

DETERMINACIÓN DE CLORTETRACICLINA EN PIENSO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

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

Dirección de Salud y Producción Animal, Centro Nacional Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: escobar@censa.edu.cu

RESUMEN: Se desarrolló un procedimiento por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar clortetraciclina en alimentos destinados a diferentes categorías productivas de la crianza del cerdo. La extracción del analito se realizó con una solución de acetona ácida. El extracto se analizó por HPLC con una columna de fase reversa C18 y un detector UV (340 nm) con una mezcla de dimetilformamida al 27% como fase móvil. Los resultados de la validación mostraron una linealidad entre 50-1000 µg/mL que responde a una ecuación general de $Y=0.23X-2.62$ con un coeficiente de regresión de 0.996 ($p<0.05$) y una variación del intervalo de confianza de la pendiente entre 0.23-0.24. El límite de detección y el de cuantificación fue de 33µg/g y 50 µg/g respectivamente. La recuperación promedio expresada en porcentaje fue de 90.2 ± 7 . La precisión del método en ambos procedimientos fue inferior al 15%. Todas las muestras analizadas entre 300-450 µg/g cumplieron con la especificación de calidad que brinda el fabricante, no así la concentración de 150 µg/g que muestran valores entre 66-123 ug/g para un $66\pm 14\%$ con respecto al valor real.

(Palabras clave: clortetraciclina; HPLC; pienso)

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

ABSTRACT: A procedure was developed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in order to determine chlortetracycline in feedstuff destined to different productive categories of pigs' breeding. Chlortetracycline was extracted with acid acetone solution. The extract was analyzed by HPLC using a reverse phase column C18 with UV detection (340 nm) and dimethylformamide to 27% as eluent. The validation results showed a linearity between 50-1000 µg/mL with a general equation of $Y= 0.23X - 2.62$, where the regression coefficient was 0.996 ($p < 0.05$) with a variation of the interval of trust of the slope between 0.23-0.24. Limits of detection and quantification were 33.and 50 µg/g respectively. Average recovery of chlortetracycline was $90.2\pm 7.0\%$. The precision of the method in both procedures was inferior to 15%. All the samples analyzed between 300-450 µg/g fulfilled the quality specification offered by the producer, while the samples with 150 ug/g did not complete their specification showing values among 66-123 ug/g.

(Key words: chlortetracycline; HPLC; feedstuff)

INTRODUCCIÓN

La Neumonía Enzootica Porcina (NEP), es una de las enfermedades más comunes que afectan a los cerdos en todo el mundo, principalmente donde existe producción intensiva. Se caracteriza por ser una enfermedad infecciosa, cuyo agente etiológico es el

Mycoplasma hyopneumoniae, que afecta principalmente a los porcinos jóvenes al predisponerlo a infecciones bacterianas secundarias. (2).

La terapia antibiótica es una estrategia importante debido a su eficacia y bajo costo. La familia de las tetraciclinas (clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina

(OTC) y tetraciclina (TC)) es a menudo utilizado para controlar o tratar la NEP conjuntamente con otros antibióticos del grupo de los macrólidos (1, 12,13). La clortetraciclina es uno de lo más empleados.

La clortetraciclina es un antibiótico de amplio espectro y responde a una estructura general de cuatro anillos en el núcleo hidronaftaceno (son derivados análogos de la naftaceno-carboxaneda policíclica) y presenta un carácter anfotérico (11).

El empleo de pienso medicado es una práctica común en Veterinaria y está regulado por el Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Control y la Utilización de los Medicamentos Veterinarios (4) y por el Código de Práctica sobre Buena Alimentación Animal (3). Un requerimiento importante para garantizar la eficacia del producto es que la concentración del antibiótico se encuentre de forma homogénea en el pienso y en las concentraciones establecidas según su indicación.

Para el control de piensos medicados se han desarrollado procedimientos cromatográficos y microbiológicos (8; 9); los cuales han sido validados y establecidos como métodos oficiales en la AOAC (Method 957.23B (cromatográfico) y Method 967.39 (microbiológico)) (7). Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias y por comisiones de Farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos, la implementación de cualquier método oficial en un laboratorio deben verificar sus características funcionales o el caso de un nuevo método se debe realizar su validación completa. Es objetivo del presente trabajo validar una metodología analítica para la determinación de clortetraciclina en pienso medicado para el consumo animal y su posterior aplicación en la determinación de clortetraciclina en muestras comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las muestras: Se trabajó con muestras de piensos comerciales formulado con CLORTER FG-150 y muestras sin formular para las categorías de inicio y de ceba durante el período 2003-2004.

Reactivos: Todos los reactivos empleados fueron de calidad puro para análisis proveniente de las firma comerciales FLUKA. y MERCK. Los patrones de referencia de clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina fueron suministrados por la casa comercial SIGMA y la premezcla de CHLORTET FG 150 fue suministrado por la firma ECO Animal Health Ltd

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 dimetilformamida y fase acuosa (EDTA 0.33 g, nitrato de potasio 10.1g, ácido oxálico 12.6g y citrato de sodio 3.8g, agua cs 2L) en una proporción de 27:73 v/v, el flujo fue 1.5 mL/min y se aplicaron 20 µL de la muestra previamente filtrada por 0,45µm. Los cromatogramas fueron registrados usando una interfase TIC-8EA y procesados con el software BIO Crom.

Extracción: Se pesaron 5.0±0.1g del pienso en balanza técnica y se adicionaron 10 mL de una mezcla de acetona agua, ácido clorhídrico 5M (64:30:6 v/v) y se agitó en una zaranda a 800 revoluciones/min durante 60 minutos. El extracto se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, seguidamente se decantó la solución a través de un papel de filtro whatman 3 o equivalente y la muestra filtrada se conservó a -20°C hasta su análisis.

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 menciona cada uno:

Linealidad: Se procesaron cuatro concentraciones en un rango de 62.5-1000 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 (62.5-1000 µg/mL) y en una cercana al límite de detección (50, 100y 200µg/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de LD y LC y se consideró tres y diez desviaciones estándar del blanco para (n) medidas individuales. (ecuaciones 1 y 2)

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

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

La sensibilidad de calibración corresponde con la pendiente de la curva de calibración y la sensibilidad analítica es el cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Exactitud: Se prepararon tres niveles de concentración de clortetraciclina por triplicado (250, 500 y 1000 µg/g) en muestra de pienso que no han sido medicada y se determinó el recobrado por comparación de las cantidades teóricas con los valores determinados.

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

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

Donde: t= número de niveles
n= número de replicas por niveles

$$RC(n) = f(n) \times Sr \dots\dots\dots(3)$$

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de las características funcionales del procedimiento para la determinación de clortetraciclina

La recta de mejor ajuste de la curva de calibración del patrón de clortetraciclina disuelta en la fase móvil fue $Y=0.23X - 2.62$ (Figura 1), mostrando un coeficiente de regresión (r) y un coeficiente de correlación (r2) de 0.9996 de 0.9993 respectivamente. La linealidad de la curva fue corroborada, cuando se aplicó la prueba estadística de t (t de Student) según plantea Quattrocchi *et al.* (10) y se rechazó la hipótesis nula (es la no correlación entre X y Y) siendo la correlación lineal significativa con una $p < 0.05$. El coeficiente de variación de la pendiente fue de 0.57 y su intervalo de confianza varía entre 0.23-0.24, estos resultados también confirman la linealidad del ensayo cuando se obtiene valores de coeficiente de variación de la pendiente menor que el 5% (10).

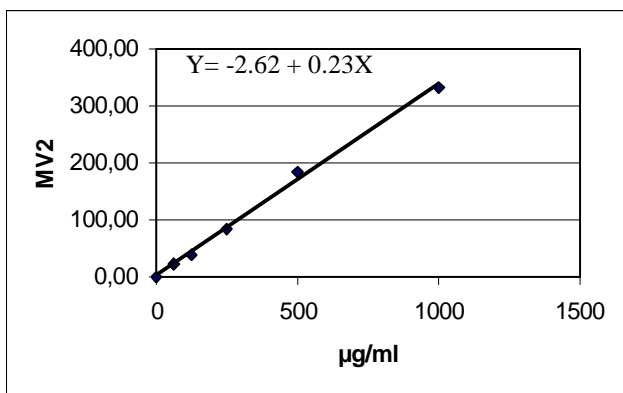


FIGURA 1. Curva de calibración de clortetraciclina disuelta en fase móvil./ *Dissolved chlortetracycline calibration curve in mobile phase.*

Los límites de detección y cuantificación mostraron valores de 33.13 y 49.69 µg/g respectivamente. Los niveles de clortetraciclina empleado en el alimento oscilan entre 200-450 µg/g, en dependencia de la categoría a la que se destina (6). Las concentraciones antes mencionadas caen dentro de la curva y puede ser detectada en la muestra directa sin tratamiento previo, lo que garantiza un recobrado mayor. La sensibilidad de calibración fue de 0.23 µg/mL y la sensibilidad analítica (50%) fue de 0.057 µg/mL.

Un recobrado medio de clortetraciclina de 90.2±7% para los tres niveles ensayados (Tabla 1) se considera adecuado para el método propuesto ya que un intervalo de variación aceptable para el rango estudiado oscila entre un 80-110% (5). Valores de recuperación del analito por encima del 95% se obtienen cuando se emplea el mismo sistema de extracción (acetona en condiciones ácidas) para analizar alimentos medicados (7).

TABLA 1. Recobrado de muestras contaminadas artificialmente con clortetraciclina./ *Recovered of samples artificially contaminated with chlortetracycline*

Valor teórico Conc µg/g	Valor Práctico Conc µg/g	Recobrado %
1000	909.5±38.9	90.9±3.89
500	416.5±34.4	83.30±6.93
250	241.0±15.0	96.40±2.50
	Media ±DS	90.2±6.58

En la Figura 2 se muestra la especificidad del ensayo para diferentes tetraciclinas. Se observa que en las condiciones ensayadas no se separa la tetraciclina de la oxitetraciclina pero sí de la epiclortetraciclina y la clortetraciclina. Los tiempos relativos para la tetraciclina y epiclortetraciclina con respecto a clortetraciclina fueron de 0.38 y 0.80 min respectivamente, lo que está acorde con las especificaciones del fabricante para la epiclortetraciclina, que plantea un tiempo de retención relativo entre 0.78-0.87 min (6).

En la Figura 3 se muestra la presencia de epiclortetraciclina en una premezcla degradada mostrando una alta resolución con respecto a la clortetraciclina, lo cual constituye una herramienta importante para los estudios de estabilidad. Por otra parte permite reformular la premezcla si esta se degrada en el tiempo de tal forma que se garantice la correcta concentración.

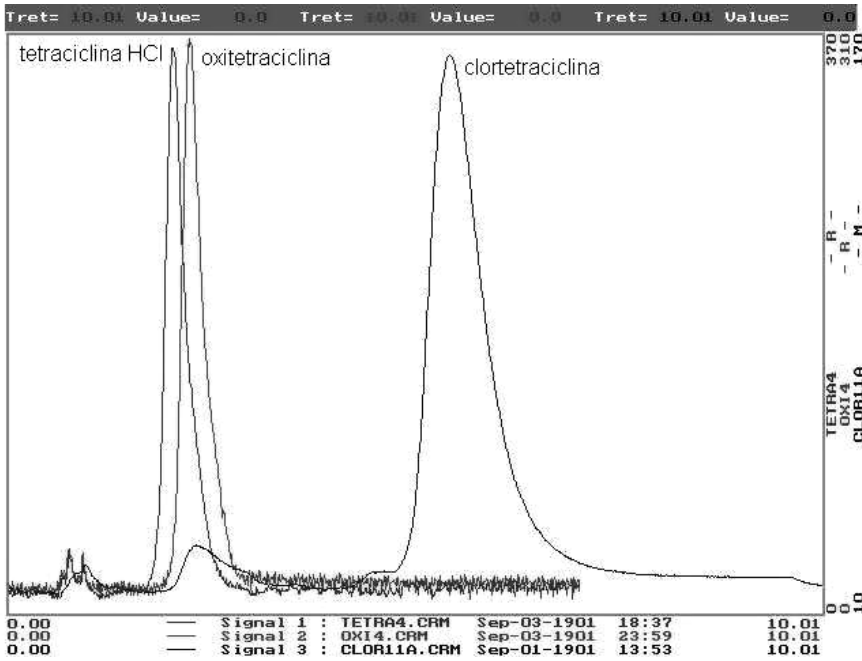


FIGURA 2. Perfil cromatográfico de las tetraciclinas./ *Chromatographic profile of tetracyclines.*

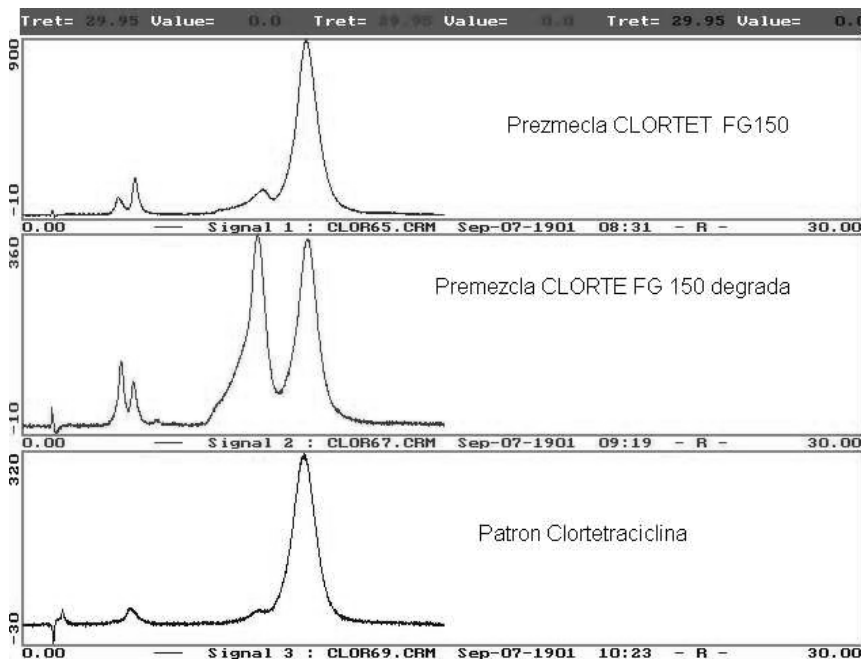


FIGURA 3. Perfil cromatográfico de la premezcla de clortetraciclina (CLORTE FG 150) normal y degradada./ *Chromatographic profile of chlortetracycline pre-mixture (CLORTE FG 150) normal and degraded.*

El límite de detección de la epiclortetraciclina con respecto a clortetraciclina es de 10%, es decir se puede detectar $2\mu\text{g/g}$ referido como clortetraciclina. Límites de impurezas menores se han obtenido cuando se emplean densitómetro con detección fluorescente y cromatografía de capa fina. En estos casos se pueden detectar $0.8\mu\text{g/g}$ para la tetraciclina (9). Sin embargo, el fabricante plantea que la máxima concentración permisible de epiclortetraciclina en el producto es de 0.9% que equivale a $27\mu\text{g/mL}$ para una

formulación que tenga $300\mu\text{g}$ de clortetraciclina/g, por lo que el método propuesto puede detectar esta concentración con un alto grado de exactitud y precisión.

Los resultados del estudio de precisión en condiciones óptimas cuando se aplica directamente la muestra se muestran en la Tabla 2. 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 con lo planteado para cuando se analizan muestras con concentraciones mayores o iguales a 110 µg/kg (5).

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

Pienso	Valor práctico Media ±DS CV%	Recobrado Media ±DS CV%
Media ± DS (µg/g)	442±36 8.1%	86.8±0.63 0.72
Rango Crítico	101	
Media ± DS (MV)	49.9±4.1 8.2%	
Rango Crítico	11	

Un análisis integral de las características funcionales (linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud, especificidad y precisión) obtenidas en este trabajo nos permite proponer este método como técnica de control para evaluar pienso medicado con clortetraciclina y su premezcla. En el caso que se requiera evaluar este antibiótico en muestras biológicas sería necesario el empleo de detección fluorescente para alcanzar valores en el orden de los ng/g (7; 9).

TABLA 3. Resultados de los lotes de piensos medicados con Clortetraciclina./ *Results of feedstuff lots with Chlortetracycline for animal consumption*

Tipo de Categoría	Identificación	Especificación µg/g	Media µg/g	DS	CV	Coincidencia %
Crecimiento	M1-04	300	223	12	6	74,3
Crecimiento	M2-04	450	369	46	13	82,0
Inicio	M3-04	450	474	58	12	105,4
Ceba	M4-04	300	307	20	7	102,2
Ceba	M6-04	300	332	69	21	110,6
Inicio	M5-04	450	398	26	7	88,5
Ceba	M7-04	0	0	nd	nd	100,0
Ceba	M8-04	300	326	9	3	108,7
Ceba	M9-04	150	66	5	7	44,08
Ceba	M10-04	150	87	18	21	58,05
Ceba	M11-04	150	107	14	13	71,53
Ceba	M12-04	150	123	12	10	81,86
Ceba	M13-04	150	99	1	1	65,91
Inicio	M14-04	300	349	54	16	116,18
Ceba	M15-04	150	116	22	19	77,21
			Media ±DS			86±21

Análisis de Muestras

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de clortetraciclina en diferentes lotes que fueron medicados con CHLORTET FG150 para diferentes tratamientos destinados a la porcicultura.

Los resultados anteriores nos muestran una coincidencia que oscila entre 44 y 116 % con respecto a la especificación que aparece en la etiqueta. Un análisis individual nos muestra que los productos formulados con 150µg/g son lo que presentan el mayor problema con un bajo nivel de coincidencia (66±14 %), mientras el resto de los lotes presenta una alta correspondencia (98.7±14.1%). Estos resultados indican que las concentraciones de clortetraciclina en los piensos de 150µg/g no están cumpliendo su especificación de calidad, lo que puede estar dado durante el proceso de mezclado del pienso con la premezcla del clortetraciclina en concentraciones pequeñas donde los valores oscilaron entre 66-123 µg de clortetraciclina/g.

REFERENCIAS

- Burch, D.G.S. (2005): Controlling Mycoplasma (Enzootic) Pneumonia. Fuente: <http://www.octagon-services.co.uk/index.htm>

2. Calsamiglia, M. (2001): *Mycoplasma hyopneumoniae*: epidemiología y control. Información veterinaria –Ciencias Veterinarias No 226.
3. CODEX (2004): Code of practice on good animal feeding. CAC/RCP 54-2004.
4. CODEX (1993): Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Control y la utilización de los Medicamentos Veterinarios CAC/RCP 38-1993.
5. CODEX (1993): Característica de los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Apéndice VIII parte III pag 79-86.
6. ECO (2005): Chlortetracycline FG150: Notas técnicas fuente: www.ecoanimalhealth.com Fecha de actualizado 2005.
7. Houglum, J.E.; Larson, R.D.; Knutson, A. (1997): Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection J AOAC Int. Sep-Oct; 80(5): 961-5.
8. Markakis, P.K. (1996): Determination of tetracyclines in animal feeds in the presence of other drugs by thin-layer chromatography and microbiological method J AOAC Int. 79(2): 375-9.
9. Naidong, W.S.; Hua, E. Roets y Hoogmartens, J. (2003): Assay and purity control of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline in animal feeds and premixes by TLC densitometry with fluorescence detection. *J. Pharm Biomed Anal.* 33(1): 85-93.
10. Quattrochi, O.A.; De Andrizzi, S.A.; Laba, R.F. (1992): Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. ED.: Artes Gráficas Farro SA, California 2750/52 (1289) Buenos Aires: 301-328.
11. Rodríguez, M.A.; González, J.; Barreto, J.; Alonso, N.; Areu, A. y Pardo, A. (1998): Tetraciclinas. *Acta Medica.* 8(1):75-9.
12. Stipkovits, L.; Miller, D.J.S.; Glavits, R.; Fodor L. y Burch, D.G.S. (2001): Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 65: 213-222.
13. Vicca, J.; Maes, D.; Jonker, L.; de Kruif, A.; Haesebrouck, F. (2005): Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Vet Rec.* 156(19): 606.

(Recibido 5-1-2006; Aceptado 4-6-2007)