

DETERMINACIÓN DE AIVLOSIN EN PIENSOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

A. Escobar*, María Antonia Abeledo**, E. Vega** y V. Cedeño*

Departamentos Química-Farmacología y Clínica**, Centro Nacional Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: escobar@censa.edu.cu*

RESUMEN: Un procedimiento se desarrolló por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar Aivlosin en alimentos destinados a diferentes categorías productivas de la crianza del cerdo. La extracción del analito se realizó con acetonitrilo y se concentró cinco veces cuando fue inferior a 20 ppm. El extracto se analizó por HPLC con una columna de fase reversa C18, un detector UV (280 nm) y una mezcla de acetonitrilo: acetato de amonio 0.15M: ácido acético en una proporción de 45:45:10 v/v, como fase móvil. Los resultados de la validación mostraron una linealidad entre 5-80 µg/ml, que responde a una ecuación general de $Y = -2.60 + 1.72X$ con un coeficiente de regresión de 0.999 ($p < 0.05$) y una variación del intervalo de confianza de la pendiente entre 1.57-1.87. El límite de detección y de cuantificación fue de 4 µg/g y 12 µg/g respectivamente, cuando se concentró la muestra cinco veces; mientras la muestra aplicada directamente presentó un límite de detección de 42 µg/g. La recuperación promedio expresada en porcentaje fue de 63 ± 7.3 y 99 ± 6.5 cuando se concentró y se aplicó de forma directa respectivamente. La precisión del método se midió por el coeficiente de variación en ambos procedimientos, el cual fue inferior al 15%. Todas las muestras analizadas cumplieron con la especificación de calidad que brinda el fabricante.

(Palabras clave: Aivlosin; HPLC; piensos)

DETERMINATION OF AIVLOSIN IN FEEDSTUFFS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

ABSTRACT: A procedure was developed by high performance liquid chromatography (HPLC) in order to determine Aivlosin in feedstuffs with destination to different productive categories of pigs. Aivlosin was extracted with acetonitrile and concentrated five times when the concentration was inferior to 20 ppm. The extract was analyzed by HPLC using a reverse phase column C18 with UV detection (280 nm) and acetonitrile: ammonium acetate 0.15M: acetic acid (45:45:10v/v/v) as eluent. The validation results showed a linearity between 5-80 µg/ml with a general equation of $Y = 2.60 + 1.72X$, where the regression coefficient was 0.999 ($p < 0.05$) with a variation of the confidence interval of the slope between 1.57-1.87. Limits of detection and quantification were 4 and 12 µg/g respectively when the sample was concentrated five times. While the sample applied directly presented a limit of detection of 42 µg/g. Average recovery of Aivlosin was 63 ± 7.3 and $99 \pm 6.5\%$ when the sample was directly applied and concentrated. The precision of the method measured through the variation coefficient in both procedures was inferior to 15%. All the samples analyzed fulfilled the quality specification offered by the producer.

(Key words: Aivlosin; HPLC; feedstuffs)

INTRODUCCIÓN

El Aivlosin, es un antibiótico de la familia de los macrólidos y se emplea para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas en el cerdo y las aves, causadas por bacterias gram positivas, al-

gunas gram negativas y micoplasmas (14). En el caso específico de microorganismos aislados del cerdo, el Aivlosin mostró ser efectivo para: *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *Serpulina (treponema) hyodysenteriae* (7); mientras en aves fue efectivo a *M. synoviae* y *M. gallisepticum* (1).

El Aivlosin se conoce químicamente como tartrato de 3-o-acetil 4-o isovalerilo de tilosina (tartrato de acetilo de isovalerilo de tilosina), es soluble en agua y en solventes orgánicos, se presenta en forma de polvo blanco, no es tóxico y su dosis letal (DL50) en ratones y ratas es de >750 y >3000 mg/kg respectivamente (5).

En el tratamiento preventivo y terapéutico de la neumonía en el cerdo se emplean diferentes concentraciones del antibiótico Aivlosin en el alimento, que oscila entre 20 y 50 ppm (5). No existe un procedimiento oficial de una descripción de como determinar este antibiótico en el pienso, para controlar las concentraciones establecidas según su indicación.

El desarrollo de todo método lleva implícito una validación del mismo, con la finalidad de asegurar la exactitud y confiabilidad de los resultados analíticos. En dependencia de su finalidad se determinarán diferentes indicadores de validación. Los más generales son: linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud, especificidad y precisión (16).

Fue objetivo de este trabajo definir las características funcionales para la determinación de Aivlosin en piensos y evaluar distintos lotes del alimento formulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las muestras: Se trabajó con muestras de piensos, procedentes de la fábrica CENPALAB, formuladas con AIVLOSIN FG-10 y otras sin formular para las categorías de inicio y de ceba durante el período 2003-2004.

Reactivos: Todos los reactivos empleados son de la firma comercial FLUKA. y MERCK. El patrón comercial de Aivlosin fue suministrado por ECO Animal Health Ltd (No AS-141).

Equipamiento: Se empleó un cromatógrafo líquido de la firma comercial Knauer con detector UV 280 nm en un rango de 0.0025 y una columna de fase reversa (Kromasil 100C18 5µm 15x0,4 cm). Como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo: acetato de amonio 0.15M: ácido acético en una proporción de 45:45:10 v/v/v, el flujo fue 1 ml/min y se le aplicó 10 µl de la muestra previamente filtrada por 0,45µm. Los cromatogramas se registraron con la interfase TIC-8EA y se procesaron por el software BIOCROM.

Extracción: Se pesaron 12.5±0.1g en balanza técnica y se adicionaron 55 mL de acetonitrilo. Seguidamente se agitó en una zaranda, la que se obtuvo de

la firma comercial (CAT) a 800 revoluciones/min durante 120 minutos. Posteriormente la solución se destiló a través de un papel de filtro whatman 3 y la muestra se conservó a -20 °C. Para el análisis por HPLC se extrajo 10 mL de la muestra, que se concentró en un rotoevaporador IKA (falta algo aquí) hasta sequedad y se resuspendió en 2mL de acetonitrilo. En el caso de la premezcla se procedió de la misma forma, solo que el extracto no se concentró y se analizó directamente.

Para el establecimiento del procedimiento se evaluaron los indicadores de: linealidad de la curva de calibración, límite de detección y de cuantificación, exactitud y precisión. A continuación se explican cada uno:

Linealidad: Se procesaron cuatro concentraciones en un rango de 5-80 µg/ml del patrón de referencia por triplicado para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación entre el área y la concentración del analito, Para la determinación del límite de detección y cuantificación se procesaron curvas en el rango normal de la determinación (5-80µg/mL) y en una cercana al límite de detección (5, 8, 10 y 12µg/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de LD y LC y se consideraron tres y diez desviaciones estándar del blanco para (n) medidas individuales. (ecuaciones 1 y 2).

$$\text{Límite de detección} = (Y_{bl} + 3 S_{bl})/b \quad (1)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = (Y_{bl} + 10 S_{bl})/b \quad (2)$$

Donde:

Y_{bl}: es un estimado de la respuesta del blanco

S_{bl}: es un estimado de la desviación estándar del blanco.

b: es la pendiente

Exactitud: Se organizaron tres niveles de concentración: 50, 100 y 200 µg/g para el análisis de la premezcla y en muestras de piensos se prepararon los niveles de 6, 100 y 200 µg/g.

Especificidad: Se preparó una concentración de 1 mg/mL en acetonitrilo del patrón de referencia y se expuso a luz solar de forma indirecta durante 24 horas a temperatura ambiente (27 ± 2°C y humedad relativa de 80%). Se comparó con un patrón fresco y conservado a -20°C.

Precisión: Se procesaron quince réplicas de una misma muestra en condiciones óptimas (equipo, analista y lotes de reactivos idéntico) realizando su análisis en el mismo día. Se determinó la desviación estándar (Sr) y el rango crítico (RC) mediante la ecuación (3 y 4).

$$S_r = \sqrt{1/t(n-1) \sum_{J=1}^t \sum_{K=1}^n (y_k - Y)^2} \quad (3)$$

Donde:

t= número de niveles

n= número de réplicas por niveles

y_k = es el valor medido en el ensayo

Y= es el estimador de la media poblacional

$$RC(n) = f(n) \times S_r \quad (4)$$

Donde:

f(n) es el factor de rango crítico para una n determinada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la farmacopea se proponen diferentes esquemas de validación que se corresponden con la meta que se persigue. En el caso que nos ocupa la determinación de Aivlosin en pienso podría clasificarse en la categoría I o II (16). Nosotros preferimos clasificarla en la categoría II, ya que las concentraciones que evaluaríamos están en el orden de los 20 y 50 ppm y porque se debiera estudiar el perfil de degradación del producto en el tiempo como parte de los estudios de estabilidad de la premezcla y el producto final formulado.

Análisis de la Linealidad, límite de detección y cuantificación.

En la Figura 1 se muestra la curva de calibración del patrón de Aivlosin disuelta en acetonitrilo desde 5 hasta 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostrando un coeficiente de regresión (r) y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.999 y 0.997 respectivamente. La recta de mejor ajuste es $Y = 2.60 + 1.72X$. Por otra parte, los resultados de la curva muestran que la correlación fue significativa para una $p < 0.05$. El coeficiente de variación de la pendiente fue de 3.17 y el intervalo de confianza de la pendiente varió entre 1.57-1.87.

Los límites de detección y cuantificación mostraron valores de 5 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. A partir de estos resultados cuando se concentra el extracto cinco veces podemos detectar valores de 4 μg de aivlosin/g y cuantificar a partir de los 12 μg de aivlosin/g en piensos formulados con este antibiótico, donde la concentración terapéutica puede oscilar entre 20 y 100 ppm, en dependencia del tratamiento (5). En el caso que la muestra se analice directamente los límites de detección y cuantificación son 42 y 125 μg de Aivlosin/g respectivamente, estos valores permiten corroborar las concentraciones de la premezcla que puede variar entre 10-50 mg/g (5).

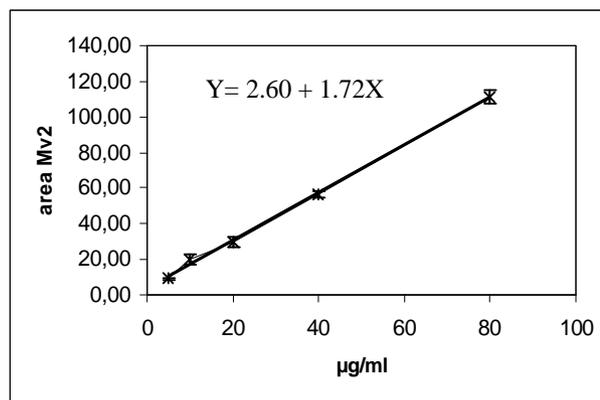


FIGURA 1. Curva de calibración del Aivlosin disuelta en acetonitrilo./ *Aivlosin calibration curve dissolved in acetonitrile.*

En la Tabla 1 se observa que el recobrado del Aivlosin en muestras contaminadas artificialmente fue menor cuando la muestra se concentró y se reconstituyó por filtro de milipore de 0.5 μm . El bajo recobrado está dado en el momento de reconstituir la muestra, por lo que se recomienda una vez adicionados los dos mililitros de acetonitrilo (sonicar) en un baño de ultrasonido durante 10 minutos para que se garantice una completa disolución del analito.

TABLA 1. Recobrado de muestras contaminadas artificialmente con Aivlosin empleando diferentes procedimientos de preparación de la muestra./ *Recover of the samples articially contaminated with Aivlosin using different aimple preparation procedures*

Procedimiento	Valor teórico Conc $\mu\text{g}/\text{g}$	Conc $\mu\text{g}/\text{g}$	Recobrado %
Sin concentrar	50	53,24±9,64	106,49±19,28
	100	95,;59±19,48	95,59±19,48
	200	189,74±22,06	94,87±11,03
		Media ±DS	98,98±6,51
Concentrado	6	4.26±0.14	71.0±2.36
	100	57.33±9.33	57,33±9,33
	200	120±7.03	60,00±3,54
		Media ±DS	62,78±7,25

A partir de los resultados anteriores se propone aplicar directamente la muestra sin concentrar cuando la concentración es igual o superior a 20 $\mu\text{g}/\text{g}$. En el caso que la aglutinación sea menor de 20 $\mu\text{g}/\text{g}$, el extracto de la muestra se concentra cinco veces para su análisis.

El Aivlosin, es un compuesto de nueva generación, específico para el tratamiento micoplasmosis en aves y cerdos y se han reportado poco resultados sobre su estabilidad; sin embargo, otros antibióticos de la misma familia cuando se modifica el pH de la solución o en dependencia del tipo de solvente se descomponen (9, 10, 11 y 12). En el caso específico del Aivlosin se observó que cuando este se disuelve en acetonitrilo y se mantiene a temperatura ambiente por un tiempo de 24 horas se degrada formando un nuevo pico (Figura 2), lo que nos demuestra que estos análisis de Aivlosin deben realizarse en el día o de lo contrario guardar las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que hemos observado que las mismas se conservan hasta 30 días a esta temperatura. Por otra parte, las condiciones ensayadas logran identificar con una alta especificidad el principio activo de su metabolito degradado, lo que se observa en los tiempos de retención de cada uno de los compuestos, no interfiriendo en la cuantificación del Aivlosin.

El Tilosin un antibiótico de la misma familia que el Aivlosin se degrada a pH menores que cuatro y forma la desmicosina (9). En otros estudios se reportan las formaciones de aldor de Tilosin A y un isotilosin en condiciones alcalinas, expuestos a la luz respectivamente (12). En nuestro caso, la degradación del producto puede deberse a la exposición de la luz y no a cambios de pH, ya que la solución presenta un valor mayor de cuatro y menor que 7. Se necesita profundizar en estos y otros aspectos para definir la causa principal de la degradación del producto, así como identificar el metabolito que se forma. Se ha informado que el Aivlosin se metaboliza rápidamente formando el 3-acetiltilosin (3-AT) y este último presenta una actividad microbiológica equivalente al producto nativo (5).

Los resultados del estudio de precisión en condiciones óptimas se observan en la Tabla 2 cuando se aplica directamente la muestra o se concentra. Los recobrados que se obtuvieron en el estudio son similares a los obtenidos durante el ensayo de exactitud. Por otra parte, el coeficiente de variación fue inferior o igual al 15% acorde a lo planteado cuando se analizan muestras con concentraciones mayores o igual a $110\text{ }\mu\text{g/kg}$ (3).

Un análisis integral de las características funcionales del método presentado (linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud, especificidad y precisión) nos permite proponer el mismo para el control de calidad del concentrado medicamentado con Aivlosin). Sin embargo, no podemos decir que el procedimiento está validado totalmente, ya que un requisito indispensable es el desarrollo de estudios interlaboratorios según los requerimientos de la AOAC o la IUPAC (6,15) y porque para el estudio de especificidad realizado es necesario identificar el metabolito degradado. No existen publicaciones en revistas referenciadas en lo que respecta a la validación de Aivlosin en alimentos, no ocurre así para otros antibióticos de la misma familia, tales como Tilosin, Espiramicina; Eritromicina y Tilmicosina (2, 4, 8, 13).

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de Aivlosin en diferente lotes, que fueron medicamentados con Aivlosin FG10 y Aivlosin F50 para diferentes tratamientos destinados a la porcicultura.

Los resultados anteriores nos muestran una alta coincidencia entre el valor práctico obtenido de los lotes producidos, con respecto a la especificación que aparece en la etiqueta, lo cual avala las Buenas

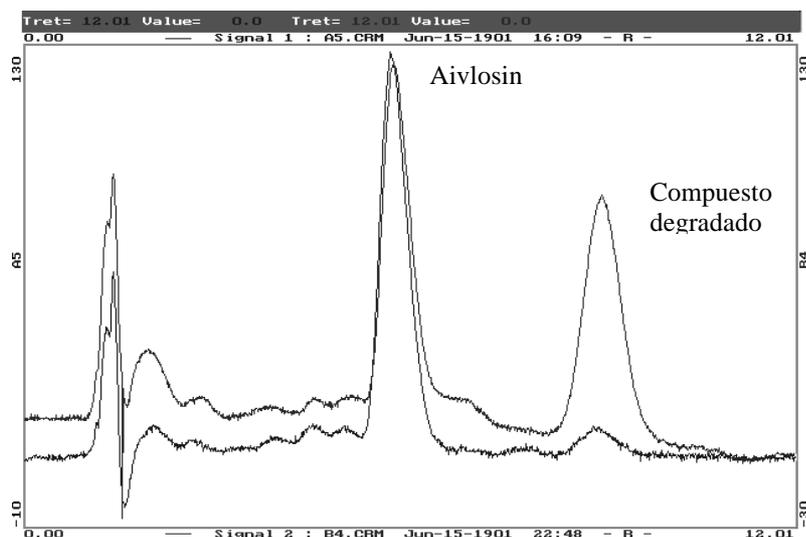


FIGURA 2. Perfil cromatográfico de Aivlosin en acetonitrilo obtenido por HPLC./ *Aivlosin chromatographic profile in acetonitrile obtained by HPLC.*

TABLA 2. Resumen del estudio de precisión en condiciones óptimas en dependencia del tratamiento./ *Summary of the precision study in optimal conditions depending on the treatment*

Tipo de muestra (aplicación)	Media \pm DS	RSD%	Rango crítico n=2	Recobrado(%) Media \pm DS
Premezcla (directa)	65.87 \pm 3.93 μ g/ml	5.97	11.0	131.7 \pm 7.9
Muestra (directa)	23.33 \pm 3.61 μ g/g	15.5	10.1	116.0 \pm 18.1
Muestra (conc.)	14.72 \pm 2.00 μ g/g	13.6	5.6	73.6 \pm 10.0

TABLA 3. Resultados de los lotes de piensos medicados con Aivlosin./ *Results of feedtuff batches medicated with Aivlosin*

Tipo de pienso	Identificación	Especificación μ g/g	Media μ g/g	DS	CV	Coincidencia %
Crecimiento	M1-04	20	29,38	7,59	25,85	146,9
Crecimiento	M2-04	0	0,00	0,00	0,00	100,0
Inicio	M3-04	50	49,49	3,65	7,37	99,0
Ceba	M4-04	20	26,15	0,57	2,16	130,7
Ceba	M6-04	0	0,00	0,00	0,00	100,0
Inicio	M5-04	50	56,60	4,24	7,49	113,2
Ceba	M7-04	0	0,00	0,00	0,00	100,0
Ceba	M8-04	20	12,57	1,07	8,47	62,9
Ceba	M9-04	0	< LD	0,00	0,00	100,0
Ceba	M10-04	0	< LD	0,15	1,97	100,0
Ceba	M11-04	0	< LD	0,00	0,00	100,0
Ceba	M12-04	20	21,96	1,41	6,43	109,8
Ceba	M13-04	20	20,35	1,46	7,19	101,7
Inicio	M14-04	50	59,93	2,35	3,92	119,9
Ceba	M15-04	20	22,76	5,33	23,43	113,8

Prácticas de Producción (BPP) de la empresa donde se realiza la formulación de alimentos medicamentados con destino a las diferentes categorías de producción en la porcicultura.

REFERENCIAS

1. Cerda, R.O.; Giacoboni, G.I.; Xavier, J.A.; Sansalone, P.L. y Landoni, M.F. (2002): In vitro antibiotic susceptibility of field isolates of *Mycoplasma synoviae* in Argentina. *Avian Dis.* 46(1): 215-8.
2. Civitareale, C.; Fiori, M.; Ballerini, A. y Brambilla, G. (2004): Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level. *Pharm. Biomed. Anal.* 36(2): 317-25.
3. CODEX (1993): Característica de los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Apéndice VIII parte III pag79-86.
4. Dehouck, P.; Vander Heyden, Y.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D.L.; Marini, R.D.; Chiap, P.; Hubert, P.; Crommen, J.; Van de Wauw, W.; De Beer, J.; Cox, R.; Mathieu, G.; Reepmeyer, J.C.; Voigt, B.; Estevenon, O.; Nicolas, A.; Van Schepdael, A.; Adams, E. y Hoogmartens, J. (2003): Interlaboratory study of a liquid chromatography method for erythromycin: determination of uncertainty. *J. Chromatogr A.* 1010(1): 63-74.
5. ECO (2005): Aivlosin en cerdos y aves www.ecoanimalhealth.com www.aivlosin.com. Consultado 2005.

6. FAO (1998): Validation of analytical method for food control. *FAO Food and Nutrition Paper*. 68.
7. Hogg, A. (1996): Mycoplasma pneumonia and other Mycoplasma diseases of swine. <http://iann/www.unl.edu/pubs/animadisease/g364.html>.
8. Houglum, J.E. y Tasler, M.K. (1996): Liquid chromatographic assay of tylosin in animal feeds. *J. AOAC Int.* 79(2): 369-374.
9. Index Merck (1983) (Tenth edition) Tylosin 9631.
10. Loke, M.L.; Ingerslev, F.; Halling-Sorensen, B.; Tjornelund, J. (2000): Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*. 40(7): 759-765.
11. Paesen, J.; Cypers, W.; Pauwels, K.; Roets, E.; Hoogmartens, J. (1995): J Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9: 1153-1159.
12. Paesen, J.; Cypers, W.; Busson, R.; Roets, E.; Hoogmartens, J. (1995): Isolation of decomposition products of tylosin using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 699 (1-2): 99-106.
13. Readnour, R.S.; Helton-Groce, S.L.; Dixon, S.S. (1997): Determination of tilmicosin in swine feeds by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 80(6): 1161-70.
14. Sanders, M.J. (2004): Treatment and prophylaxis of diseases and infections of pigs and poultry with aivlosin. Patent number: CN1469742 Classification: international: A61K31/351; A61P31/04.
15. Thompson, M.; Ellison, S.L.R. y Wood, R. (2002): Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74: 835-855.
16. USP XXIII –NF18 (1995): Validation of compendial methods. En United States Pharmacopeial Convention inc. Cap. 1225 pg. 1982-1984.

(Recibido 10-12-2006; Aceptado 15-9-2007)

CENSA
CENTRO NACIONAL
DE SANIDAD AGROPECUARIA

Su solicitud...
Dr.C. Jesús Rodríguez Diego
E.mail: jesus@censa.edu.cu

Maestrias en:

- Reproducción Animal ■
- Microbiología Veterinaria ■

Doctorados en:

- Farmacología Veterinaria ■
- Toxicología Veterinaria ■
- Epizootiología ■
- Reproducción Bovina ■
- Patología Veterinaria ■
- Virología Veterinaria ■
- Inmunología Veterinaria ■
- Bacteriología Veterinaria ■
- Parasitología Veterinaria ■
- Producción y Calidad de la leche ■