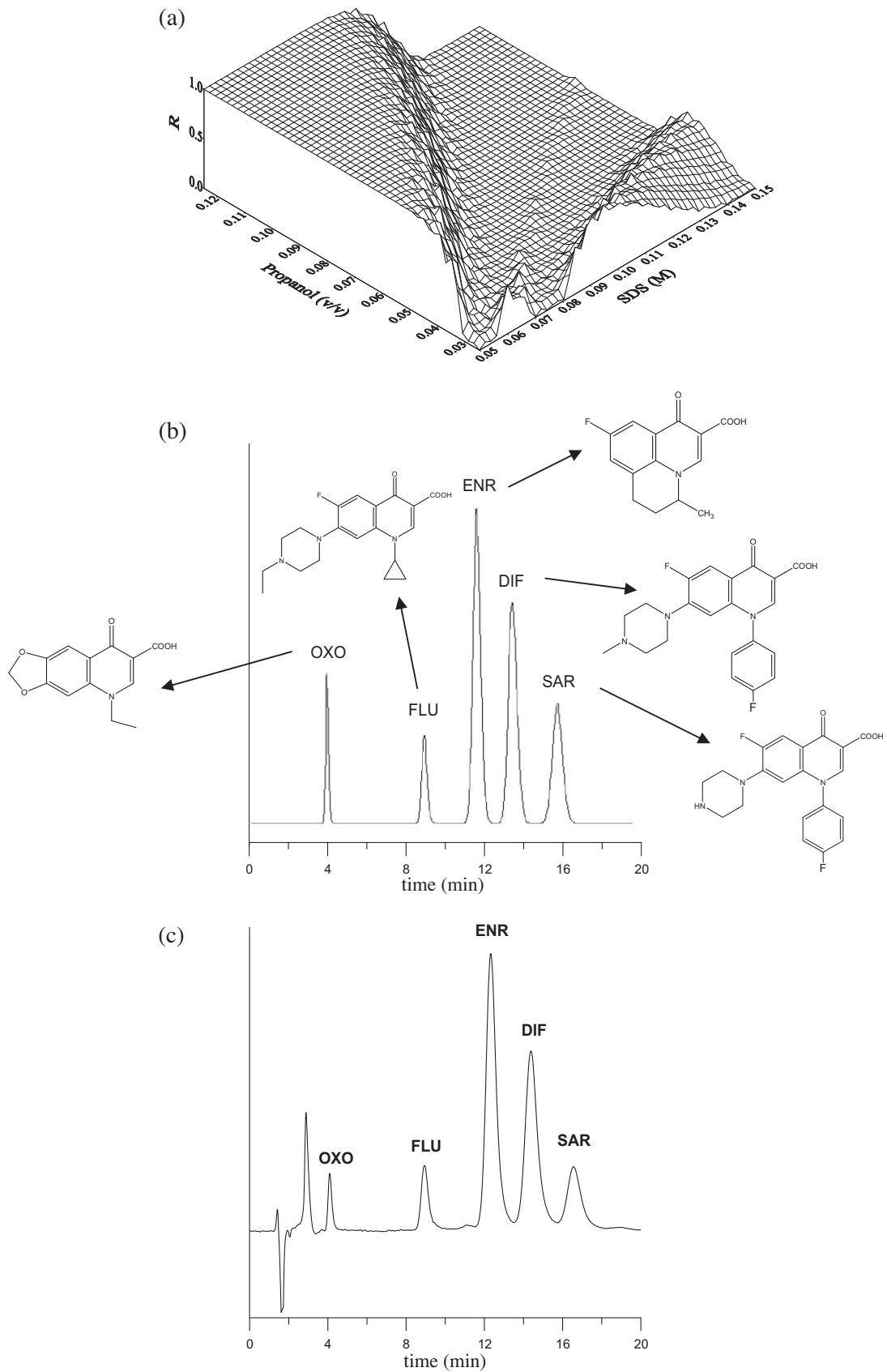


Fig. 1. Global resolution diagram (a), and the simulated (b) and real (c) chromatograms obtained. Mobile phase: 0.065 M SDS-12.5% propanol-0.5% TEA-pH 3. Compounds: difloxacin (DIF), flumequine (FLU), enrofloxacin (ENR), oxolinic acid (OXO), and sarafloxacin (SAR).

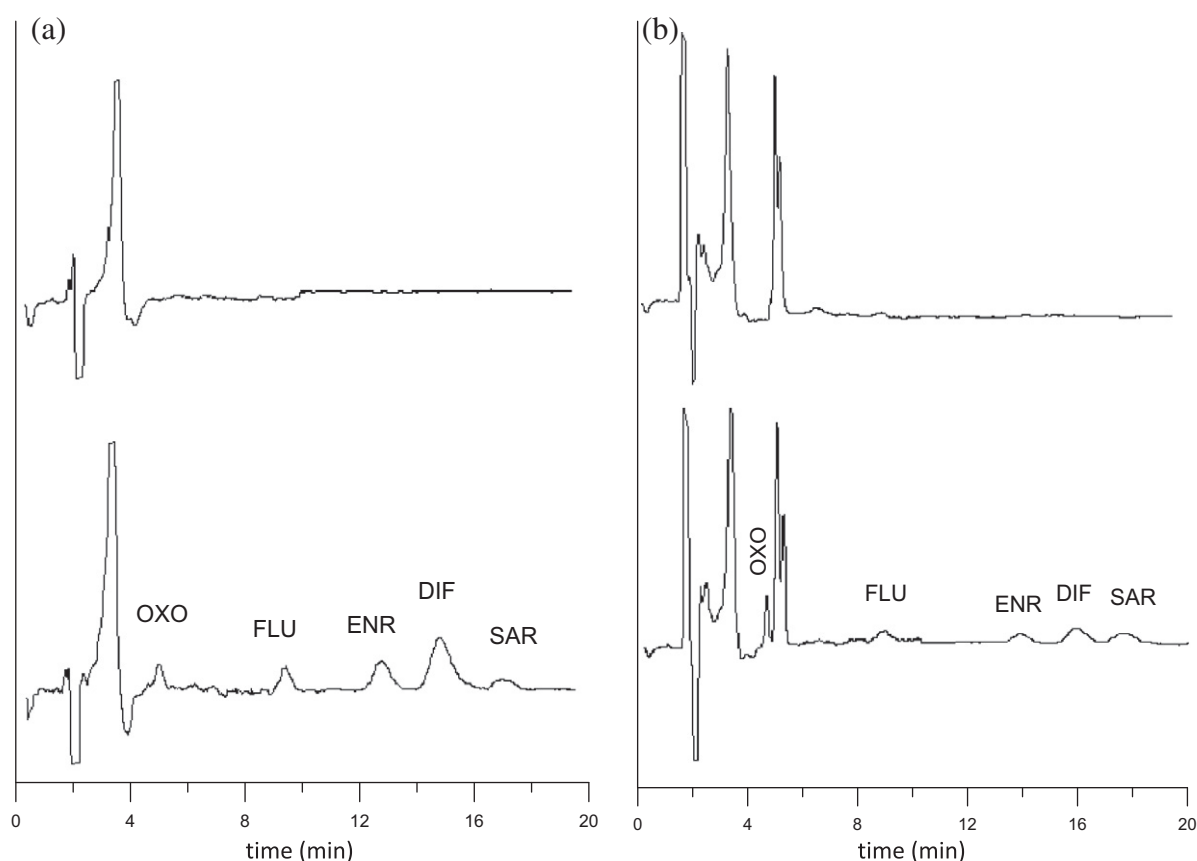


Fig. 2. Chromatograms of (a) blank (top) and spiked gilthead sample (bottom) and (b) blank (top) and spiked mussel sample (bottom). Mobile phase: 0.065 M SDS–12.5% propanol–0.5% TEA–pH 3.

in the following ranges: 10–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for difloxacin, 5–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for enrofloxacin, 30–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for flumequine and oxolinic acid, and 15–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for sarafloxacin. To study the variability of the calibration parameters, curves were obtained for 5 days over a 2-month period for a different set of standards. The slope and intercept were determined using the least squares linear regression analysis method. The adjusted equations and regression coefficients (r^2) for each quinolone are:

$$\begin{array}{ll}
 \text{Difloxacin} & y = 0.064 \times -0.014 \quad r^2 = 0.99994 \\
 \text{Enrofloxacin} & y = 0.0837 \times -0.017 \quad r^2 = 0.99993 \\
 \text{Flumequine} & y = 0.0127 \times -0.018 \quad r^2 = 0.99959 \\
 \text{Oxolinic acid} & y = 0.0060 \times -0.0020 \quad r^2 = 0.99949 \\
 \text{Sarafloxacin} & y = 0.0243 \times -0.011 \quad r^2 = 0.99937
 \end{array} \quad (1)$$

The limit of detection (LOD) for the five quinolones in fish ($n = 10$) was determined with the $3s$ criterion (FDA, 2001) (three times the standard deviation of the lowest concentration solution included in the calibration divided by the slope of the calibration curve) using a series of 10 solutions containing a low concentration of each compound. The results were based on the standard deviation of the response, and also on the slope of a specific calibration curve containing the analyte. The LODs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) were 2, 1, 7, 6 and 3 for difloxacin, enrofloxacin, flumequine, oxolinic acid and sarafloxacin, respectively. The limit of quantification (LOQ) in fish muscle was selected as the lowest concentration used in the calibration curve and it was calculated using the $10s$ criterion (ten times the standard deviation of the lowest concentration solution included in the calibration divided by the slope of the calibration

curve). The LOQs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) were 10, 5, 30, 30 and 15 for difloxacin, enrofloxacin, flumequine, oxolinic acid and sarafloxacin, respectively. The results are in accordance with the limits established in Council Regulation EEC 2377/90.

3.3.3. Decision limit and detection capability

According to the 2002/657/EC decision (2002), the criteria CC_α (limit of decision) and CC_β (detection capability) were calculated for the method in order to complete the validation procedure. The decision limit (CC_α) is the limit at and above which it can be concluded that a sample is non-compliant with an error probability of α . The detection capability CC_β implies the smallest content of a substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β . For the measurements of CC_α and CC_β , 20 blank fish muscle samples were spiked at the LOQ level and 20 more at the MRL level for each quinolone. Table 1 summarises the CC_α and CC_β values obtained.

3.3.4. Precision, accuracy and recoveries

The intra- and inter-day precisions and accuracy of the method were determined by analysing the five quinolones at three different concentrations: 0.5xMRL, the MRL and the 1.5xMRL according to the limits defined by Council Regulation EEC 2377/90. The intra-day analysis was determined by injecting these three test solutions six times on the same day, while the inter-day analysis was the average of the six measurements of the intra-day values taken on 5 days over a 3-month period, which were performed by different analysts and equipment at the same concentrations. The results, expressed as the percentage of the relative standard deviation

Table 1Values of error α and β , decision limits (CC_{α}) and detection capabilities (CC_{β}) calculated at the LOQ levels^a ($n = 20$) of the method and at the MRLs^b ($n = 20$) for the quinolones.

Analytes	Added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Measured \pm S.D. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Error α ($1.64 \times \text{S.D.}$)	CC_{α} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Measured \pm S.D. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Error β ($1.64 \times \text{S.D.}$)	CC_{β} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Difloxacin	10 ^a	10.6 \pm 0.7	1.1	11.1	11.1	10.1 \pm 0.6	1.0	12.1
	300 ^b	295.1 \pm 2.3	3.8	303.8	303.8	311.8 \pm 2.3	3.8	307.6
Enrofloxacin	5 ^a	4.5 \pm 0.5	0.8	5.8	5.8	5.41 \pm 0.18	0.3	6.1
	100 ^b	97.5 \pm 1.7	2.8	102.8	102.8	99.3 \pm 1.0	1.6	104.4
Flumequine	30 ^a	30.1 \pm 2.3	3.8	33.8	33.8	35 \pm 3	4.9	38.7
	600 ^b	603.8 \pm 2.4	3.9	603.9	603.9	608.7 \pm 2.1	3.4	607.3
Oxolinic acid	30 ^a	30.7 \pm 1.9	3.1	33.1	33.1	34 \pm 3	4.9	38.0
	100 ^b	104.9 \pm 1.0	1.6	101.6	101.6	110.3 \pm 2.1	3.4	105.0
Sarafloxacin	15 ^a	15.3 \pm 1.1	1.8	16.8	16.8	17.2 \pm 1.5	2.5	19.3
	30 ^b	28.3 \pm 1.4	2.3	32.3	32.3	31.8 \pm 1.1	1.8	34.1

Table 2Intra-day ($n = 6$) and inter-day ($n = 5$) precision and accuracy of analytes.

Analyte	Concentration added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intra-day			Inter-day		
		Found (mean \pm SD) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Accuracy E_r (%)	Precision RSD (%)	Found (mean \pm SD) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Accuracy E_r (%)	Precision RSD (%)
Difloxacin	150 ^a	156.8 \pm 0.7	4.5	0.4	154.2 \pm 2.1	2.8	1.4
	300 ^b	289.1 \pm 1.3	3.6	0.4	304 \pm 4	1.3	1.3
	450 ^c	445.5 \pm 0.8	1.0	0.2	452.1 \pm 0.8	0.5	0.2
Enrofloxacin	50 ^a	46.3 \pm 0.9	7.4	1.9	47 \pm 3	6.0	6.4
	100 ^b	97.7 \pm 1.9	2.3	1.9	94 \pm 3	6.0	3.2
	150 ^c	152.6 \pm 1.9	1.7	1.2	150.8 \pm 2.0	0.5	1.3
Flumequine	300 ^a	300 \pm 3	0.0	1.0	300.7 \pm 1.5	0.2	0.5
	600 ^b	603.8 \pm 2.4	0.6	0.4	599 \pm 3	0.2	0.5
	900 ^c	907.7 \pm 2.1	0.9	0.2	905 \pm 4	0.6	0.4
Oxolinic acid	50 ^a	53 \pm 3	6.0	5.7	50.1 \pm 1.7	0.2	3.4
	100 ^b	104 \pm 6	4.0	5.8	100 \pm 3	0.0	3.0
	150 ^c	154 \pm 3	2.7	1.9	155 \pm 3	3.3	1.9
Sarafloxacin	15 ^a	15.9 \pm 0.6	6.0	3.8	15.6 \pm 0.4	4.0	2.6
	30 ^b	29.1 \pm 1.4	3.0	4.8	29.0 \pm 1.0	3.3	3.4
	45 ^c	42.1 \pm 0.5	6.4	1.2	43.2 \pm 1.7	4.0	3.9

^a 0.5xMRL.^b MRL.^c 1.5xMRL.**Table 3**Recovery from different types of commercial fish spiked with the five quinolones at three different concentrations ($n = 6$).

Analyte	Added Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)						
		Salmon	Trout	Gilthead	Sea bass	Mussel	Prawn	Turbot
Difloxacin	150 ^a	105.8 \pm 1.5	99.2 \pm 1.4	109.0 \pm 1.3	99.8 \pm 1.1	93.8 \pm 1.1	105.4 \pm 0.5	88.4 \pm 0.6
	300 ^b	92.5 \pm 0.9	105.9 \pm 0.8	106.4 \pm 1.7	101.7 \pm 2.2	95.8 \pm 0.5	103.4 \pm 0.3	92.7 \pm 2.3
	450 ^c	101.2 \pm 2.1	101.1 \pm 1.1	106.6 \pm 1.7	95 \pm 3	106.8 \pm 1.9	97.51 \pm 0.23	98.6 \pm 0.7
Enrofloxacin	50 ^a	96.2 \pm 0.3	96.3 \pm 0.3	103.7 \pm 0.9	94.9 \pm 0.4	106.23 \pm 0.23	90.5 \pm 0.5	98.6 \pm 0.5
	100 ^b	94.14 \pm 0.05	103.9 \pm 1.6	105.1 \pm 1.0	109.7 \pm 0.6	101.8 \pm 0.6	100.6 \pm 0.5	106.3 \pm 0.8
	150 ^c	105.9 \pm 1.2	101.8 \pm 1.7	100.8 \pm 1.4	106.1 \pm 1.0	97.3 \pm 0.7	97.5 \pm 0.3	102.8 \pm 1.5
Flumequine	300 ^a	103.1 \pm 0.6	108.9 \pm 0.8	100.26 \pm 0.03	90.4 \pm 0.3	89.4 \pm 1.0	104.8 \pm 0.6	89.4 \pm 1.0
	600 ^b	97.44 \pm 0.18	106.6 \pm 0.3	95.2 \pm 0.7	95.6 \pm 0.6	101.9 \pm 2.3	97.3 \pm 0.5	92.1 \pm 2.3
	900 ^c	102.23 \pm 0.04	108.9 \pm 0.4	96.1 \pm 0.5	87.32 \pm 0.23	98 \pm 3	86.7 \pm 0.3	88.4 \pm 0.6
Oxolinic acid	50 ^a	105.57 \pm 0.19	96.4 \pm 0.5	101.3 \pm 0.9	107.67 \pm 0.19	104.3 \pm 0.3	104.33 \pm 0.16	104 \pm 4
	100 ^b	104.05 \pm 0.18	104.9 \pm 1.0	97.67 \pm 0.06	92.6 \pm 0.6	104.50 \pm 0.15	92.5 \pm 0.6	97.7 \pm 0.5
	150 ^c	106.37 \pm 0.12	97.2 \pm 0.8	108.9 \pm 0.9	102.7 \pm 0.3	99.4 \pm 0.8	103.5 \pm 0.9	101.9 \pm 0.6
Sarafloxacin	15 ^a	106.4 \pm 0.6	98.53 \pm 0.03	100.1 \pm 0.6	103.4 \pm 0.3	99.2 \pm 0.3	105.1 \pm 0.5	107.3 \pm 0.5
	30 ^b	104.6 \pm 0.6	104.8 \pm 0.5	105.5 \pm 0.4	99.9 \pm 0.3	100 \pm 0.5	99.97 \pm 0.17	100.59 \pm 0.17
	45 ^c	104.8 \pm 0.3	105.3 \pm 0.6	104.1 \pm 0.3	98.5 \pm 0.5	106.7 \pm 0.9	98.6 \pm 0.7	109.4 \pm 0.7

^a 0.5xMRL.^b MRL.^c 1.5xMRL.

Table 4
Robustness evaluation of the developed MLC method.

Chromatographic changes	Level	Difloxacin		Enrofloxacin		Flumequine		Oxolinic Acid		Sarafloxacin	
		t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	t _R (min)	Area	t _R (min)	Area
A: SDS concentration (M)											
0.06	-0.05	11.8	0.72	13.8	1.50	9.3	0.81	4.1	0.057	15.8	0.066
0.065	0	11.2	0.76	13.2	1.55	8.4	0.74	3.8	0.058	15.0	0.067
0.07	+0.05	10.9	0.70	11.5	1.48	8.5	0.82	3.7	0.055	14.3	0.068
Mean ± SD		11.3 ± 0.5	0.73 ± 0.03	12.8 ± 1.2	1.51 ± 0.04	8.7 ± 0.5	0.79 ± 0.04	3.87 ± 0.21	0.0567 ± 0.0015	15.0 ± 0.8	0.0670 ± 0.0010
RSD (%)		4.4	4.1	9.4	2.6	5.7	5.1	5.4	2.6	5.3	1.5
B: Percentage of propanol (v/v)											
12.4	-0.1	11.0	0.72	13.1	1.50	8.4	0.74	3.8	0.058	14.8	0.063
12.5	0	11.2	0.76	13.2	1.55	8.4	0.74	3.8	0.058	15.0	0.067
12.6	+0.1	10.4	0.70	12.0	1.48	8.2	0.73	3.7	0.055	13.9	0.063
Mean ± SD		10.9 ± 0.4	0.73 ± 0.03	12.8 ± 0.7	1.51 ± 0.04	8.33 ± 0.12	0.737 ± 0.006	3.77 ± 0.06	0.0570 ± 0.0017	14.6 ± 0.6	0.0643 ± 0.0023
RSD (%)		3.7	4.1	5.5	2.6	1.4	0.8	1.6	3.0	4.1	3.6
C: pH of mobile phase											
2.9	-0.1	11.4	0.71	13.5	1.60	8.9	0.78	4.0	0.058	15.2	0.063
3	0	11.2	0.76	13.2	1.55	8.4	0.74	3.8	0.058	15.0	0.067
3.1	+0.1	11.1	0.74	13.0	1.74	8.0	0.77	3.6	0.053	14.9	0.063
Mean ± SD		11.23 ± 0.15	0.737 ± 0.025	13.23 ± 0.25	1.63 ± 0.10	8.4 ± 0.5	0.763 ± 0.021	3.80 ± 0.20	0.056 ± 0.003	15.03 ± 0.15	0.0643 ± 0.0023
RSD (%)		1.3	3.4	1.9	6.1	6.0	2.8	5.3	5.4	1.0	3.6
D: Flow rate (mL/min)											
0.9	-0.1	12.8	0.77	14.8	1.71	9.5	0.76	4.3	0.062	17.1	0.065
1	0	11.2	0.76	13.2	1.55	8.4	0.74	3.8	0.058	15.0	0.067
1.1	+0.1	10.3	0.86	11.9	1.48	7.6	0.73	3.5	0.051	13.9	0.062
Mean ± SD		11.4 ± 1.3	0.80 ± 0.06	13.3 ± 1.5	1.58 ± 0.12	8.5 ± 1.0	0.743 ± 0.015	3.9 ± 0.4	0.057 ± 0.006	15.3 ± 1.6	0.0647 ± 0.0025
RSD (%)		11.4	7.5	11.3	7.6	11.8	2.0	10.3	10.5	10.5	3.9
E: Percentage of TEA (v/v)											
0.45	-0.05	12.3	0.73	14.4	1.55	9.7	0.73	4.4	0.052	16.8	0.060
0.5	0	11.2	0.76	13.2	1.55	8.4	0.74	3.8	0.058	15.0	0.067
0.55	+0.05	11.0	0.74	12.8	1.54	8.2	0.77	3.8	0.056	14.7	0.064
Mean ± SD		11.5 ± 0.7	0.743 ± 0.015	13.5 ± 0.8	1.547 ± 0.006	8.8 ± 0.8	0.747 ± 0.021	4.0 ± 0.3	0.055 ± 0.003	15.5 ± 1.1	0.064 ± 0.004
RSD (%)		6.1	2.0	5.9	0.4	9.1	2.8	7.5	5.4	7.1	6.3

(RSD, precision) and relative error (E_r , accuracy) for the intra- and inter-day values are shown in Table 2. The method was found to be precise and accurate as the RSD (%) and E_r (%) were below 6.4 % and 7.4 %, respectively.

The applicability of the procedure to determine quinolones developed herein was tested by their analysis in spiked fish samples, which were bought at a local market (they were all from aquaculture farms).

The recovery study was done by spiking the fish samples (salmon, trout, gilthead, sea bass, mussel, prawn, and turbot) with known amounts of the quinolones at three different concentrations (0.5xMRLs, MRL and 1.5xMRL, six replicates for each level). The spiked samples were processed and analysed with the developed procedure. Recovery values were calculated by comparing the concentration obtained from the fish samples with the added amounts. The data obtained (Table 3) showed satisfactory recoveries for the five quinolones, and the results were in the range of 87–110%. These results are in accordance with Council Regulation EEC 2377/90. These results indicate that a surveillance programme for quinolones residue can be performed under the proposed chromatographic conditions.

3.3.5. Robustness

The robustness of the method was examined by replicate injections ($n = 6$) of a standard solution of the five quinolones at the MRL concentration with slight changes made to the chromatographic parameters (surfactant concentration, percentage of propanol, pH, percentage of TEA and flow rate). Insignificant differences in the peak areas and low variability in the retention times were observed when the above-mentioned parameters were modified. The results, shown in Table 4, indicate that the selected factors remain sufficiently unaffected by the slight variations made to these parameters. As expected, flow rate and TEA (%) variation had the strongest influence on the retention of the studied compounds in contrast to the other parameters.

3.3.6. Quinolone control in real samples

Finally, the method was applied to the determination of the quinolones studied in real fish samples (salmon, trout, gilthead, sea bass, mussel, prawn, and turbot). The analysis of these samples did not reveal the presence of quinolones.

4. Conclusions

In this procedure the optimisation of sample preparation focused on the extraction of five quinolones from fish muscles without the aid of organic solvents, which makes the procedure less toxic and relatively inexpensive.

The procedure developed here is rapid and allows the simultaneous determination of the residues of quinolones in different fish matrices with high sensitivity. The designed method easily achieves a high sample throughput with a short preparation time, and it proves useful in the food quality testing and control area to determine the content of quinolones in fish samples. The proposed chromatographic procedure provides good results for the determination of quinolones in fish samples in terms of selectivity, linearity, accuracy, recoveries and robustness and sensitivity at the $\mu\text{g}/\text{kg}$ level.

Acknowledgements

This work has been supported by funding from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) CTQ 200764473/BQU and from the Foundation Caixa Castelló-Bancaixa P1-1B2006-12.

Maria Rambla-Alegre also wishes to thank the MEC for the FPU grant.

References

- Andreu, V., Blasco, C., & Pico, Y. (2007). Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 534–556.
- Babic, S., Horvat, A. J. M., Pavlovic, D. M., & Kastelan-Macan, M. (2007). Determination of pK(a) values of active pharmaceutical ingredients. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043–1061.
- Barron, D., Jimenez-Lozano, E., Bailac, S., & Barbosa, J. (2002). Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 767(2), 313–319.
- Berthod, A., & García-Álvarez-Coque, M. C. (2000). *Micellar Liquid Chromatography*. New York: Marcel-Dekker.
- Christodoulou, E. A., Samanidou, V. F., & Papadoyannis, L. N. (2007). Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 859(2), 246–255.
- Commission Decision 2002/657/EC (2002). *Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*. <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm> Accessed 19.10.2009.
- Council Regulation (EEC) No. 2377/90 (1990). *Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin*. <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm> Accessed 19.10.2009.
- Currie, D., Lynas, L., Kennedy, D. G., & McCaughey, W. J. (1998). Evaluation of a modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. *Food Additives and Contaminants*, 15(6), 651–660.
- Diaz-Cruz, M. S., & Barcelo, D. (2007). Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 637–646.
- Espinosa-Mansilla, A., de la Pena, A. M., Gomez, D. G., & Lopez, F. S. (2006). Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection. *Talanta*, 68(4), 1215–1221.
- Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S., Gil-Agusti, M., Capella-Peiro, M. E., & Bose, D. (2005). Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 24(2), 75–91.
- FDA (2001). *Guidance for Industry. Bioanalytical Method validation*. U.S. Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration*. Rockville, MD, USA. <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.pdf>> Accessed: 19.10.2009.
- FS, A. H. (1988). *American Hospital Formulary Service. Drug Information*. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists.
- Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C., & Giger, W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, 74(21), 5455–5462.
- Hansch, C. C. (1990). In R. G. Sammes & J. B. Taylor (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry*, vol. 6. Oxford: Pergamon Press.
- Hermo, M. P., Nemutlu, E., Kir, S., Barron, D., & Barbosa, J. (2008). Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC-UV, LC-FD, LC-MS and LC-MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 98–107.
- Hernandez-Arteseros, J. A., Compano, R., Ferrer, R., & Prat, M. D. (2000). Application of principal component regression to luminescence data for the screening of ciprofloxacin and enrofloxacin in animal tissues. *Analyst*, 125(6), 1155–1158.
- Holtzapfel, C. K., Buckley, S. A., & Stanker, L. H. (1999). Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones in chicken liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2963–2968.
- Hu, J. Y., Wang, W., Zhu, Z., Chang, H., Pan, F., & Lin, B. L. (2007). Quantitative structure - Activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials. *Environmental Science & Technology*, 41(13), 4806–4812.
- Huang, J. F., Lin, B., Yu, Q. W., & Feng, Y. Q. (2006). Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(5), 1228–1235.
- Karbiwnyk, C. M., Carr, L. E., Turnipseed, S. B., Andersen, W. C., & Miller, K. E. (2007). Determination of quinolone residues in shrimp using liquid chromatography with fluorescence detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 596(2), 257–263.
- Marazuela, M. D., & Moreno-Bondi, M. C. (2004). Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1034(1–2), 25–32.
- Paschoal, J. A. R., Reyes, F. G. R., & Rath, S. (2009). Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia filets by LC-ESI-MS-MS QToF. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(8), 2213–2221.

- Pecorelli, I., Galarini, R., Bibi, R., Floridi, A., & Casciarri, E. (2003). Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 483(1–2), 81–89.
- Romero-Gonzalez, R., Lopez-Martinez, J. C., Gomez-Milan, E., Garrido-Frenich, A., & Martinez-Vidal, J. L. (2007). Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 857, 142–148.
- Samanidou, V., Evaggelopoulos, E., Trotsmuller, M., Guo, X. H., & Lankmayr, E. (2008). Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1203(2), 115–123.
- Su, S. C., Chang, M. H., Chang, C. L., Chang, P. C., & Chou, S. S. (2003). Simultaneous determination of quinolones in livestock and marine products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(2), 114–127.
- Torres-Lapasió, J. R. (2000). *Michrom software*. New York: Marcel Dekker.
- Zhou, J. H., Xue, X. F., Chen, F., Zhang, J. Z., Li, Y., Wu, L. M., et al. (2009). Simultaneous determination of seven fluoroquinolones in royal jelly by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 32(7), 955–964.
- Zorita, S., Martensson, L., & Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2760–2770.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Analysis of omeprazole and its main metabolites by liquid chromatography using hybrid micellar mobile phases

Maria Rambla-Alegre, Josep Esteve-Romero, Samuel Carda-Broch*

Àrea de Química Analítica, QFA, Universitat Jaume I, 12071 Castelló, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2008

Received in revised form 6 October 2008

Accepted 21 November 2008

Available online 3 December 2008

Keywords:

Direct injection

Micellar liquid chromatography

Omeprazole

Metabolites

Urine

Serum

Pharmaceuticals

ABSTRACT

Omeprazole is a selective inhibitor of gastric acid secretion and is one of the most widely prescribed drugs internationally. A chromatographic procedure that uses micellar mobile phases of sodium dodecyl sulphate and propanol buffered at pH 7 and a C18 column is reported for the determination of omeprazole and its principal metabolites (omeprazole sulphone and hydroxyomeprazole) in urine and serum samples.

In this work, direct injection and UV detection set at 305 nm was used. Omeprazole and its metabolites were eluted in less than 11 min with no interference by the protein band or endogenous compounds. Adequate resolution was obtained with a chemometric approach, in which the retention factor and shape of the chromatographic peaks were taken into account. The analytical parameters including linearity ($r > 0.9998$), intra- and inter-day precision (RSD, %: 0.6–7.9 and 0.14–4.7, respectively) and robustness were studied in the validation of the method for the three compounds. The limits of detection and quantification were less than 6 and 25 ng mL⁻¹, respectively. Recoveries in micellar medium, plasma and urine matrices were in the 98–102% range. Finally, the method was successfully applied to the determination of omeprazole and its metabolites in physiological samples. Omeprazole was also analysed in pharmaceutical formulations.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Omeprazole (OME) (Fig. 1a) is a proton pump inhibitor which blocks production of acid by the stomach [1]. It is a substituted benzimidazole gastric antiseptic agent. It is used in the treatment of dyspepsia, peptic ulcer disease, gastro-oesophageal reflux disease and Zollinger–Ellison syndrome, which are all caused by stomach acid. OME blocks the enzyme in the wall of the stomach that produces acid, thus decreasing its production, and allowing the stomach and oesophagus to heal.

Chemically, OME is a hydrophobic compound ($\log P_{o/w} = 2.23$) and it is a weak base whose dissociation constants are $pK_a = 4.2, 9.0$ [2]. OME is a racemate (i.e. it can have equal amounts of the two *S* and *R* enantiomers). In the acidic conditions of the stomach, both are converted to achiral products, which react with the cysteine group in H⁺/K⁺-ATPase, thereby destroying the ability of parietal cells to produce gastric acid.

OME is combined with antibiotics in eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection of the stomach. In medical practice, OME is available as tablets and capsules in strengths from 20 to 120 mg daily, and as a powder (omeprazole sodium) for intravenous

injection. Most oral omeprazole preparations are enteric-coated due to rapid degradation of the drug in the acidic conditions inside the stomach.

After oral administration, OME is rapidly absorbed in the small intestine, a process that is usually completed within 3–6 h. Concomitant intake of food has no influence on bioavailability. OME is almost completely metabolised by the cytochrome P450 system, mainly in the liver. Metabolites that have been identified to date are omeprazole sulphone (OMES) (Fig. 1b) and 5-hydroxyomeprazole (HOME) (Fig. 1c), which are the most important, omeprazole sulphide, and carboxyomeprazole, and at least three other unidentified compounds which exert no significant effect on acid secretion. About 80% of an orally given dose is excreted as metabolites in urine and the remainder is found in faeces. The initial plasma concentration for toxicity is observed at 1.01 mg L⁻¹ [1].

Several methods for determination of OME have been reported in pharmaceuticals and biological fluids, including high performance liquid chromatography (HPLC) employing electrochemical and coulometric detection [3,4], capillary electrophoresis [5], spectrophotometry [6], polarography [7] and voltammetry [8].

Most of the methods that have been described refer to the use of HPLC-UV and HPLC-MS systems for determination of OME alone in biological fluids [9–14]. Moreover, few publications have reported a simple HPLC method for the simultaneous determination of OME, HOME and OMES in human plasma [15–23]. HPLC methods includ-

* Corresponding author. Tel.: +34 964 728095; fax: +34 964 728066.
E-mail address: scarda@qfa.uji.es (S. Carda-Broch).

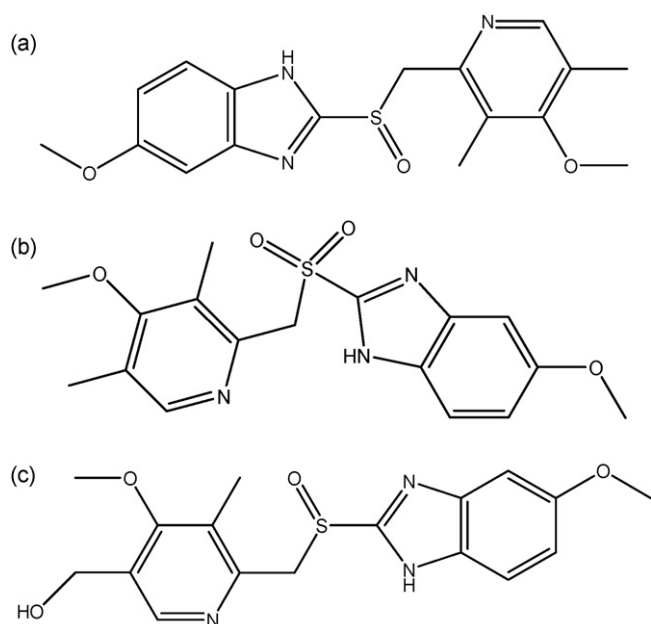


Fig. 1. Structure of omeprazole (a) and its metabolites omeprazole sulphone (b) and 5-hydroxyomeprazole (c).

ing enantioselective separation have recently become a method of choice [24–28]. Although these methods are selective, fast and sensitive, they are not suitable for routine clinical analysis because they require long-term pretreatment of the samples and expensive equipment that is not available in most control laboratories. Other investigations have focused on studying the stability and degradation of OME [29–33]. The review published by Espinosa-Bosch et al. [34] concludes that the ion-spray LC–MS–MS method has advantages in providing a shorter analytical run time, higher selectivity and a much lower limit of quantification compared with previous analytical methods.

HPLC methods applied in the analysis of serum and urine usually require elaborate sample pretreatment, including the removal of interferences and extraction procedure of the analytes. Micellar liquid chromatography (MLC) is a useful technique to analyse complex matrices without the aid of extraction, which reduces the cost and the time of the analysis runs, increases sample throughput, and decreases sources of error [35]. Micelles tend to bind proteins competitively, thereby releasing protein-bound drugs and proteins, rather than precipitation into the column, they are solubilised and washed away harmlessly to elute with the solvent front. MLC has been proved to be a useful technique in the determination of diverse groups of drugs such as trazodone in serum [36], and other drug materials [37]. The retention mechanisms (i.e. solute-mobile phase and solute-stationary phase interactions) in MLC are fairly well understood, and there is a reasonable theoretical foundation on which to build. MLC is a fascinating example of the benefits of secondary equilibrium in RPLC [35]. The primary equilibrium is solute partitioning between bulk solvent (i.e. water or aqueous-organic mixture) and the stationary phase. A secondary equilibrium is established with the micelles in the mobile phase. Both equilibria are affected by a variety of factors, such as the type and concentration of surfactant and additives (e.g. salts or organic modifiers), temperature, ionic strength and pH.

In this work a sensitive method was developed and validated for the simultaneous determination of OME and its two main metabolites in biological fluids without any previous pretreatment. It was also applied to the analysis of OME in pharmaceutical formulations. The method was validated according to Food and Drug Analysis (FDA) guidelines [38].

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Omeprazole was purchased from Sigma (MO, USA). Omeprazole sulphone and 5-hydroxyomeprazole were kindly donated by AstraZeneca (Sweden). Sodium dodecyl sulphate (SDS) and sodium hydroxide were from Merck (Germany). Ultrapure water was used throughout (Millipore S.A.S., France). Sodium dihydrogen phosphate and propanol were from Scharlab (Spain). Hydrochloric acid, methanol and ethanol were from J.T. Baker (The Netherlands). The pharmaceuticals produced by Normon (Spain), Ratiopharm España (Spain) and Pensa Pharma (Spain) were purchased in a local pharmacy.

2.2. Instrumentation

The chromatographic system (Agilent Technologies, Series 1100, CA, USA) was equipped with a quaternary pump, thermostatted autosampler tray and column compartments, and a diode-array detector (range 190–700 nm). The column was a Kromasil C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size, Scharlab). The pH of solutions was measured with a potentiometer model GLP 22 (Crison, Spain) equipped with a combined Ag/AgCl/glass electrode. The analytical balance used was an AX105 Delta-Range (Mettler-Toledo, Switzerland). A vortex shaker and sonication unit (Selecta, Spain) were employed for sample pretreatment. A Centronic-BL centrifuge (Selecta) was used to centrifuge serum samples.

2.3. Mobile phase, standard and sample preparation

The micellar mobile phases were prepared by dissolving SDS in water and were buffered with sodium dihydrogen phosphate 0.01 M at pH 7 using sodium hydroxide 0.1 M. Finally, propanol was added to achieve the desired concentration of the organic solvent and then topped up with water to the mark on the volumetric flask. All mobile phases were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Micron Separations, MA, USA). Typically, to prepare 500 mL of the optimum mobile phase 0.08 M SDS–10% propanol–pH 7, 11.52 g of SDS and 0.69 g of disodium hydrogenphosphate were weighed and dissolved in ultrapure water. Then the pH was fixed at 7 with NaOH 0.1 M. After this, 50 mL of 1-propanol were added to achieve the 10% concentration of the alcohol. Finally, the volumetric flask was topped up to 500 mL with ultrapure water.

A stock solution of 20 μg mL⁻¹ of each compound (OME, OMES and HOME) was prepared by dissolving each of them in a few millilitres of ethanol, with the aid of an ultrasonic bath, and finally topped up with 0.1 M SDS solution at pH 9.

Blood samples were collected using a DB SST Tube (BD Vacutainer Systems, UK) and centrifuged for 5 min at 3000 rpm and a temperature of 4 °C, and then liquid was separated from precipitated protein and stored at –21 °C, it was then thawed just before use. Urine samples were collected in a Urine Collection Cup (BD Vacutainer Systems).

Urine and serum stock solutions spiked with 20 μg mL⁻¹ of OME, OMES and HOME were prepared by diluting urine by a factor of 1:10 and diluting serum by a factor of 1:5, using 0.1 M SDS at pH 9. Solutions were prepared daily and protected from direct light. Typically, to prepare 20 μg mL⁻¹ of OME in serum, 1 mL of serum was added to a 5 mL volumetric flask, then 1 mL of 100 μg mL⁻¹ OME is added and finally the volumetric flask is filled up with SDS solution. Same procedure was followed for urine samples taking into account that the volumetric flask was 10 mL, and consequently 2 mL of 100 μg mL⁻¹ OME was added.

Biological samples from patients were injected directly into the chromatographic system after the previously commented dilution

with 0.1 M SDS at pH 9. All samples were filtered directly through 0.45 μm nylon membranes before injection (Micron Separations) into the autosampler vials.

2.4. Chromatographic conditions

Separation was performed in a reversed phase Kromasil C18 column thermostatted at 25 °C. The selected mobile phase composition was 0.08 M SDS, 10% (v/v) propanol, 0.01 M NaH_2PO_4 at pH 7. The flow rate, injection volume and UV wavelength were 1 mL min^{-1} , 20 μL and 305 nm, respectively. Under these conditions, the total analysis time for OME and its main metabolites was less than 11 min. Chromatographic signals were acquired and processed with an Agilent ChemStation (Rev. A.10.01). Michrom software was used for chromatographic data treatment [39].

2.5. Determination of OME in pharmaceutical formulations

The pharmaceutical formulations analyzed (Normon, Pensa and Ratiopharm) were enteric-coated capsules containing 20 mg omeprazole and excipients. The average weight per capsule content was calculated from 10 units. The capsule content was ground and reduced to a homogeneous fine powder in a mortar. Several portions of this powder equivalent to ca. 3 mg of omeprazole were accurately weighed and sonicated in the presence of a small amount of ethanol. A 0.1 M SDS solution at pH 9 was added to favour the extraction of the analyte, again using an ultrasonic bath. A dilution was then made with the micellar solution to a final concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The excipients in the capsules were not soluble in the micellar medium and sample solutions were filtered before their injection into the chromatograph.

3. Results and discussion

3.1. Mobile phase selection and chromatographic optimisation

The influence exerted by the pH of the stock solution preparation on omeprazole decomposition was studied at different pH values (3, 5, 7, 9 and 11) using a micellar mobile phase of 0.15 M SDS–5% propanol. It was observed that the pH-rate profile curve indicated that the maximum stability was at pH 11. Below pH 7.0, decomposition was very fast. No significant difference was found between pH 9 and pH 11. Thus, pH 9 was selected for the preparation of stock solution because omeprazole and its metabolites were quite stable. Mobile phase pH should be as similar as possible to the pH of OME solutions injected into the chromatographic system in order to avoid OME decomposition. A mobile phase pH above 7 could damage the C18 column when it is used frequently. Below this value OME will be decomposed quickly. Finally, pH 7 was selected for the mobile phase after taking into consideration analytes and column stability. It should be pointed out that the purpose of this work was not to identify the degradation products of OME but to develop a procedure for the separation and analysis of OME and its two main metabolites.

Propanol was selected as an organic modifier as it allows the complete resolution of the three compounds in an adequate analysis time. Using propanol, it was observed that the HOME peak and the protein band were well resolved. Thus, if butanol and pentanol were employed, an overlapping of the compound with the peaks of matrices could be expected.

In order to select the best analysis conditions for the simultaneous analysis of OME and its two main metabolites, each of them was injected into mobile phases containing the following SDS (M)–propanol (%) combinations: 0.05–2.5, 0.05–12.5, 0.10–7.5, 0.15–2.5 and 0.15–12.5. Retention factor (k), efficiency (N) and asymmetry factor (B/A) were measured for the three compounds

and treated with Michrom software [39]. The retention of the compounds was modelled according to [35]:

$$k = \frac{K_{AS}(1/1 + K_{AD}\varphi)}{1 + K_{AM}(1 + K_{MD}\varphi/1 + K_{AD}\varphi)[M]} \quad (1)$$

where $[M]$ and φ are the concentrations of surfactant and modifier, K_{AS} and K_{AM} correspond to the equilibria between solute in bulk water and the stationary phase or micelle, respectively; K_{AD} and K_{MD} measure the relative variation in the concentration of solute in bulk water and micelles due to the presence of modifier, as compared to a pure micellar solution (without any modifier). The optimisation of the resolution of mixtures of compounds was performed by measuring the overlapping fractions of each chromatographic peak, and the shape of the chromatographic peaks was also modelled to obtain the overlapping fractions and predict chromatograms, according to equations developed by Torres-Lapassio et al. [40].

The compounds were always fully resolved in the whole predicted space limited by the five mobile phases that were assayed. Taking into account the factor of maximum resolution and minimum analysis time, the optimum mobile phase was: 0.08 M SDS–10% propanol–0.01 M NaH_2PO_4 at pH 7 and the chromatographic parameters (k , N and B/A) obtained were: 3.5, 2400 and 1.1; 7.6, 3000 and 1.1; and 8.9, 3100 and 1.0 for HOME, OMES and OME, respectively. The total analysis time was lower than 11 min and no interferences by the protein band or endogenous compounds were observed, although a small overlapping of HOME with a metabolite or an OME decomposition product was noticed in urine solutions.

3.2. Serum and urine blank behaviour

Several serum and urine blanks were injected directly into the micellar chromatographic system after suitable dilution in order to assess the background signal. The profiles of the protein band and endogenous compounds for all the samples were similar to those shown in Fig. 2a and b. No additional peaks were found in subsequent analyses and these values are compatible with routine analysis requirements.

3.3. Method validation

The FDA guidelines were followed to validate the method.

3.3.1. Selectivity

Six drug-free serum and urine samples were selected as controls and processed directly in the chromatographic system. They were then analysed to determine the extent to which endogenous components may contribute to interfere with the retention time of the drug. No interference from endogenous compounds was found in the physiological matrices studied (Fig. 2a and b), except for a small overlapping of HOME with a possible metabolite or decomposition product.

3.3.2. Linearity

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks obtained at seven different concentrations (six replicates), in the range of 25–2000 ng mL^{-1} for OME and OMES and 10–2000 ng mL^{-1} for HOME, in three different matrices: micellar solution, serum (1:5 dilution factor) and urine-micellar solutions (1:10 dilution factor). To study the variability of the calibration parameters, curves were obtained for 5 days over a 2-month period for a different set of standards. The results in the three matrices were similar. The slopes were determined by the method of least-squares linear regression analysis and were found to be $(4.00 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ (RSD 2.0%), $(5.50 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ (RSD 1.5%) and

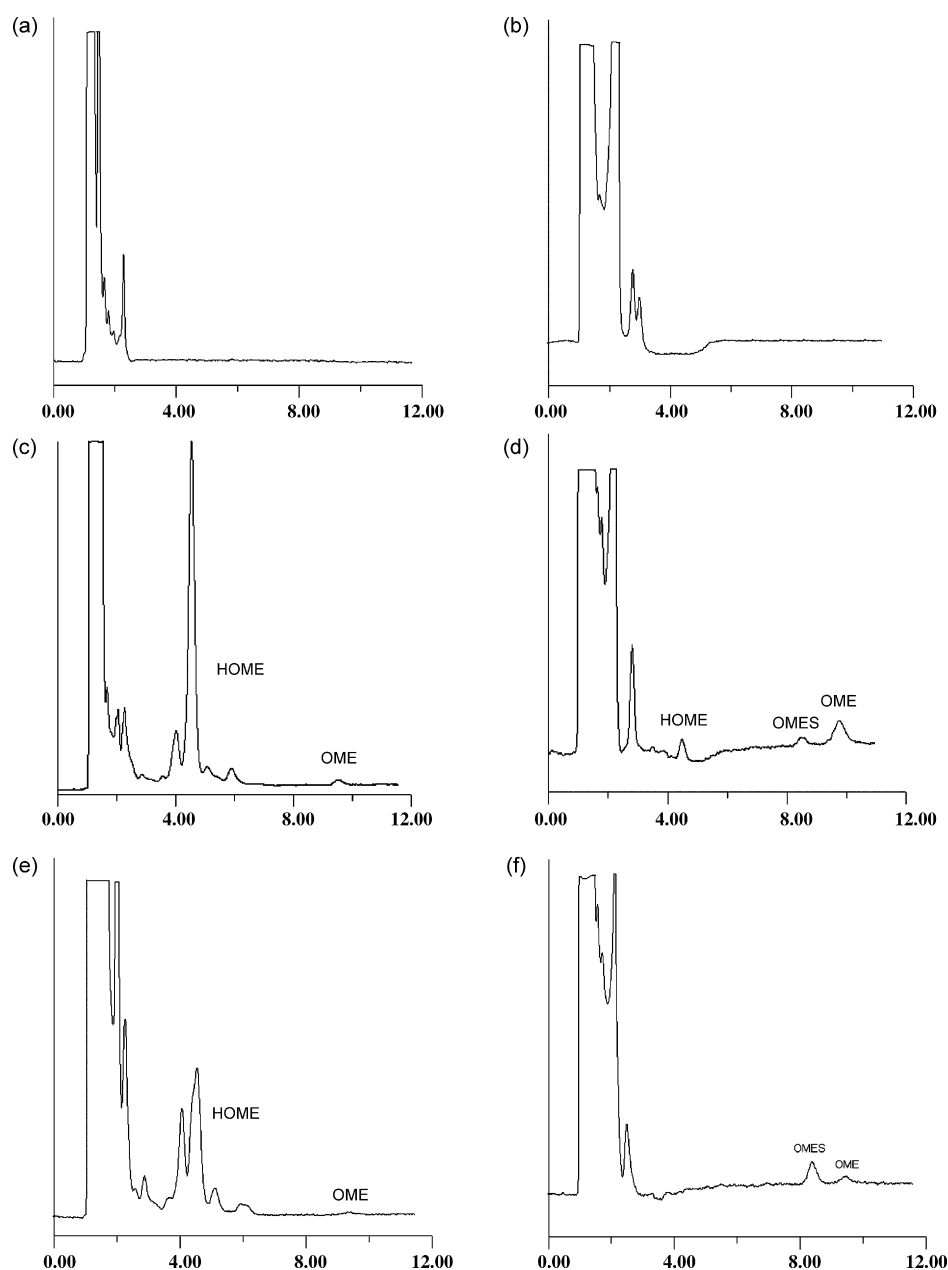


Fig. 2. Chromatograms of urine (a) and serum blanks (b), omeprazole excreted in urine at 3 h (c) and 10 h (d) after oral administration and omeprazole in serum at 2 h (e) and 6 h (f) after oral administration. Mobile phase: 0.08 M SDS–10% propanol–pH 7.

$(5.35 \pm 0.13) \times 10^{-4}$ (RSD 2.4%) for OME, OMES and HOME, respectively. Intercept was similar in all matrices, -0.0022 , and regression coefficients were $r^2 > 0.9998$.

3.3.3. Detection and quantification limits

The limit of detection (LOD) for OME, OMES and HOME in micellar, serum and urine ($n = 10$) was determined with the $3s$ criterion (three times the standard deviation of the lowest concentration solution included in the calibration divided by the slope of the calibration curve) using a series of 10 solutions containing a low concentration. The results were based on the standard deviation of the response and also on the slope of a specific calibration curve containing the analyte. The limit of quantification (LOQ) of OME, OMES and HOME in the three matrices was selected as the lowest concentration used in the calibration curve. LODs and LOQs are summarised in Table 1, according to the FDA validation guide [38].

3.3.4. Precision and accuracy

The intra- and inter-day precisions of the method were determined over a range of 10 – 2000 ng mL^{-1} for HOME and 25 – 2000

Table 1
Detection and quantification limits for OME, OMES and HOME.

Analyte	LOD (ng mL^{-1})	LOQ (ng mL^{-1})	Matrix
Omeprazole	4.62	25	SDS
	5.44	25	Urine
	5.79	25	Serum
5-Hydroxyomeprazole	1.77	10	SDS
	3.18	10	Urine
	3.34	10	Serum
Omeprazole sulphone	4.24	25	SDS
	5.4	25	Urine
	5.45	25	Serum

Table 2
Inter-day and intra-day precision and accuracy of analytes in SDS solutions.

Analyte	Concentration added (ng mL ⁻¹)	Found ^a (mean ± SD) (ng mL ⁻¹)	Accuracy (%)	Intra-day C.V. (%)	Found ^b (mean ± SD) (ng mL ⁻¹)	Accuracy (%)	Inter-day C.V. (%)
Omeprazole	25	24.4 ± 1.9	2.3	7.9	25.3 ± 0.9	1.3	3.8
	50	49 ± 3	2.3	5.3	50.5 ± 1.4	0.9	2.8
	100	98 ± 3	2.1	3.5	99.9 ± 1.5	0.1	1.5
	250	247 ± 11	1.4	4.3	248 ± 4	0.8	1.5
	500	507 ± 15	1.4	3.0	501 ± 5	0.2	1.0
	1000	993 ± 16	0.7	1.6	994 ± 6	0.6	0.6
	2000	1994 ± 14	0.3	0.7	2002 ± 6	0.09	0.3
5-Hydroxyomeprazole	10	9.8 ± 0.3	1.8	5.1	10.2 ± 0.5	2.5	4.7
	50	49.5 ± 2.5	1.0	5.0	50.8 ± 1.9	1.5	3.7
	100	100.4 ± 1.5	1.0	3.7	100.1 ± 0.9	0.1	0.9
	250	246 ± 7	1.6	3.0	248.3 ± 1.9	0.7	0.7
	500	514 ± 9	2.8	1.7	504 ± 7	0.7	1.3
	1000	986 ± 10	1.4	1.0	995 ± 9	0.5	0.9
	2000	2004 ± 110	0.2	0.6	2006 ± 3	0.3	0.1
Omeprazole Sulphone	25	25.0 ± 1.6	0.9	6.5	25.2 ± 0.9	0.7	3.7
	50	49.5 ± 2.5	1.0	5.0	50.6 ± 1.4	1.2	2.7
	100	99 ± 6	0.9	6.1	99 ± 1.1	0.7	1.2
	250	252 ± 17	0.7	6.6	250.7 ± 2.3	0.05	0.9
	500	495 ± 15	1.1	3.1	495.9 ± 0.7	0.9	0.1
	1000	1020 ± 21	2.0	2.0	1005 ± 9	0.5	0.9
	2000	1989 ± 21	0.6	1.1	1999 ± 7	0.04	0.4

^a n = 6.^b n = 5.

ng mL⁻¹ for OME and OMES, in micellar media, serum-SDS (1:5) and urine-SDS (1:10) for seven different concentrations; results were similar in all matrices. The intra-day analysis was determined by injecting these test solutions six times on the same day, while the inter-day analyses correspond to the average of five measurements of the intra-day values taken on 5 days over a 3-month period performed by different analysts and equipment at the same seven concentrations. The results, expressed as the percentage of the relative standard deviation, for intra- and inter-day values are depicted in Table 2. The data show good precision (expressed as variation coefficient in %) and accuracy (expressed as relative error) of the method with values below 8% and 3% for all three analytes, respectively. All values were good enough for routine analysis.

3.3.5. Robustness

Robustness of the method was examined by six replicate injections of standard solution at 1 µg mL⁻¹ concentration with slight changes made to the following parameters: SDS concentration, propanol (%), flow rate, and pH. Results, shown in Table 3, indicate that the slight variation in these parameters does not significantly alter the retention factor of the compounds studied (RSD < 11%). As expected, the flow rate is the parameter that modifies retention time to the greatest extent. It was possible to inject around 200 consecutive diluted biological samples without column damage and consequently without affecting the analytical performance.

3.3.6. Stability

A stability study of the three compounds was conducted between pH 3 and 11 after verifying the fast decomposition below pH 7. Furthermore, no difference in stability was observed between pH 9 and 11. Degradation of OME, OMES and HOME at pH 9, after four days of storage of SDS stock solutions, was confirmed by new peaks emerging in the chromatograms that overlapped with the peaks of the analytes. All solutions were kept at a low temperature (4 °C) until required, and were used within a week. Omeprazole solution was analysed immediately after preparation and at selected time intervals after storage over the study period. After 24 h, 48 h and 96 h, the decomposition of omeprazole was observed to be 9%, 29% and 31%. Furthermore, a decomposition of 1% of both metabolites (OMES and HOME) was observed after 48 h,

which was confirmed by a new overlapping peak emerging in the chromatogram. Similar results were observed in urine and serum matrices.

3.3.7. Analysis of the marketed pharmaceutical formulation

Calibration curves were constructed using the areas of the chromatographic peaks from triplicate injections of standards, at five increasing concentrations in the 0.5–50 µg mL⁻¹ range, with regression coefficients $r^2 > 0.9999$. No variability was observed in the calibration parameters when curves were obtained on consecutive days or on different days (data not shown). Three commercial pharmaceuticals containing OME prescribed in our country were analysed (Table 4). Ten samples of each pharmaceutical formula-

Table 3
Robustness evaluation of MLC method.

Chromatographic changes	Level	OME <i>t_R</i> (min)	OMES <i>t_R</i> (min)	HOME <i>t_R</i> (min)
(A) Flow rate (mL/min)				
0.9	-0.1	10.65	9.24	4.88
1	0	9.53	8.32	4.37
1.1	+0.1	8.60	7.52	3.95
Mean ± SD		9.6 ± 1.0	8.4 ± 0.9	4.4 ± 0.5
RSD (%)		10.6	10.3	10.7
(B) SDS concentration (M)				
0.075	-0.05	9.98	8.66	4.51
0.08	0	9.53	8.32	4.37
0.085	+0.05	9.29	7.93	4.31
Mean ± SD		9.6 ± 0.4	8.3 ± 0.4	4.39 ± 0.10
RSD (%)		3.6	4.4	2.3
(C) Percentage of propanol (v/v)				
6.9	-0.1	9.58	8.66	4.37
7	0	9.53	8.32	4.37
7.1	+0.1	9.34	7.87	4.28
Mean ± SD		9.47 ± 0.13	8.3 ± 0.4	4.34 ± 0.04
RSD (%)		1.3	4.8	1.1
(D) pH of mobile phase				
6.9	-0.1	9.56	8.36	4.38
7	0	9.53	8.32	4.37
7.1	+0.1	9.52	7.87	4.34
Mean ± SD		9.56 ± 0.06	8.2 ± 0.3	4.363 ± 0.025
RSD (%)		0.21	3.3	0.4

Table 4Recoveries of pharmaceutical formulations in SDS ($n=6$).

Pharmaceutical (laboratory)	Composition (mg) per capsule	Found (mg)	Label claim (%)	C.V. (%)
Omeprazole Ratiopharm (Ratiopharm)	Omeprazole (20), excipients	19.97	99.8	0.99
Omeprazole Normon (Normon)	Omeprazole (20), excipients	19.95	99.7	1.31
Omeprazole Pensa (Pensa Pharma)	Omeprazole (20), excipients	20.05	100.2	1.59

Table 5Recoveries in SDS solutions ($n=6$).

Analyte	Added concentration (ng mL^{-1})	Found concentration (ng mL^{-1})	Recovery (%)	C.V. (%)
Omeprazole	40	40 ± 3	97.7	5.3
	750	764 ± 8	101.8	1.0
	1500	1507 ± 14	99.7	0.7
5-Hydroxyomeprazole	40	39.3 ± 2.3	98.2	6.0
	750	732 ± 18	97.5	2.5
	1500	1516 ± 17	101.1	1.1
Omeprazole sulphone	40	40.1 ± 1.6	100.3	4.1
	750	739 ± 3	98.6	1.0
	1500	1512 ± 8	100.8	0.6

tion were analysed, triplicate injections being made in order to obtain average values of the drug concentration. Table 4 gives the declared and found contents, together with the label claim percentages, which were around 99.9%, the coefficients of variation being in the 1.0–1.6% range ($n=6$). No interferences from excipients were found and results were in agreement with the manufactures' declared contents.

3.3.8. Determination of spiked biological samples

Recoveries of omeprazole and its metabolites were determined by spiking drug-free SDS, serum (1:5 factor dilution) and urine (1:10 factor dilution) samples with solutions of 0.1 M SDS at pH 9 containing known amounts of the drug at three different concentrations (40, 750 and 1500 ng mL^{-1}). Spiked samples were processed and analysed following the procedure described above. The data obtained showed satisfactory recoveries for omeprazole and its main metabolites (97.5–101.8%) with precision (CV) better than or equal to 6% (Table 5).

3.3.9. Drug control in real samples

Pharmacokinetic studies in serum and urine samples were conducted following the oral administration of a single dose of a capsule containing 40 mg of omeprazole to healthy volunteers.

Urine samples were taken 15 times a day, and the volume was measured. Urine samples were diluted by 1:10, and the solution was injected directly into the chromatographic system without any other treatment than filtration. Fig. 3 depicts the urinary elimination curve for OME, OMES and HOME. The maximum concentration excreted in urine was found 3.5 h after oral administration, the values being $55 \mu\text{g mL}^{-1}$ for HOME and 282 and 420 ng mL^{-1} for OME and OMES, respectively. The elimination curve for HOME is easier to observe than the other two analytes and was detectable up to 12 h after oral administration. OMES and OME were detectable up to 6 and 8 h after oral administration, respectively. The final quantity of OME, OMES and HOME eliminated after 12 h was 40 ng, 30 ng and 15.7 mg, that is, 0.09, 0.07 and 39.6% of the ingested dose, respectively. Fig. 2c and d shows the chromatogram of OME, OMES and HOME excreted 3 h and 10 h after oral administration. These results show that excretion studies can be performed under the proposed chromatographic conditions.

Serum samples were taken twice a day, at 2 and 6 h after oral administration. Dilution of serum samples by 1:5 was performed, and the same procedure as that used for urine was followed. The concentrations of OME, OMES and HOME in serum were 79, 177 and 313 ng mL^{-1} 2 h after oral administration; 6 h after oral administration the values were 15 and 383 ng mL^{-1} , while HOME was not

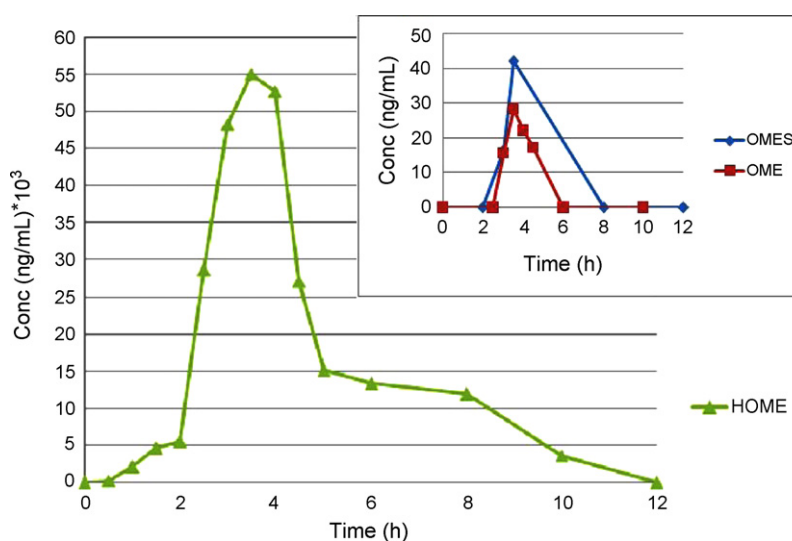


Fig. 3. Elimination curve of OME (■), OMES (◆) and HOME (▲) in urine.

detected. Fig. 2e and f depicts the chromatogram 2 h and 6 h after oral administration.

4. Conclusions

Micellar liquid chromatography is a suitable technique for the analysis of omeprazole and its two main metabolites (omeprazole sulphone and 5-hydroxyomeprazole) in physiological samples, with an analysis time below 11 min. Validation according to FDA guidelines was performed efficiently with satisfactory results in the selectivity, precision, accuracy and robustness studies. The limits of detection and quantification were good enough to monitor these compounds in physiological matrices. An advantage of this procedure is the possibility of injecting serum and urine samples directly into the chromatographic system with no previous treatment other than filtration, thus avoiding tedious extraction from matrices. This procedure also allows pharmacokinetic studies to be conducted. Pharmaceutical formulations containing OME were analysed and good claim percentages (around 100%) were obtained. The results show that the procedure is sensitive enough for routine analyses of the drug in both biological and pharmaceutical applications. This method meets the requirements of the concept of “green chemistry” concept by using environment-friendly reagents (non-flammable, non-toxic) and is relatively inexpensive compared to other methods, thus making it more attractive in many situations.

Acknowledgements

This work was supported by projects P1-1B2006-12 and CTQ2007-64473/BQU funded by Foundation Caixa Castelló-Bancaixa-Universitat Jaume I and the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). Maria Rambla-Alegre also wishes to thank the MEC for the FPU grant. The author also thank Dr. Kjell Andersson from AstraZeneca.

References

- [1] American Hospital Formulary Service, Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, 1988.
- [2] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London (UK), 2004.
- [3] B. Person, S. Wendsjo, *J. Chromatogr.* 32 (1985) 375.
- [4] G.W. Sluggett, J.D. Stong, J.H. Adams, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 357.
- [5] A. Tivesten, S. Folestad, V. Schonbacher, K. Svensson, *Chromatographia* 49 (1999) S7.
- [6] C. Sastry, Y. Naidu, S. Murty, *Talanta* 44 (1997) 1211.
- [7] S. McClean, E. O'Kane, V.N. Ramachandran, W.F. Smyth, *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 81.
- [8] S. Pinzauti, P. Gratteri, S. Furlanetto, P. Mura, E. Dreassi, R. Phan-Tan-Luu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 881.
- [9] F.C. Cheng, Y.F. Ho, L.C. Hung, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 35.
- [10] K.H. Yuen, W.P. Choy, H.Y. Tan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 715.
- [11] M.C. Dubuc, C. Hamel, M.S. Caubet, J.L. Brazier, *J. Liq. Chromatogr.* 24 (2001) 1161.
- [12] G. García-Encina, R. Farrán, S. Puig, L. Martínez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 371.
- [13] K. Hay Yuen, W. Peng Choy, H. Yin Tan, J. Woei Wong, S. Ping Yap, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 715.
- [14] J. Macek, J. Klíma, P. Ptáček, *J. Chromatogr. B* 852 (2001) 282.
- [15] H.M. González, E.M. Romero, T. de, J. Chavez, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 459.
- [16] E.J. Woolf, B.K. Matuszewski, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 229.
- [17] H. Kanazawa, A. Okada, Y. Matsushima, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 1.
- [18] A. Tolonen, M. Turpeinen, J. Uusitalo, O. Pelkonen, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (2005) 155.
- [19] H.M. Gonzalez, E.M. Romero, J. Chavez Tde, A.A. Peregrin, V. Quezada, C. Hoyo Vadiello, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 459.
- [20] M. Shimizu, T. Uno, T. Nijoka, N. Yau-Furukori, T. Takahata, K. Sugawara, T. Tateishi, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 241.
- [21] N.L. Rezk, K.C. Brown, A.D.M. Kashuba, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 314.
- [22] R. Linden, A. Luiza Ziulkoski, M. Wingert, P. Tonello, A.A. Souto, *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2007) 733.
- [23] U. Hofmann, M. Schawab, G. Treiber, U. Klotz, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 85.
- [24] Q.B. Cass, V.V. Lima, R.V. Oliveira, N.M. Cassiano, A.L. Degani, J. Pedrazzoli, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 275.
- [25] R. Mathias Orlando, P. Sueli Bonato, *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 227.
- [26] J. Martens-Lobenhoffer, I. Reiche, U. Tröger, K. Mönkemüller, P. Malfrather, S.M. Bode-Böger, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 301.
- [27] R. Cirilli, R. Ferretti, B. Gallinella, E. De Santis, L. Zanitti, F. La Torre, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 105.
- [28] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, C. Alonso, J.J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 118.
- [29] D. Castro, M.A. Moreno, S. Torrado, J.L. Lastres, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 291.
- [30] A.M. Qaisi, M.F. Tutunji, L.F. Tutunji, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 384.
- [31] A. Riedel, C.S. Leopold, *Pharmazie* 60 (2005) 126.
- [32] A. Riedel, C.S. Leopold, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 151.
- [33] M. Mathew, V. Das Gupta, R.E. Bailey, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 965.
- [34] M. Espinosa-Bosch, A.J. Ruiz-Sánchez, F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 831.
- [35] A. Berthod, M.C. García-Alvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, Marcel-Dekker, New York, 2000.
- [36] S. Carda-Broch, M.T. Gil-Agustí, L.I. Monferrer-Pons, J.S. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 254.
- [37] J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, M. Gil-Agustí, M.E. Capella-Peiró, D. Bose, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 75.
- [38] U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration, *Guidance for Ind. Bioanal. Method Validation*, 2001 (www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf).
- [39] J.R. Torres-Lapasió, *Michrom Software*, Marcel-Dekker, New York, USA, 2000.
- [40] J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.