



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Analítica e Inorgánica.

**DESARROLLO, VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA
METODOLOGÍA CONFIRMATORIA PARA LA
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE
FLORFENICOL, CLORANFENICOL Y TIANFENICOL EN
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS DE USO VETERINARIO POR
LC-MS/MS.**

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico
SEBASTIÁN ARIEL RIQUELME VILCHES

Profesor Patrocinante
BQ. Edwar Fuentes Pérez.

Director de Tesis
QA. Luis Roa Marín.

Santiago de Chile
2011

Recuerda que de ésta, no existe otra vida y hay mucho tiempo por andar, para ponerse a lamentar.

Guachupé

AGRADECIMIENTOS

A Dios que acompaña mi día a día e ilumina mis noches. A la Cordillera de los Andes y su abrazo fraternal en los bellos días de invierno. Al Sol y a la Luna por acoger mis pasos durante el día y guardar mis sueños en la víspera de un nuevo día. Los árboles en la tierra, los peces en el mar, las aves en el cielo, las flores y su olor, los animales y la vida, gracias a todos por llenar mi corazón de alegría.

A mis padres Marcial y Elcira, por los cariños que me entregan para subir cada día un peldaño más en mi vida, han sido privilegiados de acompañarme en mis logros y desventuras, sus incansables alientos, apoyos y amor han sido mi fortaleza en los tiempos de flaqueza. A mis hermanos Fabián y Natalia, que desde sus propios caminos me han enseñado de vida, alegrías y penas, los triunfos de ustedes son una luz de orgullo en mi corazón. A mis abuelos Marcial y Teresa, en el lugar donde estén, sé que no faltan manos fuertes, platos de comida y amor simple, la tristeza de un fallecimiento se cambia por un recuerdo de humildad, sabiduría y simpleza. A mi abuelo Miguel, que ha tenido que luchar día a día, contra el abandono de una muerte desafortunada, sé que su negra está por ahí luchando contra el abandono de una vida afortunada. Gran parte de lo que soy se lo debo a cada uno de ustedes, gracias!

Un nuevo integrante en la familia ha aparecido, este pequeñín, es un viaje al universo, es un planeta en medio de otro, es uno más entre todos, pero es todo para unos, saludos Benjita!, gracias a mi cuñada Daniela por su encomiable preocupación y trato. A mis tíos Claudia y Luis, por estar siempre ahí, por las innumerables alegrías, por los enormes cariños. A mis primos, en especial Nicolás, por su trato de hermandad. A mi tía Elena y su cariño de abuela, mi tía Rosita, por su enorme alegría. A mi madrina que siempre me ha acompañado, ha estado eternamente preocupada de mí, tal como un hijo suyo, gracias de corazón.

Un gran abrazo a mi polola Fran, sé que es poco ofrecer un abrazo cuando gran parte de este logro en la tesis se debe a su empuje y ánimo que nunca me faltó, muchas, muchas gracias. Un saludo muy grande para toda su familia que al igual que la Fran se ha preocupado día a día por mí, en especial a su mamá y abuelos que no han cesado en enseñarme algo más de la vida.

De forma especial quisiera agradecer a la profesora Lilia Masson, quien me consiguió esta oportunidad de Tesis, a la señora Orialis Villarroel por permitirme entrar a la Institución, a Luis Roa quien ha sido fundamental en esta etapa de aprendizaje, nunca olvidaré los consejos ni las enseñanzas. A Doris Carbone por su enorme compañía, por su ayuda y por todo lo que me enseñó, un saludo muy grande a Marcelo y Marcela por sus ayudas y por sus alegrías, un saludo especial para la señora Lily y Manuel quienes siempre estuvieron dispuestos a reír y a entregar tanto cariño hacia mí. La fuerza y el empuje siempre son parte de la vida, cuando uno descubre personas que lo tienen, sólo queda agradecer a Dios por haberlas conocido, a Daniela González por su notable empuje y a Reinaldo Ramos por su fuerza tremenda, quien además fue parte importante de los conocimientos en esta tesis, agradezco de corazón haberlos conocido. A Daniela Rubio por apoyarme en conocimientos y finalmente a todos los de la sección Química de Alimentos del Instituto de Salud Pública.

Agradecer a cada uno de los que me ayudaron dentro de la Universidad, a mis amigos Héctor Griñen, Pablo López, Maryering Rain, José Oyarzún, Priscilla Villarroel, Paloma Zurita, Marta Samur, Pamela Cortés, Francisco Patiño y Fernando Gómez. De la U no sólo se aprende por profesores, se aprende de la vida gracias a compañeros como los que he tenido, la mayor formación que tuve fue la personal y en esa todos, todos participan, sin duda cada uno ha aportado para que hoy sea una persona distinta a la que entró, muchísimas gracias a cada uno de ustedes.

Una simple pelota es la alegría de pocos, quisiera agradecer a Otto, por su cariño fuerte, por sus abrazos peludos y por sus ojos de alegría cada vez que le arrojé su pelota, siempre me enseña algo, quizás no sepa leer pero su cariño y el mío es la más linda lectura, agradecer a Blanca por su disposición de lucha y fiereza, al pequeño León para que deje de lado su inmadurez, quisiera agradecer especialmente a la gorda Candy, una bola de pelos, quien siempre me busca, siempre me espera, quien sueña sus noches con un abrazo matutino, sus ronroneos son mi despertar, sus maullidos son su aliento, su empuje y su cariño. Agradecer a los que ya no están, a Bruno y Niña quienes fueron los grandes de esta casa y a Chupete que espero que esté donde esté haya dejado de lado su impaciencia.

Desde la ventana he mirado las hojas caer y el frío invierno de blancas montañas, una voz siempre me acompaña cada día en la mañana, un saludo muy grande y especial a Don Luchito Hernández, Magaly Flores y Daniel Toribio Torres, por la hermosa compañía que me han brindado durante ya un año. A la música que recorre día tras días mis oídos, mis venas y mi sangre, al Hip Hop que me ha acompañado y me ha enseñado. A amigos como Carlos Román, Gabriela Escalona, Macarena Hernández y al Padre Alejandro Vial, que no sólo han estado aquí, sino también han acompañado ya largos trechos de mi vida. A mi más grande pasión, esa que llega los sábados y se va los domingos, que intermitentemente aparece en la semana, al fútbol que alimenta mi hinchada y mi estadio.

Esto es para toda mi gente, aquella que me ha tratado diferente, aquellos que han dejado huella en mi corazón y mente, es para Dios, es para mi familia, es para mis amigos y para el más grande de todos, que aún en la derrota, siempre está presente. Gracias a todos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Enfermedades bacterianas de los salmónidos	5
2.2 Características de los fármacos	6
2.2.1 Descubrimiento de los fenicoles	6
2.2.2 Síntesis Química de Florfenicol	7
2.2.3 Mecanismo de Acción de los fenicoles	8
2.2.4 Espectro de Acción de los fenicoles	9
2.2.5 Farmacocinética de los fenicoles	9
2.2.6 Toxicidad de los fenicoles	10
2.3 Productos de florfenicol de uso veterinario en Chile	11
2.4 Presencia de antibióticos en alimentos	13
2.5 Métodos instrumentales en la detección de residuos	15
2.6 Situación en Chile	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivo General	19
3.3 Objetivos Específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Muestras	20
4.2 Materiales, insumos y equipos	22
4.2.1 Materiales	22
4.2.2 Reactivos	22
4.2.3 Equipos	23
4.2.4 Soluciones Estándares	23
4.3 Métodos	25
4.3.1 Cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de	25

masas – masas (LC–MS/MS)	
4.3.1.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol	27
4.3.1.1.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de elución isocrática, modificador orgánico y aditivo de ionización	27
4.3.1.3.2 Estudio en gradiente de columnas cromatográficas y medio de inyección de los analitos	28
4.3.2 Validación de metodología para la determinación de impurezas de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos que contienen florfenicol	28
4.3.3 Análisis de muestras de productos farmacéuticos de uso veterinario que contienen florfenicol como principio activo.	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1 Cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masas – masas	31
5.1.1 Espectros de primer orden, segundo orden y parámetros de fraccionamiento	31
5.1.1.1 Espectros de primer orden	31
5.1.1.2 Espectros de segundo orden	40
5.1.2 Realización y optimización del FIA	54
5.1.3 Estudio del comportamiento cromatográfico de elución isocrática, modificador orgánico y aditivo de ionización	59
5.1.4 Estudio en gradiente de columnas cromatográficas y medio de inyección de los analitos	69
5.2 Validación de metodología para determinación de impurezas de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos que contienen florfenicol.	74
5.2.1 Determinación de Linealidad y Sensibilidad	74
5.2.2 Exactitud, Precisión e Incertidumbre	76
5.2.3 Límite de Detección	80
5.3 Análisis de muestras de productos farmacéuticos de uso veterinario que contienen florfenicol como principio activo.	86

6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFÍA	95
8. ANEXO I	100
9. ANEXO II	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Registros de productos farmacéuticos de uso veterinario para florfenicol, de acuerdo a datos obtenidos en el SAG	12
Tabla 2: Tasa de alimentación de un salmón e incorporación de Florfenicol 50% por tonelada de alimento	13
Tabla 3: LMR de florfenicol de acuerdo a especie y tejido blanco de la especie	14
Tabla 4: Muestras de materias primas y productos terminados de florfenicol	21
Tabla 5: Gradiente utilizado para la generación de la fase móvil	28
Tabla 6: Curva de calibración externa de cloranfenicol y cloranfenicol-d5	30
Tabla 7: Pesos moleculares y relaciones m/z obtenidos en los espectros de primer orden	31
Tabla 8: Resumen de los iones moleculares, fragmentos y aductos de cada analito	36
Tabla 9: Valores de Dp, Ep y Cep para cada analito	39
Tabla 10: Valor de pKa de cada analito	48
Tabla 11: Puntos de identificación por ión para cada técnica de MS	49
Tabla 12: Iones moleculares y fragmentos escogidos para fines confirmatorios	50
Tabla 13: Valores de CE y CXP para cada analito y sus fragmentos representativos	53
Tabla 14: Valores óptimos de los parámetros de la fuente de iones para analitos bajo modo ESI	56
Tabla 15: Valores óptimos de los parámetros de la fuente de iones para florfenicol amina bajo modo ESI ⁺	58
Tabla 16: Intensidad, tiempo de retención y ancho de peak de cada analito, de acuerdo a proporción acetonitrilo/agua	62
Tabla 17: Tiempos de retención para las transiciones de tianfenicol y de la señal 356/185	64
Tabla 18: Resumen de los resultados obtenidos del cromatograma de fase móvil 30/70 CH ₃ OH/H ₂ O	67
Tabla 19: Intensidad, tiempo de retención y anchura de peak, de acuerdo al aditivo de ionización utilizado	69
Tabla 20: Influencia de la columna cromatográfica sobre la intensidad, el tiempo	71

de retención y anchura de peak para cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol	
Tabla 21: Resultados de N y HETP de acuerdo a columna utilizada.	72
Tabla 22: Influencia del medio de inyección sobre la intensidad, el tiempo de retención y anchura de peak para cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol	73
Tabla 23: Parámetros de curva externa	75
Tabla 24: Estudio de prueba t para coeficientes de correlación	75
Tabla 25: % de Recuperación de cloranfenicol para cada set de muestras	76
Tabla 26: Resultados de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y t_{obs} para total de muestras (n=18)	77
Tabla 27: Concentraciones de cloranfenicol en las muestras	78
Tabla 28: Resultados de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y t_{obs} para total de muestras (n=18)	79
Tabla 29: Relaciones señal/ruido para los distintos puntos de la curva de calibración	80
Tabla 30: Relaciones señal/ruido para cada una de las muestras estudiadas	81
Tabla 31: Tiempos de retención de las curvas de cloranfenicol	82
Tabla 32: Tiempos de retención de cloranfenicol para cada set de muestras	83
Tabla 33: Tiempos de retención relativo de cloranfenicol para cada set de muestras	84
Tabla 34: Ratios de cloranfenicol de las curvas de calibración	85
Tabla 35: Intensidad relativa de cloranfenicol para cada set de muestras	86
Tabla 36: Concentración de cloranfenicol en muestras de productos farmacéuticos de florfenicol	87
Tabla 37: Concentración de tianfenicol en muestras de productos farmacéuticos de florfenicol	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Muestras reales de salmón	6
Figura 2: Estructuras químicas de los fenicoles	7
Figura 3: Síntesis química de florfenicol a partir de florfenicol amina	8
Figura 4: Evolución de los métodos utilizados en análisis de residuos (De Brabander y cols., 2009)	16
Figura 5: Muestras de florfenicol ingresadas al laboratorio	22
Figura 6: Obtención de espectros de primer y segundo orden, parámetros de fraccionamiento y optimización de fuente de iones	26
Figura 7: Resumen de estudio realizado por Jianzhong Shen y cols.	32
Figura 8: Espectro de primer orden de florfenicol	32
Figura 9: Espectros de primer orden de CAP, CAP-d5, TAP y FFA	34
Figura 10: Rampas de voltaje de los parámetros Dp, Ep y Cep del FF	37
Figura 11: Espectros de segundo orden de: a) florfenicol, b) tianfenicol, c) cloranfenicol, d) cloranfenicol-d5 y e) florfenicol amina extraídos desde la rampa de CE de cada uno de ellos	41
Figura 12: Estructura del fragmento $[\text{CAP-CHCH}_2\text{OHNHCOCHCl}_2\text{-H}]^-$ de CAP, según estudio de Pascal Mottier y cols. del año 2002.	46
Figura 13: Estructura del fragmento $[\text{CAP-COHCl-H}]^-$ de CAP, según estudio de Pascal Mottier y cols. del año 2002.	47
Figura 14: Rampa de CE y CXP para los fragmentos del FF	51
Figura 15: Optimización de la fuente de iones para los analitos cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol	54
Figura 16: Optimización de los parámetros dependientes de la fuente de iones para el florfenicol amina, analizado bajo el modo ESI ⁺	57
Figura 17: Cromatogramas de una solución multiestándar de 50 ppb en distintas composiciones de fase móvil	60
Figura 18: Cromatogramas para el florfenicol y sus transiciones representativas	63
Figura 19: Cromatogramas de estudio de isótopos de Cl	65
Figura 20: Cromatogramas de la solución multiestándar de 50 ppb en la composición metanol/agua 30/70	66

Figura 21: Cromatogramas de la solución multiestándar de 50 ppb con fases móviles con 5 mM de aditivo de ionización	68
Figura 22: Cromatogramas de la solución multiestándar de 50 ppb, para distintas columnas cromatográficas	70
Figura 23: Curva externa de calibración	74
Figura 24: Cromatograma correspondiente a control positivo de cloranfenicol a un nivel 1 ng/mL.	88
Figura 25: Cromatograma correspondiente a muestra de materia prima (MP Emp2 de set 1) de cloranfenicol.	88
Figura 26: Cromatograma correspondiente a muestra de producto terminado (PT Emp1 de set 1) de cloranfenicol.	89
Figura 27: Cromatograma de tianfenicol en estandar de florfenicol cerca de fecha de caducidad.	90
Figura 28: Cromatograma de tianfenicol en estándar de florfenicol cercano a la fecha de elaboración.	90
Figura 29: Cromatograma de tianfenicol en materia prima de empresa 3 (MP Emp 3).	92
Figura 30: Cromatograma de tianfenicol en producto terminado de empresa 4 (PT Emp 4 S.2-2).	92

ABREVIATURAS

AA	: Acetato de amonio.
CAD	: Gas de colisión.
CAP	: Cloranfenicol.
CE	: Collision Energy.
Cep	: Collision Cell Entrance Potential.
CXP	: Collision Cell Exit Potential.
Dp	: Declustering potential.
Ep	: Entrance potential.
ESI ⁺	: Positive ElectroSpray Ionization.
ESI	: Negative Electrospray Ionization.
FA	: Formiato de amonio.
FAO	: Food and agriculture organization.
FF	: Florfenicol.
FFA	: Florfenicolamina.
FIA	: Flow injection analysis.
GC – ECD	: Gas Cromatography – Electron Capture Detector.
GC – MS (MS ⁿ)	: Gas Cromatography – Mass Spectrometry (MS/MS).
GC – MS (SIM)	: Gas Cromatography – Mass Spectrometry (Selective Ion Monitoring).
GS1	: Gas Spray 1.
GS2	: Gas Spray 2.
HETP	: Altura equivalente de platos teóricos.
HPLC	: High Performance Liquid Cromatography.
IS	: Ion Spray.
ISO	: International Organization of Standarization.
LC	: Liquid Cromatography.
LC – MS ⁿ	: Liquid Cromatography – Mass Spectrometry (MS/MS).
LC – MS (QqQ)	: Liquid Cromatography – Mass Spectrometry (Triple Cuadrapolo).
LCR	: Líquido Céfalo Raquídeo
LGPA	: Ley General de Pesca y Acuicultura.
LMR	: Límite Máximo Residual.

LOD	: Límite de detección.
MRM	: Mecanism Reaction Monitoring.
MRPL	: Minimum Required Performance Limit.
MS ₂	: Mass Spectrometry – Mass spectrometry (MS/MS).
OMS	: Organización Mundial de la Salud.
Q1MI	: Quadropole 1 Multiple Ion.
Q1MS	: Quadropole 1 Mass Spectrometry.
SAG	: Servicio Agrícola y Ganadero.
SRS	: Síndrome Rickettsial del Salmón.
TAP	: Tianfenicol.
TLC	: Thin Layer Chromatography.
UPLC – TOF	: Ultra Performance Liquid Chromatography – Time Of Flight.

RESUMEN

La utilización de antimicrobianos por parte de la industria del salmón, ha sido en respuesta a la necesidad del control de ataques de patógenos oportunistas dado los sistemas de cultivo intensivos utilizados por esta industria. En este ámbito en Chile, los fenicoles han sido ampliamente usados.

El descubrimiento de los fenicoles surgió de la extracción desde *Streptomyces venezuelae* de cloranfenicol, posteriormente éste ha sido obtenido de forma sintética. Este descubrimiento llevó consigo el estudio de derivados tales como el tianfenicol y el florfenicol. Según la normativa vigente en Chile y en la Unión Europea, el cloranfenicol es de uso prohibido en animales de consumo humano (dado a sus serios efectos adversos) y posee un límite mínimo de funcionamiento exigido para las diferentes técnicas empleadas en su detección de 0.3 µg/kg, mientras que el tianfenicol y el florfenicol son de uso permitido y poseen un límite máximo residual de 50 y 1000 µg/kg respectivamente. El florfenicol en los últimos años, ha sido uno de los antimicrobianos más utilizados en la industria del salmón, principalmente por su espectro de acción y eficacia.

Dada la similitud estructural de estos 3 fenicoles y la escasa información referente a la síntesis y contaminantes del principal agente utilizado en la industria del salmón, es posible que alguna traza de cloranfenicol y/o tianfenicol esté presente en productos farmacéuticos que contengan florfenicol como principio activo.

Este estudio consistió en determinar fenicoles a nivel de residuos en materias primas y productos farmacéuticos de florfenicol.

La cuantificación de florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol se realizó por LC-MS/MS. Los espectros de primer y segundo orden y sus parámetros de fraccionamiento fueron desarrollados y optimizados como primera etapa. Posteriormente se desarrolló y optimizó un método cromatográfico para la cuantificación de estos 3 fenicoles en ausencia de matriz. Se incluyó además la obtención y optimización de espectros de primer y segundo orden y sus parámetros de

fraccionamiento para florfenicol amina, con perspectiva a futuros estudios de determinación de fenicoles en tejidos de salmón.

Finalmente, se desarrolló, optimizó y validó la detección de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol en productos farmacéuticos de uso veterinario de florfenicol por el método propuesto. Los porcentajes de recuperación alcanzados por el método propuesto fueron de $100.4 \pm 34\%$ (expresado en concentraciones: 1.004 ± 0.3 ng/mL), demostrando una incertidumbre de 33.9%.

El método fue aplicado a muestras reales de productos farmacéuticos de uso veterinario de florfenicol, arrojando negativo a cloranfenicol en todos los casos, pero positivo a tianfenicol en concentraciones desde 0.419 hasta 0.475% para materias primas y entre 0.207 y 0.319% para productos terminados.

A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, resulta apremiante la implementación de controles exigentes para la detección de impurezas en medicamentos veterinarios debido al alto impacto, tanto a nivel de salud pública como a nivel económico, que se proyecta en las exportaciones de carnes de consumo humano.

SUMMARY

DEVELOPMENT, VALIDATION AND IMPLEMENTATION OF A CONFIRMATORY METHODOLOGY FOR SIMULTANEOUS IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF FLORFENICOL, CHLORAMPHENICOL AND THIAMPHENICOL IN VETERINARY PHARMACEUTICAL PRODUCTS BY LC-MS/MS.

In response to the attack of the control's need from certain opportunistic pathogens by giving a intensive farming system in the salmon Industry has provoked the use of antimicrobials from that part of the Industry. On this matter that took place in Chile, phenicols have been extensively used.

Through the extraction of *Streptomyces venezuelae* of chloramphenicol it came up the phenicols's discovery which during the course of the years phenicols has been obtained synthetically. What this discovery did was taking within the study of derivatives such as thiamphenicol and florfenicol. According to the legislation in Chile and the European Union, chloramphenicol is exclusively forbidden in animals which can be eaten by people (due to its serious adverse effects) and it possess a minimum required performance limit for the different techniques applying in his detection of 0.3 µg/kg, while thiamphenicol and florfenicol are allowed because they have a maximum residual limit of 50 and 1000 µg/kg respectively. During the last years the florfenicol has been one of the most commonly antimicrobials used by the salmon Industry, mainly for his spectrum of action and effectiveness.

Giving the structural similarity of these 3 phenicols plus the lack of information concerning to the synthesis and contaminants from the main agent used in the salmon Industry. It is possible that some traces of chloramphenicol and/or thiamphenicol may be present in pharmaceutical products which contain florfenicol as the active ingredient.

The aim of this research was to determinate phenicols from the level residues in raw materials and pharmaceutical products which contain florfenicol.

The quantification of florfenicol, chloramphenicol and thiamphenicol was performed by LC-MS/MS. The first step to develop the spectrum was to take them from the first and second order and fractionation parameters. Subsequently, it has developed and optimized a chromatographic method for the quantification of these 3 phenicols from the abbesses of matrix. It also was including the acquisition and optimization of spectra of first and second order and fractionation parameters for florfenicol amine, taking this into consideration for future phenicols studies for the determination in tissues of salmon.

Finally, it has develop, optimize and validate the detection of florfenicol, thiamphenicol and chloramphenicol in certain pharmaceutical products which are used in veterinary of florfenicol by the suggest method. The recovery percentage reach it by the propose method was $100.4 \pm 34\%$ or in terms of concentration and 1.004 ± 0.3 ng/mL, showing a 33.9% uncertainty.

The method was applied to pharmaceutical products from real samples of veterinary use of florfenicol, showing a negative chloramphenicol in all cases, but positive to thiamphenicol in concentrations from 0.419 to 0.475% for raw materials and between 0.207 and 0.319% for finished products.

In the light of the results obtained in this research, it is inevitable to implement a demanding control of the detection of impurities in veterinary drugs due to the high impact, both public health and economic level, which is projected in exportations of meat through the human consumption.

1. INTRODUCCIÓN

La legislación chilena define a la acuicultura como la “actividad que tiene por objeto la producción de recursos hidrobiológicos organizada por el hombre” (Artículo 2° de LGPA). Dentro de éstos, se encuentran los salmónidos, especies que se denominan anádromas, es decir, cuyo cultivo se inicia en aguas terrestres para posteriormente migrar al mar, donde crecen y se desarrollan.

En Chile, el desarrollo de la acuicultura y de la salmonicultura en particular muestra un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas, lo cual es el resultado de la conjugación de una serie de factores, dentro de los que destacan: 1) Inversión privada y características geográficas muy influyentes dentro de un perfil de ventajas comparativas naturales favorables al cultivo del salmón. 2) Una óptima disposición del borde costero combinado con una alta calidad del recurso agua en cuanto a temperatura, pureza y corrientes marinas. 3) Estacionalidad inversa a la del hemisferio norte, donde se concentran los grandes mercados consumidores, otorgándole una ventaja estacional a la industria nacional respecto de sus competidores del norte. 4) Una oferta de trabajo abundante y de bajo costo relativo. 5) Una oferta de materia prima abundante y bajo costo, tanto de harina como de aceite de pescado, componentes esenciales de la dieta de los salmónidos (Muñoz, 2004).

La industria salmonera chilena pasó de tener una producción a pequeña escala a comienzos de la década de los ochenta a convertirse en uno de los principales productores a nivel mundial, con una participación de mercado que actualmente bordea el 38%, cuando en el año 1992 correspondía sólo a un 14%, siendo el segundo productor mundial de salmón, detrás de Noruega. Asimismo, durante el año 2007 y pese a la severa crisis que la afecta, obtuvo retornos por US\$ 2.241 millones en exportaciones, significando un crecimiento de 3% respecto a las exportaciones del año anterior. Las exportaciones nacionales de salmón han presentado un crecimiento sistemático a partir de 1990, con una tasa de crecimiento promedio para el período que comprende los últimos 17 años que alcanza aproximadamente al 20% anual. El salmón en particular tiene un lugar muy destacado en la producción, la generación de empleo y las exportaciones del país ubicándose en tercer lugar entre los principales productos (agrupados) que Chile vende al exterior, después del cobre y los concentrados de molibdeno (FAO, 2006).

En concordancia con lo anterior es que Chile se ha propuesto desarrollar todos los ámbitos incipientes de desarrollo a favor de transformarse en una potencia agroalimentaria en las próximas décadas, ocupando actualmente, el decimoséptimo lugar mundial en exportaciones de alimentos, siendo dentro de los 20 países que lideran este tipo de exportaciones, el país que presenta la mayor tasa de crecimiento en los últimos años. (FAO – ChileAlimentos, 2005).

Como consecuencia del explosivo aumento de producción de salmónidos, las grandes densidades de individuos en los sistemas de cultivo intensivos y la presión que estos generan en el ecosistema, los expone a diferentes factores estresantes provocados por el hacinamiento, manipulación y problemas nutricionales generados por el cultivo intensivo (Cabello, 2004). Estas condiciones inapropiadas dejan entre ver las falencias sanitarias, la dificultad para aislar a los peces de cultivo infectados y consecuentemente, la disminución de la eficiencia del manejo, repercutiendo directamente en el sistema inmune de los peces (Cabello, 2006), volviéndose más vulnerables al ataque de patógenos oportunistas, resultando en altas mortalidades naturales o por faenas, fenómeno que no es extraño para los acuicultores. Como una forma de mantener bajo control a los patógenos responsables de las enfermedades, la industria farmacéutica ha desarrollado productos químicos biológicamente activos destinados a la eliminación y/o a la inactivación de los patógenos, de tal forma de minimizar las pérdidas generadas por las enfermedades. Por otro lado, la industria farmacéutica también ha desarrollado vacunas para la prevención de las enfermedades. Muchos de estos productos farmacéuticos, son utilizados de manera preventiva como uso profiláctico.

La expansión de la acuicultura junto con la preocupación de la población sobre temas ambientales ha presentado muchos de los problemas potenciales asociados con el creciente uso de compuestos químicos en el ambiente acuático. El uso de estos compuestos posee una larga data, que se inicia con el uso de sal para el control de ectoparásitos. En 1909 ya existen registros del uso de formalina para el control de infecciones por Costia. El cobre y el verde de malaquita entraron en los años 1920 y 1930 como desinfectantes, así como también lo fueron compuestos de amonio cuaternario en 1940. A finales de 1930, se inicia la aplicación de sulfamerazina para el tratamiento de enfermedades bacterianas. (Alderman y Michel, 1992).

A medida que nuevos fármacos eran desarrollados para la medicina humana y veterinaria, rápidamente se fue investigando su aplicación en los peces. Sin embargo, a pesar de la enorme expansión de la industria acuícola a través del mundo en los años 1930, y a pesar de la amplia variedad de fármacos sugeridos en la literatura científica como adecuadas para su uso en acuicultura, la variedad de productos veterinarios legalmente disponibles para los cultivos de peces era aún muy limitada en 1991 (Alderman y Michel, 1992). Sin embargo, este pensamiento cambió diez años después, debido principalmente al desarrollo de vacunas contra las principales enfermedades bacterianas en los peces, sumado a la información disponible sobre la resistencia de las bacterias y parásitos a ciertos antibacterianos y antiparasitarios, al efecto de los quimioterápicos en el medio ambiente y a la percepción por parte del consumidor frente al uso de fármacos en los productos de la acuicultura (Alderman, 2002).

De acuerdo a esto, se ha observado en Chile una disminución en el uso de quinolonas y fluoroquinolonas (ácido oxolínico y flumequina respectivamente) y un aumento en el uso de florfenicol, que en el año 2009 representó más del 66% de los antibióticos utilizados en los salmónidos (Sernapesca, Laboratorio de Farmacología Veterinaria U. de Chile, 2010).

La presencia de este tipo de agentes a nivel de residuos en alimentos, puede provocar efectos nocivos, tales como: teratogénicos, mutagénicos, resistencia bacteriana, etc., además del alto impacto ambiental que pudiesen tener estos agentes a nivel de sedimentos, con la posterior modificación de la microbiota bacteriana. La exigencia de los distintos mercados, obliga a que las empresas y países exportadores instauren programas de vigilancia de estas sustancias que satisfagan los requisitos que establece la legislación comunitaria. De esta manera organizaciones intergubernamentales tales como la Comisión Mixta FAO/OMS, Codex Alimentarius, Organización Mundial de Sanidad Animal y Organización Internacional de Normalización (ISO), han realizado en conjunto un programa sobre normas alimentarias, en las cuales están incluidos los Programas de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios y Contaminantes en todas las especies animales productoras de alimentos. Es así como se han establecidos Límites Máximos Residuales (LMR).

De esta forma se hace importante contar con metodologías de análisis validadas, para el estudio de residuos de medicamentos veterinarios en los límites exigidos por las distintas legislaciones y/o normas.

El uso de florfenicol es habitual durante la etapa de crecimiento de los salmónidos que se extiende por dos años. Este fármaco es de uso autorizado por el Servicio Agrícola y Ganadero y posee un LMR de 1000 µg/Kg en el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Resolución Exenta N° 1462 de 1999). Actualmente existe un escaso control de los productos de uso veterinario en relación a la existencia de trazas de compuestos análogos, isómeros e impurezas. La existencia de cloranfenicol como impureza en los productos que contienen florfenicol de uso veterinario, podría ocasionar efectos en la salud pública por los efectos adversos descritos en la literatura y problemas económicos debido a rechazos en los mercados de destino por la presencia de un producto de uso prohibido en animales destinados al consumo humano.

Esta memoria de título propone, el desarrollo de un método de determinación de 3 fenicoles: florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol en productos veterinarios y validar esta metodología según los criterios analíticos propuestos por la Comunidad Europea, en la Decisión de la Comisión N° 2002/657 /CE y luego aplicar la metodología validada a muestras reales de productos veterinarios que poseen florfenicol como principio activo.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios del Departamento de Salud Ambiental, del Instituto de Salud Pública de Chile, entre Abril y Diciembre de 2010.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enfermedades bacterianas de los salmónidos

La principal causa de las pérdidas económicas en la acuicultura se debe a la presencia de enfermedades en los salmones. Las pérdidas económicas, no sólo se atribuyen a la mortalidad generada por las enfermedades, sino también a las pérdidas de peso, calidad y los costos de recuperación provocados por los tratamientos empleados. De acuerdo a las distintas etapas de desarrollo de los salmónidos, se presentan distintas enfermedades. Cuando el salmón se encuentra en fase de agua dulce, las enfermedades predominantes corresponden a las generadas por parásitos, mientras que en la fase de mar o etapa de engorda, las enfermedades principalmente son de origen bacteriano, siendo las más importantes el Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS), Furunculosis y Vibriosis.

El SRS es causado por la infección con *Piscirickettsia salmonis*, un bacilo gram-negativo, inmóvil, de tipo intracelular. La transmisión es horizontal, es decir, por contacto directo e indirecto entre peces. Los principales signos de la enfermedad, es la coloración oscura de los salmones afectados, anorexia, letargia y nado cercano a la superficie.

La furunculosis es provocada por la infección con *Aeromonas salmonicidas*, el cual es un bacilo gram negativo de la familia *Vibrionaceae*, posee un amplio rango de hospedadores, sin embargo, es un patógeno obligado del pez, que puede sobrevivir por algunas semanas fuera del hospedador, dependiendo de la salinidad, pH y temperatura, además puede sobrevivir tanto en el agua dulce como en el agua salada. El principal mecanismo de infección es por medio de la transmisión horizontal, siendo las vías digestivas, percutánea y branquial las rutas más comunes de infección. Se puede manifestar como una septicemia generalizada, sin el desarrollo de furúnculos. En condiciones crónicas se presentan abscesos en la piel, los que se transforman posteriormente a furúnculos.

Por otra parte la Vibriosis es causada por *Vibrio salmonicida*, patógeno de la familia *Vibrionaceae*, es un bacilo gram negativo, exclusivo de los peces a diferencia de otros patógenos de la familia, el cual es un microorganismo oportunista. Se manifiesta en el salmón o en los

peces, con úlceras y lesiones externas e internas, que llevan a septicemia hemorrágica bacteriana (Barnes, 1994).

En la Figura 1, se observan muestras reales de salmón, provenientes de los fiordos de la décima región. A la izquierda se observa una muestra de salmón que posee lesiones sobre la piel y en el tejido muscular, que probablemente estén relacionadas a furunculosis, a la derecha se observa una muestra de salmón en estado sano.



Figura 1: Muestras reales de salmón.

2.2 Características de los fármacos

2.2.1 Descubrimiento de los fenicoles

El descubrimiento de los fenicoles ocurre en 1947, cuando desde un microorganismo (*Streptomyces venezuelae*), aislado de una muestra de suelo de Venezuela, es descubierto el cloranfenicol (D-(-1)-treo-2-dicloroacetamido-1-(4-(nitro)-fenil)-1,3-propanodiol). Una vez conocida la estructura de éste, comenzó a ser obtenido de manera sintética.

Con los años surgieron nuevas alternativas, como el tianfenicol (TAP) y el florfenicol (FF), sus estructuras químicas se encuentran representadas en la Figura 2.

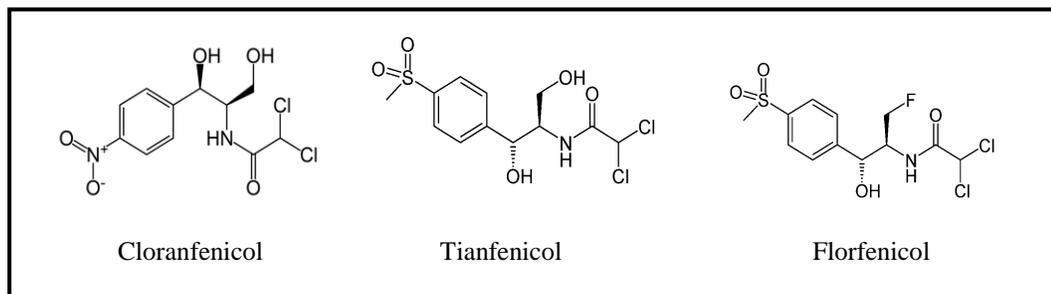


Figura 2: Estructuras químicas de los fenicoles.

Se observa que el cloranfenicol presenta un grupo nitro en posición para a la cadena dicloroacetamida del anillo bencénico, mientras que el florfenicol y el tianfenicol presentan un grupo p-metilsulfonil. Por otra parte el florfenicol difiere del tianfenicol, ya que el primero presenta un flúor en vez de un grupo hidroxilo en su cadena dicloroacetamida.

2.2.2 Síntesis química de florfenicol

El florfenicol es un medicamento de síntesis que está patentado, y por tanto no es posible encontrar información acerca de éste en las distintas farmacopeas. Existen patentes en Estados Unidos y antecedentes bibliográficos que declaran síntesis químicas de florfenicol, si bien estas síntesis pudiesen ser las utilizadas por las distintas industrias farmacéuticas, no se poseen datos reales sobre el uso de alguna de ellas.

En los años 50 la investigación de síntesis de análogos de cloranfenicol, se centró principalmente en la sustitución del grupo p-nitro del anillo aromático, con sustituciones diversas como p-metil, p-oximetil o p-trifluorometil, con especial énfasis en la generación del isómero correspondiente a la configuración treo por sobre la eritro, de la cadena dicloroacetamida, ya que el primero de ellos es el que posee la actividad farmacológica demostrada (Caldwell, 1953).

En estudios y en patentes de finales de la década del 80, la síntesis de florfenicol se realizaba casi en su totalidad a partir de la síntesis de tianfenicol, si bien este tipo de síntesis no es la principal actualmente, su generación podría ser aún a partir de dicho compuesto. De esta manera, es posible encontrar trazas de tianfenicol en productos de florfenicol. Al igual que en la síntesis

de análogos de cloranfenicol, se pone especial énfasis en la configuración trece de la cadena dicloroacetamida (Guangzhong, 1997).

Karuru et al., en el año 2009 declaran una patente en Estados Unidos para la síntesis de florfenicol, que propone la síntesis a partir de (1R,2S)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-amino-3-fluoro-1-propanol (florfenicol amina), con ester ácido dihaloacético con la utilización de una base inorgánica en un solvente orgánico, obteniéndose una pureza estimada por HPLC de aproximadamente 99,73%. En la Figura 3 se observa la síntesis de Karuru et al.

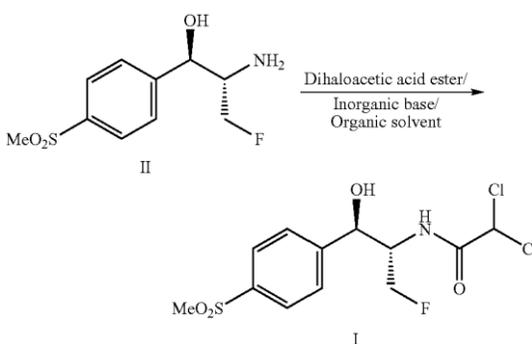


Figura 3: Síntesis química de florfenicol a partir de florfenicol amina.

La similitud estructural entre los tres fenicoles, la escasa normativa e información que se posee sobre la síntesis del florfenicol y el escaso control de los productos de uso veterinario en relación a trazas, isómeros e impurezas, podrían ser determinantes en la presencia a nivel de trazas de cloranfenicol en florfenicol o tianfenicol en florfenicol.

2.2.3 Mecanismo de Acción de los fenicoles

Los fenicoles son agentes antimicrobianos de origen sintético. Su mecanismo de acción es la fijación de manera reversible a la subunidad ribosómica 50S, tras penetrar a la bacteria por difusión facilitada. La unión al ribosoma se realiza de tal forma que impide la formación del aminoacil ARNt, por lo que se detiene la síntesis proteica. La consecuencia para la bacteria sensible es la inhibición de su multiplicación, por lo que su efecto es bacteriostático, aunque en dosis elevadas se describe una acción bactericida (Florez, 2003).

2.2.4 Espectro de Acción de los fenicoles

En general los fenicoles, se consideran de amplio espectro y poseen espectros de acción similares, en el que se destaca la gran sensibilidad de *Haemophilus influenzae*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas mallei* y la totalidad de bacterias anaerobias. Son también habitualmente sensibles diferentes especies de *Streptococcus* y *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Shigella*, *Actinomyces*, *Mycoplasma*, *Listeria*, *Chlamydia* y *Rickettsias*.

Dentro de las especies sensibles también encontramos las que más aquejan a los salmónidos, ya sea *Rickettsias Salmonis*, *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio salmonicida*.

Las bacterias con mayor tasa de resistencia pertenecen a la familia de bacilos gramnegativos: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.5 Farmacocinética de los fenicoles.

Pueden ser administrados por vía oral, puesto que tras su absorción se alcanzan niveles plasmáticos adecuados. El cloranfenicol puede administrarse como profármaco (esterificado) para mejorar su absorción, la cual suele ser completa (semejante a vía intravenosa). Tanto el tianfenicol como el florfenicol poseen también una absorción excelente.

La distribución de estos 3 fenicoles es muy buena, alcanzando concentraciones activas en casi todos los órganos y líquidos corporales, incluyendo el líquido cefalo raquídeo (LCR), el humor acuoso, el tejido prostático, la sangre fetal, etc.

El florfenicol es un compuesto neutro liposoluble, que atraviesa fácilmente las barreras celulares, posee una baja tasa de unión a proteínas plasmáticas (30 – 45%), es rápidamente metabolizado a la temperatura del agua de cultivo de salmónidos, siendo su metabolito principal el florfenicol amina (FFA), el cuál aún posee actividad antibacteriana. Además el florfenicol es un potente inhibidor del sistema oxidativo del citocromo p450, por lo que puede ser utilizado también con fines de prolongar efectos farmacológicos de otros medicamentos.

La mayor diferencia ocurre en la eliminación de los fenicoles, esto es por las distintas rutas que existen para resolver la eliminación de estos compuestos. El tianfenicol es excretado en su mayor parte en forma activa por el riñón a través de filtración glomerular, mientras que el florfenicol se elimina aproximadamente en un 50% de forma inalterada por la orina, el porcentaje restante puede ser eliminado como florfenicol amina, por otra parte el cloranfenicol sólo se elimina en forma activa por filtración glomerular en escasa cantidad (10% de la dosis), dado a su conjugación hepática con ácido glucurónico por la intervención de la glucuroniltransferasa, además de sufrir nitroreducciones, acetilaciones, etc (Ríos, 2004).

2.2.6 Toxicidad de los fenicoles.

El cloranfenicol tuvo un gran uso luego de su descubrimiento, ante la escasez de antibióticos que pudiesen tratar las enfermedades de esos años, esto llevó consigo el conocimiento de sus serios efectos adversos. Ya en 1950 se advirtió que podría ocasionar discrasias graves y letales, con el paso de los años se describieron dos tipos de efectos adversos: daño a la médula ósea dosis – dependiente y anemia aplásica medular como respuesta idiosincrásica, lo que limitó el uso de cloranfenicol sólo a infecciones más graves, tales como fiebre tifoidea o meningitis bacteriana.

El mecanismo de toxicidad propuesto para estos efectos puede deberse a la inhibición de la síntesis de proteínas en las células de la médula ósea (Kucers y cols., 1997). La anemia aplásica genera leucemia en los seres humanos (Dollery, 1999; Turton y cols., 2002^a), los cuáles han sido relatados como un daño al DNA causado por el nitrosocloranfenicol (metabolito del cloranfenicol, que resulta de la reducción del grupo p-nitro). La habilidad de reducir este grupo está determinado genéticamente (Festing y cols., 2001), lo que respondería a la respuesta idiosincrásica de este efecto adverso.

Pese a estos efectos adversos del cloranfenicol, la OMS aboga por su uso en muchos países del tercer mundo, en ausencia de tratamientos más económicos.

En cuanto al tianfenicol y al florfenicol, el primero de ellos se le ha relacionado con los efectos adversos de su predecesor pero en menor medida, en cuanto al florfenicol no han sido

declarados efectos adversos como los del cloranfenicol. Se ha descrito en la literatura que el efecto adverso del cloranfenicol no se presenta en tianfenicol y florfenicol, pues ambos no poseen grupo nitro en el anillo y presentan una sustitución metilsulfonil.

2.3 Productos de florfenicol de uso veterinario en Chile.

Según Sernapesca en su Programa de Control de Fármacos, entiende por “producto veterinario” como toda sustancia natural o sintética o mezcla de ellas que, presentada bajo una forma farmacéutica determinada, está destinada a la prevención, diagnóstico, curación, tratamiento y atenuación de las enfermedades de los animales o sus síntomas. Se incluyen en este concepto los productos destinados a medicar los alimentos, a estimular el desarrollo de los animales, los destinados al embellecimiento de los mismos, los desinfectantes de uso ambiental o de equipos y todo otro producto que utilizado en los animales o su hábitat, protege, restaura o modifica sus funciones orgánicas o fisiológicas.

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), de acuerdo a lo estipulado en el DS N° 139 de 1995 (Reglamento de productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinario), es el encargado del registro en Chile de los fármacos de uso veterinario, ya sea para la importación, la elaboración y la comercialización de éstos. Para el florfenicol, se registran en Chile 18 productos farmacéuticos de uso veterinario, de los cuáles sólo 6 son destinados para su uso en salmónidos, éstos se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1: Registros de productos farmacéuticos de uso en salmónidos para florfenicol, de acuerdo a datos obtenidos en el SAG.

Nombre Comercial	Forma Farmacéutica	País Fabricante	Empresa Fabricante	Especies
Aquafen	Polvo	EEUU	Schering Plough Animal Health	Salmónidos
Florfenox 50%	Polvo	India	Cipla Ltda.	Salmónidos
Florfenicol 50%	Polvo	Chile	Drag Pharma Chile Invetec S.A.	Salmónidos
Duflosan 50%	Polvo	Chile	Veterquímica S.A.	Salmónidos
Veterin 50%	Polvo	Chile	Centrovet Ltda.	Aves (pollos) Salmónidos Cerdo
Florfenicol 40%	Suspensión Oral	Chile	Drag Pharma Chile Invetec S.A.	Salmónidos

Se puede observar que 2 de estos productos son importados, 1 de Estados Unidos correspondiente a la fabricación de Schering-Plough y 1 de la India fabricado por la empresa Cipla Ltda. Los 4 productos restantes son de fabricación chilena correspondientes a 2 productos de Drag Pharma Chile, 1 producto de Centrovet Ltda. y 1 producto de Veterquímica S.A.

En general la dosificación de los productos veterinarios, relaciona el peso del animal, con la dosis, así por ejemplo para los salmónidos la dosificación es de 10 mg/kg de peso durante 10 días consecutivos.

Las presentaciones para salmónidos son de 50 y 40% de florfenicol, como por ejemplo Aquafen, Florfenox, Veterin y Duflosan 50%. Estos se incorporan en el alimento del salmón, mediante una mezcla de alimento y florfenicol y posteriormente un agregado de aceite comestible, ya sea vegetal o de pescado con el fin de recubrir la superficie. También se pueden incorporar en las Plantas generadoras de Alimentos veterinarios, las cuales tamizan todos los

ingredientes del alimento más el fármaco para luego generar los pellets. La incorporación del fármaco en el alimento va de la mano con la tasa de alimentación del salmón de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2: Tasa de alimentación de un salmón e incorporación de Florfenicol 50% por tonelada de alimento.

Tasa de alimentación	Florfenicol 50% por tonelada de alimento (kg/ton)	Florfenicol 40% por tonelada de alimento (kg/ton)
0,5 %	4,00	5,00
1,0 %	2,00	2,50
2,0 %	1,00	1,25
3,0 %	0,66	0,84
5,0 %	0,44	0,5

Así por ejemplo para un pez de 1000 g (1 kg) con una tasa de alimentación de 1%, le corresponde 10 g de alimento por día. Estos 10 g de alimento contienen 20 mg de florfenicol según cantidad de droga por tonelada (2 kg de FF/tonelada de alimento).

Dentro de los excipientes que se podrían encontrar en los polvos, están: lactosa, almidón, hidroxipropilcelulosa, parabenos, etc.

2.4 Presencia de antibióticos en alimentos.

El uso de antibióticos en animales de consumo humano, se encuentran reglamentados en el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile N° 977 de 1996. Aquí se pueden encontrar los límites máximos de residuos de cada fármaco usado.

Se han generado una serie de normativas que regulan el uso de estos medicamentos en animales de consumo humano, provocado por los serios efectos adversos del cloranfenicol.

Es así como la Comunidad Europea en 1994 prohibió la administración de cloranfenicol a éstos. En el año 1996 la Comunidad Europea a través de la Directiva 96/23/CE, incluye al cloranfenicol como sustancia de tolerancia cero como límite residual en tejido animal, estableciendo como límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL) de los métodos analíticos aplicables al cloranfenicol 0,3 µg/kg, esto se traduce que los estados miembros velarán porque sus métodos analíticos utilizados para detectar cumplan con los MRPL exigidos (Directiva 96/23/CE).

El tianfenicol no se encuentra prohibido por la Comisión Europea, pero sí se ha descrito su límite máximo de residuos (LMR) como 50 µg/kg, mientras que para el florfenicol el LMR es distinto dependiendo de la especie y tejido que se investigue, la Tabla 3 muestra el LMR para el florfenicol.

Tabla 3: LMR de florfenicol de acuerdo a especie y tejido blanco de la especie.

Especie animal	LMR ¹	Tejido blanco	Otras provisiones
Bovino	200 µg/kg	Músculo	
	3000 µg/kg	Hígado	
	300 µg/kg	Riñón	
Pollo	100 µg/kg	Músculo	No usar en animales productores de huevos de consumo humano
	200 µg/kg	Piel + grasas	
	2500 µg/kg	Hígado	
	750 µg/kg	Riñón	
Porcino	300 µg/kg	Músculo	
	500 µg/kg	Piel + grasas	
	2000 µg/kg	Hígado	
	500 µg/kg	Riñón	
Pescados	1000 µg/kg	Músculo y piel	

Según la tabla anterior se puede observar que aquellos tejidos que poseen un mayor LMR son justamente los tejidos purificadores del organismo, tales como hígado y riñón, mientras que

¹ El LMR del FF considera la suma de FF más su principal metabolito activo FFA.

tejidos más alejados de estos centros purificadores poseen un menor LMR, tales como músculo y piel.

2.5 Métodos instrumentales en la detección de residuos.

Como residuo se entiende a una traza de una sustancia presente en la matriz (por ejemplo: carne, orina, etc.) desde la fase de administración del medicamento (ya sea por una práctica veterinaria, como también el uso ilegal) al animal. En todos los casos los niveles de concentración son del orden de los $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) llegando incluso al orden de los ng/kg (ppt).

Para las sustancias prohibidas el énfasis se ha dado a lo largo de los años en la detección de la concentración lo más baja posible (el principio de cero tolerancia). En un comienzo se desarrollaron metodologías cualitativas multi-residuos, que luego dieron origen a metodologías cuantitativas (De Brabander y cols., 2009).

En la década de los 70, la cromatografía en capa fina (TLC) fue el método de elección para la detección cualitativa de estas sustancias. Las razones de su uso fueron la especificidad, simplicidad de desarrollo y la posibilidad (en ese entonces) de bajos límites de detección. Hasta ese momento la alternativa con un mejor límite de detección era la cromatografía gaseosa con detección de captura de electrones (GC-ECD).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV introducido en la mitad de los 70, era costoso y poco robusto, posteriormente se introdujeron los detectores de fluorescencia. Ya en los años 90 la aparición de la cromatografía gaseosa (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) condujo la transición de métodos TLC (y HPLC) a GC-MS. Sólo a finales de los 90, la aparición de LC-MSⁿ demandó el equipamiento estándar para los laboratorios de residuos (De Brabander y cols., 2009). Hoy algunos laboratorios, han adoptado el uso de métodos UPLC-TOF siendo una técnica aún incipiente. En la Figura 4 se observa la evolución de los métodos usados en los residuos veterinarios.

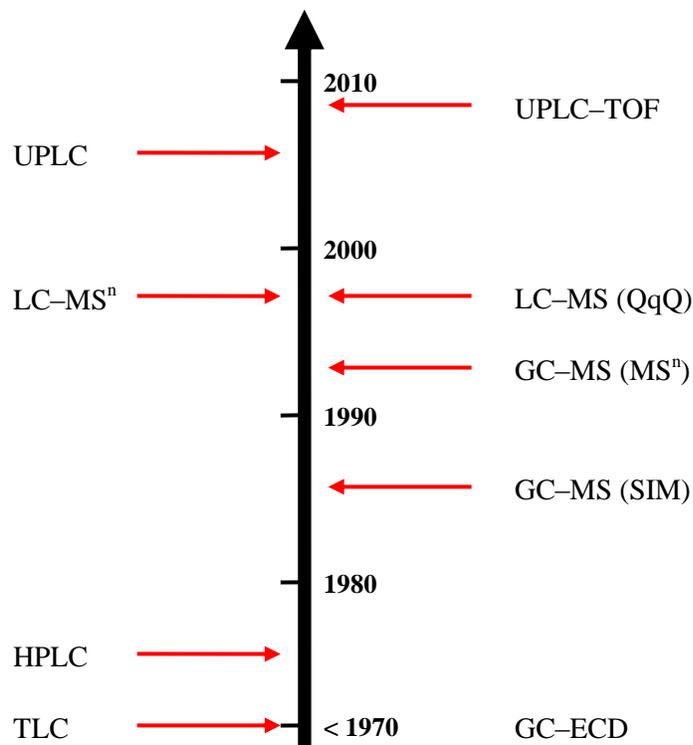


Figura 4: Evolución de los métodos utilizados en análisis de residuos (De Brabander y cols., 2009).

Como una regla general también ha sido la relación que posee el resultado de la técnica instrumental con la eficacia del clean-up. A lo largo de los años también se ha producido una enorme evolución en el proceso de clean-up, si en los 70 la extracción era con solventes y columnas preparativas, como por ejemplo de silicagel o alúmina (AlO₃), en los 80 la extracción en fase sólida (SPE), en los 90 la cromatografía de inmunoafinidad (IAC) y a finales de los 90 los polímeros de impresión molecular (MIP), siendo ésta una técnica específica para cada residuo. El siguiente paso en este proceso, será un clean-up de los metabolitos de las sustancias más importantes (De Brabander y cols., 2009).

Hoy en día los laboratorios que determinan residuos de fármacos, deben aplicar metodologías analíticas que garanticen la detección de los LMR, para lo cual se puede recurrir a métodos realizados en estudios colaborativos llevados a cabo por diversos laboratorios de prestigio, recogerlos hacer una revisión bibliográfica en revistas analíticas o bien desarrollar un

método en el propio laboratorio. Independiente de cuál metodología analítica se seleccione, ésta debe ser debidamente validada por el laboratorio (San Martín, Cañón. 2000).

En consideración a lo anteriormente planteado, la búsqueda de metodologías capaces de detectar y cuantificar simultáneamente florfenicol, cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol amina tanto en alimentos de origen animal como en productos de uso veterinario, ha sido estudiada en países, tales como China, EEUU, Bélgica y Brasil entre otros.

Al igual que la evolución de las metodologías de cuantificación de residuos, las técnicas para la determinación simultánea de fenicoles en alimentos de origen animal y productos veterinarios también ha evolucionado en los últimos veinte años e incluye: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía gaseosa con detectores de captura electrónica (GC-ECD) y espectrometría de masa (GC-MS), cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (HPLC-UV), espectrometría de masa (HPLC-MS) y espectrometría de masa en tándem (HPLC-MS/MS).

Pascal Mottier en el año 2003 plantea la determinación de cloranfenicol en carnes y organismos marinos por medio de LC-ESI-MS/MS. La determinación de cloranfenicol también ha sido realizada en miel a través de LC-MS/MS por Forti y col. en el año 2004. En 2008 Jianzhong Shen y col. realizan una determinación simultánea de 4 fenicoles en músculo de pollo a través de LC-MS/MS. El mismo autor en el 2009 realiza la determinación de los 4 fenicoles en tejidos de ave y en músculo e hígado de cerdo a través de GC-MS.

2.6 Situación en Chile

Tanto el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) poseen programas de monitoreo para los productos farmacéuticos, donde el SAG monitorea los productos farmacéuticos destinados a uso veterinario, mientras que el ISP monitorea los productos farmacéuticos de uso en humanos. Por otra parte ambas instituciones poseen programas de monitoreo para alimentos de consumo humano, en este caso el SAG monitorea alimentos de exportación, mientras el ISP monitorea el control interno del país. En este contexto, el ISP, por ley, es el Laboratorio Nacional de referencia en diferentes ámbitos de la salud

pública, por tanto la investigación, desarrollo e implementación de nuevas técnicas analíticas es fundamental para el cumplimiento de su labor de referencia.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los productos de uso veterinario que contienen florfenicol poseen como impurezas otros fenicoles, entre ellos cloranfenicol, los que se pueden encontrar igualmente a nivel de residuos en salmónidos tratados con dichos productos.

3.2 Objetivo general

Desarrollar, validar e implementar una metodología de determinación de trazas de cloranfenicol o tianfenicol en productos farmacéuticos de uso veterinario de florfenicol.

3.3 Objetivos Específicos

- Obtener los espectros de masas de primer orden, segundo orden y patrones de fraccionamiento de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol.
- Seleccionar los fragmentos más abundantes para construir un método de identificación y cuantificación MRM (multiple reaction monitoring).
- Desarrollar un método cromatográfico LC-MS/MS para la determinación simultánea de fenicoles.
- Validar el método confirmatorio para la identificación y cuantificación en productos farmacéuticos de florfenicol por LC-MS/MS según criterios de la Comunidad Europea (2002/657/CE).
- Analizar y determinar otros fenicoles a nivel de residuos en productos farmacéuticos de florfenicol de uso en salmónidos por LC-MS/MS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los ensayos realizados para cumplir con los objetivos de esta memoria, se realizaron en dependencias del Instituto de Salud Pública de Chile, en el Departamento de Salud Ambiental, Sección Química y Alimentos, en el Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios.

4.1 Muestras

El Departamento de Medicamentos del Servicio Agrícola y Ganadero fue el responsable del muestreo, de materias primas y productos terminados de florfenicol, bajo la jurisdicción que les corresponde como ente fiscalizador de medicamentos de uso veterinario en Chile. Las muestras fueron tomadas el día 29 de Diciembre de 2010, efectuadas por fiscalizadores del SAG, en los laboratorios de las 4 empresas involucradas en el estudio, todas con sede en Santiago, siendo desconocida sus procedencias por parte del Instituto de Salud Pública, como forma de resguardo de información confidencial. Fueron ingresadas el día 30 de Diciembre de 2010 al ISP, cumpliendo con condiciones de temperatura (menor a 20 °C). La Tabla 4 resume las muestras ingresadas para el estudio de los fenicoles en productos farmacéuticos.

Tabla 4: Muestras de materias primas y productos terminados de florfenicol.

Empresa	Producto	Serie	Identificación
2	Materia prima	201000907	MP Emp. 2
3	Materia prima	20090912	MP Emp. 3
4	Materia prima	M-10-0640	MP Emp. 4
1	Producto terminado	Serie 1	PT Emp. 1 S1
2	Producto terminado	Serie 1	PT Emp. 2 S1
2	Producto terminado	Serie 2	PT Emp. 2 S2
3	Producto terminado	Serie 1	PT Emp. 3 S1
3	Producto terminado	Serie 2	PT Emp. 3 S2
4	Producto terminado	Serie 1/1	PT Emp. 4 S1/1
4	Producto terminado	Serie 1/2	PT Emp. 4 S1/2
4	Producto terminado	Serie 2/1	PT Emp. 4 S2/1
4	Producto terminado	Serie 2/2	PT Emp. 4 S2/2

Las muestras ingresadas se encontraban en frascos plásticos sellados, con un peso promedio de 50 g de materia prima o producto terminado, según se muestra en la Figura 5.



Figura 5: Muestras de florfenicol ingresadas al laboratorio.

4.2 Materiales, insumos y equipos

4.2.1 Materiales

- Matraz de aforo de 10 mL +/- 0.02 mL (20°C), clase A.
- Micropipetas Eppendorf, 20 – 200, 100 – 1000, 500 – 5000 µL.
- Micropipetas Brand, 20 – 200, 100 – 1000 µL.
- Viales de 2 mL para autosampler.
- Micro tubos Eppendorf.
- Jeringa Gastight® 1001 de 1 mL.
- Insertos para viales 200 µL, Agilent.
- Papel filtro Whatman 541.
- Filtros 0,22 µm.

4.2.2 Reactivos

- Agua calidad HPLC Merck®.
- Acetonitrilo grado HPLC J.T. Baker®.
- Metanol grado HPLC Fischer Scientific®.

- Formiato de amonio grado HPLC Fluka Analytical[®].
- Acetato de amonio grado HPLC Fischer Scientific[®].
- Florfenicol 99% pureza, Dr. Ehrenstorfer[®].
- Cloranfenicol 99,8 pureza, Dr. Ehrenstorfer[®].
- Cloranfenicol-d5 98% pureza, Dr. Ehrenstorfer[®].
- Tianfenicol 98% pureza, Sigma[®].
- Florfenicol amina 99% pureza, Sigma[®].

4.2.3 Equipos

- Cromatógrafo líquido Applied Bio System MDS SCIEX., equipado con bomba cuaternaria Agilent 1200 series, desgasificador por vacío Agilent 1200, muestreador automático con control de temperatura Agilent Hip-Als, termostizador de columna Agilent 1200 y detector 3200 Q trap LC MS/MS System.
- Refrigerador para almacenar estándares intervalo entre - 20 y 0 °C.
- Refrigerador para almacenar muestras entre 2 y 8 °C.
- Balanza analítica de precisión $\pm 0,0001$ g, Sartorius.
- Baño de ultrasonido, Elma.
- Evaporador con corriente de nitrógeno de 18 posiciones, Barnstea.
- Manifold de extracción de 20 posiciones, Waters.
- Bomba de vacío.
- Vortex, VWR Scientific.
- Vortex Digital, Merck.
- Orbital, Seriker.
- Centrifuga de 6000 rpm refrigerada, IEC.
- Desionizador de agua, Simplicity

4.2.4 Soluciones estándares

- a) Solución stock individual de florfenicol, cloranfenicol, tianfenicol, cloranfenicol-d5 y florfenicol amina (1000 ppm): fueron pesados aproximadamente 10 mg de cada uno de los estándares, en una balanza analítica (precisión $\pm 0,0001$ g), arrastrados cada uno y disueltos

con un pequeño volumen de CH₃CN HPLC a cinco matraces de aforo de 10 mL, aforar hasta completar el volumen. Cada uno de estas soluciones fue refrigerada a temperatura menor o igual a 0 °C por un plazo máximo de 1 año.

- b) Soluciones intermedias de florfenicol, cloranfenicol, tianfenicol, cloranfenicol-d5 y florfenicol amina (100 ppm): fue tomada una alícuota de 1 mL de las soluciones stock de 1000 ppm de cada analito. Luego fueron agregadas las alícuotas en cinco matraces de aforo de 10 mL. Fue enrasado cada matraz con CH₃CN HPLC. Las soluciones resultantes fueron refrigeradas a una temperatura menor o igual a 0 °C por un plazo máximo de 6 meses.
- c) Solución de trabajo de florfenicol, cloranfenicol, tianfenicol, cloranfenicol-d5 y florfenicol amina (50 ppm): tomar una alícuota de 500 µL de cada solución intermedia de 100 ppm de cada analito y completar con 500 µL de Formiato de amonio 20 mM grado HPLC sobre un micro tubo Eppendorf. Estas soluciones deben ser refrigeradas a una temperatura inferior a 2 – 8 °C por un plazo máximo de 3 meses.
- d) Soluciones trabajo de florfenicol, cloranfenicol, tianfenicol y cloranfenicol-d5 (10 ppm, 1 ppm, 100 ppb y 10 ppb): fueron tomadas alícuotas de 1 mL de la solución intermedia de 100 ppm, solución de trabajo 10 ppm, 1 ppm y 100 ppb de cada analito, con el fin de obtener soluciones de trabajo de 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb y 10 ppb, respectivamente. Cada alícuota fue agregada a matraces de aforo de 10 mL. Luego fueron enrasadas con CH₃CN HPLC. Estas soluciones deben ser refrigeradas a una temperatura menor o igual a 0 °C por un plazo máximo de 3 meses.
- e) Solución multiestándar (10 ppb): tomar una alícuota de 100 µL de cada una de las soluciones de trabajo de 100 ppb y agregarlo sobre un micro tubo, completar volumen a 1 mL con CH₃CN HPLC. Esta solución debe ser refrigerada a una temperatura menor o igual a 0 °C por un plazo máximo de 3 meses.

4.3 Métodos

4.3.1 Cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masas – masas (LC–MS/MS).

Los analitos son ingresados al espectrómetro de masas, previo paso por la fuente de iones, el ingreso de éstos hacia la fuente puede darse a través de dos vías, una correspondiente a una infusión directa, por medio de una bomba de infusión y la otra por medio de una inyección y posterior separación cromatográfica a través del cromatógrafo líquido.

La Figura 6 ilustra los pasos a seguir para la realización de una metodología LC–MS/MS, se observan los diferentes modos en los que trabajó el espectrómetro de masas para la realización de esta metodología. El desarrollo de ésta, requirió inicialmente la obtención de los espectros de primer orden (ión molecular $[M-H]^-$, $[M+H]^+$) para cada analito, en el modo Q1 MS, estos iones están sujetos a parámetros de voltaje que maximizan su detección y minimizan la detección de interferentes que pueden ser resultados de la fase móvil. Los parámetros que se optimizaron para tales fines fueron Dp, Ep y Cep, en el modo Q1 MI. Una vez obtenidos los espectros de primer orden y optimizados los parámetros de voltaje, el ión molecular fue fragmentado, en el modo MS₂, mediante la aplicación de energías de colisión, observándose el patrón de fraccionamiento que posee éste y su espectro de segundo orden ($[M-H-X]^-$, $[M+H-X]^+$). Luego de la obtención de cada fragmento fueron optimizados los parámetros de fraccionamiento, en el modo MRM, correspondientes a CE y CXP, parámetros que maximizan la detección de tales fragmentos por sobre otros. En un paso final y mediante la utilización del cromatógrafo líquido, se realizó un FIA, con los fines de optimizar los parámetros de la fuente de iones, correspondientes a CAD, IS, GS1, GS2 y T°. La fuente de iones es el lugar donde ocurre la transmisión de líquido de la fase móvil a estado gaseoso, por lo tanto la optimización de estos parámetros permiten la correcta entrada de los analitos al espectrómetro de masas. En el Anexo I se encuentra en forma detallada la metodología utilizada en la obtención de los espectros de primer y segundo orden, optimización de los parámetros de voltaje y fraccionamiento y la optimización de la fuente de iones.

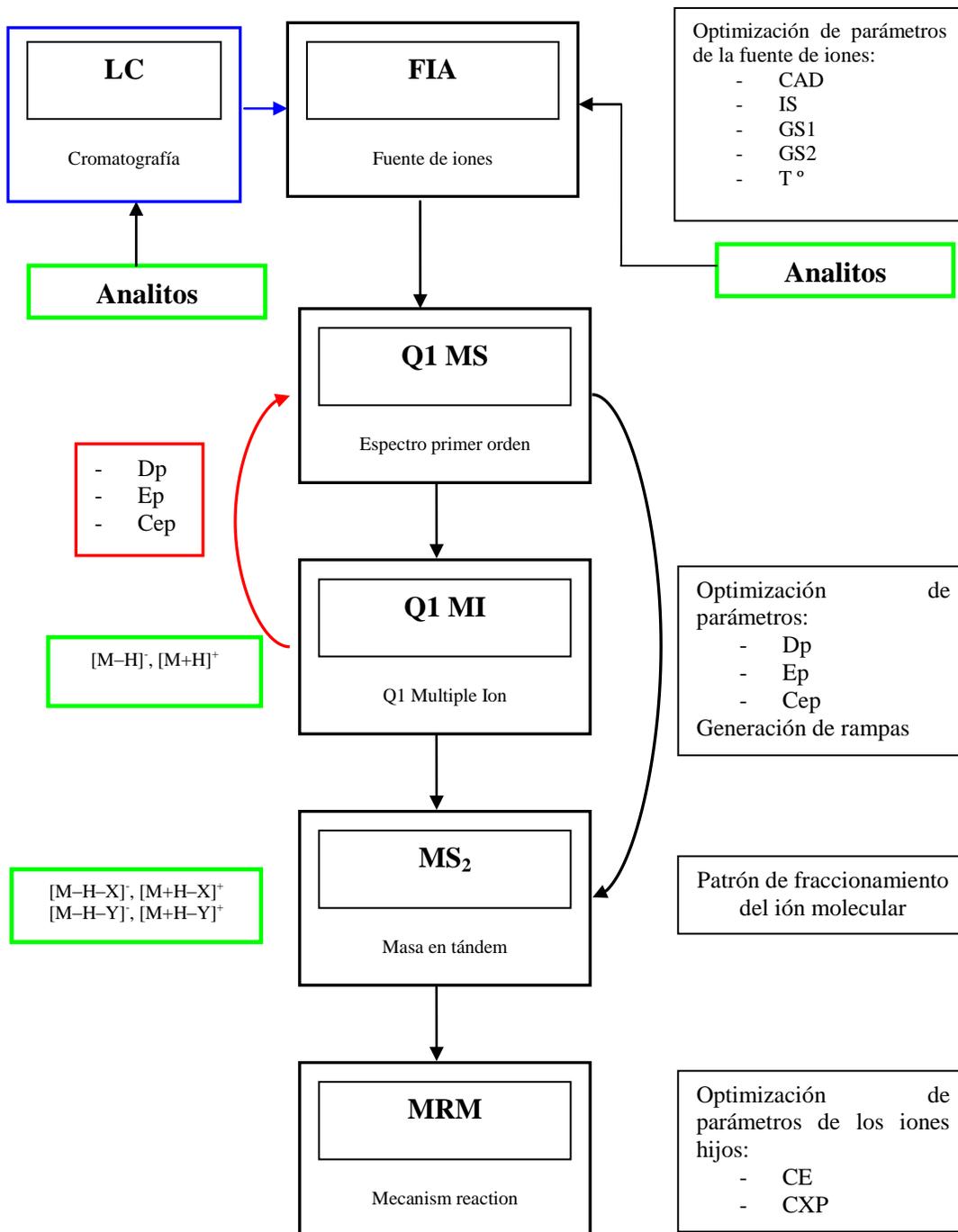


Figura 6: Obtención de espectros de primer y segundo orden, parámetros de fraccionamiento y optimización de fuente de iones.

4.3.1.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol.

Una vez obtenidos los parámetros óptimos de voltajes del espectrómetro y de las condiciones de la fuente de iones para cada una de las transiciones en el modo MRM de florfenicol, tianfenicol, cloranfenicol florfenicol amina y cloranfenicol-d5, se optimizó el comportamiento cromatográfico de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol, con el fin de detectar trazas de cloranfenicol y tianfenicol en productos veterinarios de florfenicol. Para estos fines se acopló al espectrómetro de masas el HPLC, de esta forma y mediante el uso de una columna cromatográfica, se obtuvieron los comportamientos cromatográficos de estos analitos.

La separación cromatográfica es un fenómeno que depende de tres participantes activos en el proceso de separación: el analito, la fase móvil y la fase estacionaria. De esta manera se estudiaron las condiciones de cada uno de estos participantes activos, con el fin de obtener la mejor separación cromatográfica.

4.3.1.1.1 Estudio del comportamiento cromatográfico de elución isocrática, modificador orgánico y aditivo de ionización.

Se estudió el comportamiento cromatográfico en modo isocrático, mediante el uso de diferentes composiciones de fase móvil. Se empleó una columna en fase inversa Sunfire C₁₈ de dimensiones 2.1 x 150 mm y de tamaño de partícula 3.5 µm, el volumen de inyección fue de 25 µL de una solución multiestándar de florfenicol, tianfenicol y cloranfenicol de 50 ppb (1.25 ng por inyección). La fase móvil consistió en agua HPLC y como modificador orgánico acetonitrilo, la composición varió de 70, 50, 30 y 10% de modificador orgánico, cada estándar fue preparado en cada una de estas composiciones. Una vez obtenida la mejor separación cromatográfica y a la vez la mayor intensidad de cuantificación de los analitos, se probó esa composición con otro modificador orgánico (metanol). Luego de haber seleccionado la composición y modificador orgánico, se estudió el comportamiento cromatográfico de los analitos con la inclusión de aditivos de ionización, mediante el uso de fases móviles que incluían 5 mM de acetato de amonio o 5 mM de formiato de amonio. El flujo de la fase móvil para todos los estudios fue de 0.25 mL/min con un tiempo para cada cromatograma de 40 minutos.

4.3.1.1.2 Estudio en gradiente de columnas cromatográficas y medio de inyección de los analitos.

Obtenido el mejor modificador orgánico y aditivo de ionización, se realizó un estudio cromatográfico de elución en gradiente, para la elección de la columna cromatográfica. De esta forma se evaluó cuatro distintas columnas cromatográficas en fase inversa, todas de un tamaño de partícula 3.5 μm . Los parámetros medidos fueron la intensidad del peak, tiempo de retención, ancho de peak y eficiencia de la columna. Las columnas cromatográficas estudiadas correspondieron a: Sunfire C₁₈ de dimensiones 2.1 x 150 mm, Eclipse XDB C₁₈ 2.1 x 150 mm, ODS-4 2.1 x 150 mm y finalmente una columna Xterra C₁₈ 2.1 x 100 mm. El gradiente utilizado queda detallado en la Tabla 5. Posterior a la elección de la columna cromatográfica se estudió el medio de inyección de los analitos, correspondientes a las proporciones acetonitrilo/agua 70/30, 50/50, 30/70 y 10/90.

Tabla 5: Gradiente utilizado para la generación de la fase móvil.

Tiempo (min)	Fase orgánica	Fase acuosa
0	10	90
1,5	100	0
3,5	100	0
4,5	10	90
15	10	90

4.3.2 Validación de metodología para la determinación de impurezas de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos que contienen florfenicol.

Se procedió a validar la metodología, considerando una impureza de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos de florfenicol como principio activo a un nivel de $1 \times 10^{-4}\%$. La metodología fue validada de acuerdo a los criterios de funcionamiento de métodos analíticos declarados en la Decisión de la Comisión de la Unión Europea, siendo éstos: linealidad (curva de calibración), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud,

veracidad, incertidumbre, sensibilidad y límite de detección. El detalle de la validación se encuentra en el Anexo II.

4.3.3 Análisis de muestras de productos farmacéuticos de uso veterinario que contienen florfenicol como principio activo.

El método validado para la determinación de cloranfenicol en productos farmacéuticos de florfenicol, fue utilizado para el análisis de las muestras reales de dichos productos. Este método validado comprende la optimización de la detección por espectrometría de masas, el método cromatográfico y el tratamiento de muestra planteado, es decir bajo la consideración de una impureza de cloranfenicol al nivel de $1 \times 10^{-4}\%$.

Los ensayos consideraron el estudio de materias primas y productos farmacéuticos terminados, detallados en la Tabla 4, siendo realizados dos set por cada muestra. Fueron pesados aproximadamente 10 mg para las muestras de materia prima y 20 mg para las muestras de productos farmacéuticos terminados, ya que estos están preparados en base a un 50% de florfenicol como principio activo, luego fueron traspasados cuantitativamente hacia matraces aforados de 10 mL, con una pequeña cantidad de acetonitrilo/agua 30/70, posteriormente se agregó una alícuota de 1000 μL de una solución de cloranfenicol- d_5 1000 ng/mL y aforados los matraces en el mismo vehículo. Las muestras se homogeneizaron por agitación y además se les aplicó energía de ultrasonido por 5 minutos. Luego se tomó una alícuota de 100 μL de cada una de las soluciones de las muestras y fueron llevadas a un matraz de aforo de 10 mL, cada muestra fue también aforada en el mismo vehículo utilizado anteriormente. Además se realizó la preparación de un control positivo de cloranfenicol a un nivel de 1 ng/mL y florfenicol de concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, pesando 10 mg de florfenicol, que fue disuelto con una pequeña cantidad de acetonitrilo/agua 30/70 y traspasado cuantitativamente a un matraz aforo de 10 mL, posteriormente se le agregó una alícuota de 1000 μL de una solución de cloranfenicol 1000 ng/mL y una alícuota de 1000 μL de una solución de cloranfenicol- d_5 1000 ng/mL y aforado en el mismo vehículo, posteriormente se homogenizó por agitación y se le aplicó energía de ultrasonido por 5 minutos. Luego fue tomada una alícuota de 100 μL de esta solución y llevada a un matraz de aforo de 10 mL. Finalmente las muestras obtenidas y el control positivo fueron

filtrados en membrana de 0,22 μm y depositados en viales previamente rotulados para realizar el análisis instrumental por LC–MS/MS.

Además se incluyó la realización de una curva de calibrado externa de cloranfenicol en concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 3 ng/mL, siendo utilizado cloranfenicol- d_5 como estándar interno en concentración 1 ng/mL para cada uno de los puntos estudiados. La realización de las soluciones utilizadas en la curva de calibrado están detalladas en la Tabla 6.

Tabla 6: Curva de calibración externa de cloranfenicol.

Solución de trabajo cloranfenicol ng/mL	Alícuota a tomar μL de cloranfenicol	Cantidad de solución (mL)	Concentración cloranfenicol ng/mL	Alícuota a tomar μL de cloranfenicol- d_5 (100 ng/mL)	Concentración cloranfenicol- d_5 ng/mL
10	125	5	0.25	500	1
10	250	5	0.5	500	1
10	375	5	0.75	500	1
10	500	5	1	500	1
10	1000	5	2	500	1
10	1500	5	3	500	1

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masas – masas.

5.1.1 Espectros de primer orden, segundo orden y parámetros de fraccionamiento.

5.1.1.1 Espectros de primer orden.

En la Tabla 7 se presentan los resultados de los espectros de primer orden obtenidos para cada analito, tanto en el modo ESI⁻ como en el modo ESI⁺. En dicha tabla se presentan los pesos moleculares y la relación m/z encontrada para cada uno de los analitos.

Tabla 7: Pesos moleculares y relaciones m/z obtenidos en los espectros de primer orden.

Analito	Peso molecular (g/mol)	Ion padre (m/z)	Modo ESI
FF	357	356	ESI ⁻
CAP	322	321	ESI ⁻
TAP	355	354	ESI ⁻
CAP - d5	327	326	ESI ⁻
FFA	247	248	ESI ⁺

Se comprueba allí que los analitos estudiados bajo el modo ESI⁻ presentan la pérdida de una unidad de masa de protón respecto de sus pesos moleculares, mientras que el florfenicol amina estudiado bajo el modo ESI⁺ presenta el aumento de una unidad de masa de protón respecto a su peso molecular. Estos datos obtenidos son semejantes a los expresados en un estudio realizado en 2008 por Jianzhong Shen y cols. los cuales están presentes en la Figura 7.

Analyte	t _R (min)	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Mode
CAP	8.46	321	152 ^a	25	15	ESI-
			257	25	12	
TAP	6.55	354	185 ^a	36	18	ESI-
			290	36	11	
FF	8.18	356	185	28	15	ESI-
			336 ^a	28	11	
FFA	1.53	248	130	25	20	ESI+
			230 ^a	25	15	
d ₅ -CAP	8.43	326	157 ^a	35	15	ESI-

Figura 7: Resumen de estudio realizado por Jianzhong Shen y cols. Donde Cone voltage corresponde a Dp.

En la Figura 8 se presenta el espectro de primer orden de florfenicol.

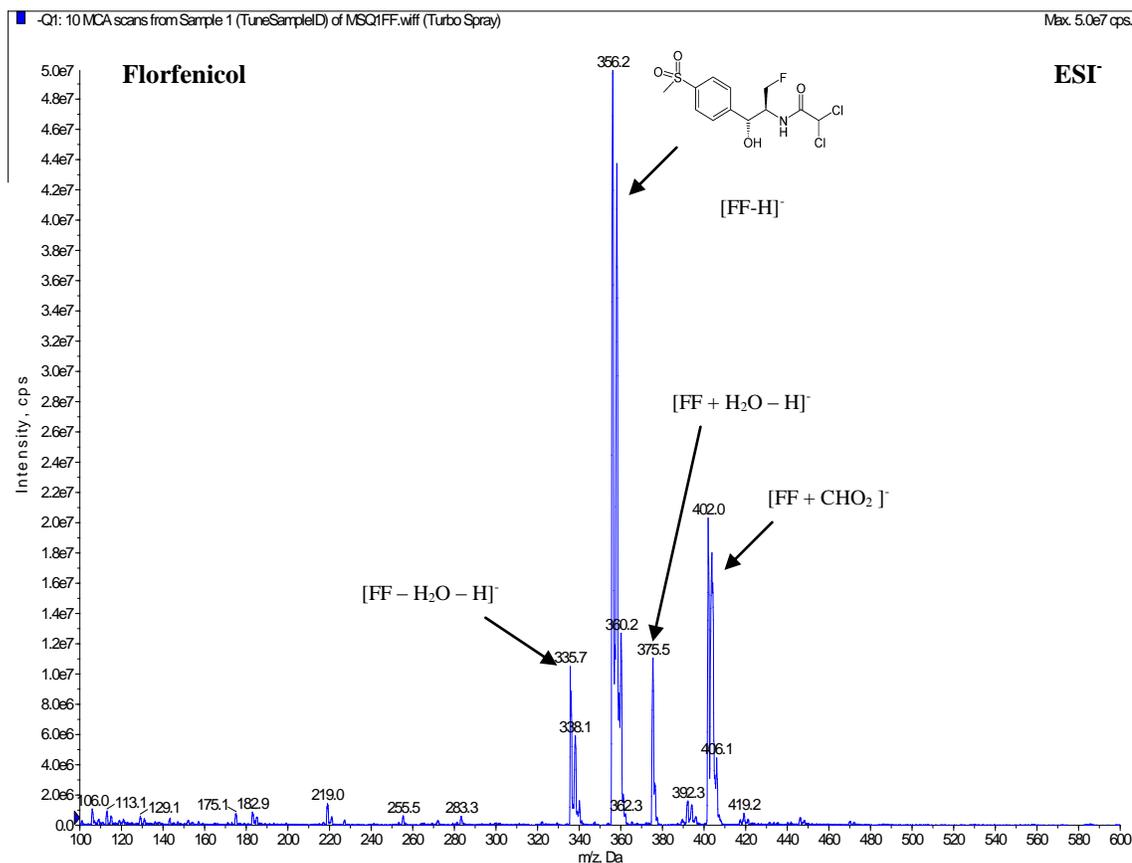


Figura 8: Espectro de primer orden de florfenicol.

Se observa que la relación m/z igual a 356.2 Da presenta la mayor intensidad igual a 5.0×10^7 cps, éste corresponde al ión molecular de florfenicol, es decir, al peso molecular de

florfenicol menos una unidad de protón $[\text{FF}-\text{H}]^-$. Además se observa la existencia de isótopos de cloro dentro de la especie molecular de florfenicol, generando una relación m/z de 360.2 Da con una intensidad de 1.2×10^7 que indica la presencia de dos especies ^{37}Cl por sobre las dos especies ^{35}Cl , generando el aumento de esas 4 unidades de masa respecto al ión molecular, también se observa una especie de peso intermedio en que sólo existe una especie de ^{37}Cl . Por otra parte se observa un fragmento de florfenicol, representado en m/z igual 335.7 Da, que corresponde a la pérdida de 18 unidades de masa, correspondientes a una molécula de agua $[\text{FF}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, donde la intensidad de este ión es 5 veces menor a la de $[\text{FF}-\text{H}]^-$. La unión de agua es una unión energéticamente débil que, influenciada sólo por la ionización, se fragmenta provocando la presencia de esta especie. En m/z igual a 375.5 Da se observa la formación de un aducto de florfenicol con agua $[\text{FF}+\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, de intensidad similar al originado en la pérdida de agua, además se observa la formación de un aducto con formiato en m/z igual a 402.0 Da $[\text{FF}+\text{CHO}_2]^-$, donde la carga negativa del aducto la confiere el formiato (CHO_2^-).

En la Figura 9 se presentan los espectros de primer orden de los otros analitos, destacamos que las especies que ionizan en modo negativo generan intensidades para la especie $[\text{M}-\text{H}]^-$ en el mismo orden de magnitud, la especie $[\text{M}+\text{H}]^+$ del florfenicol amina en modo positivo es levemente superior en intensidad.

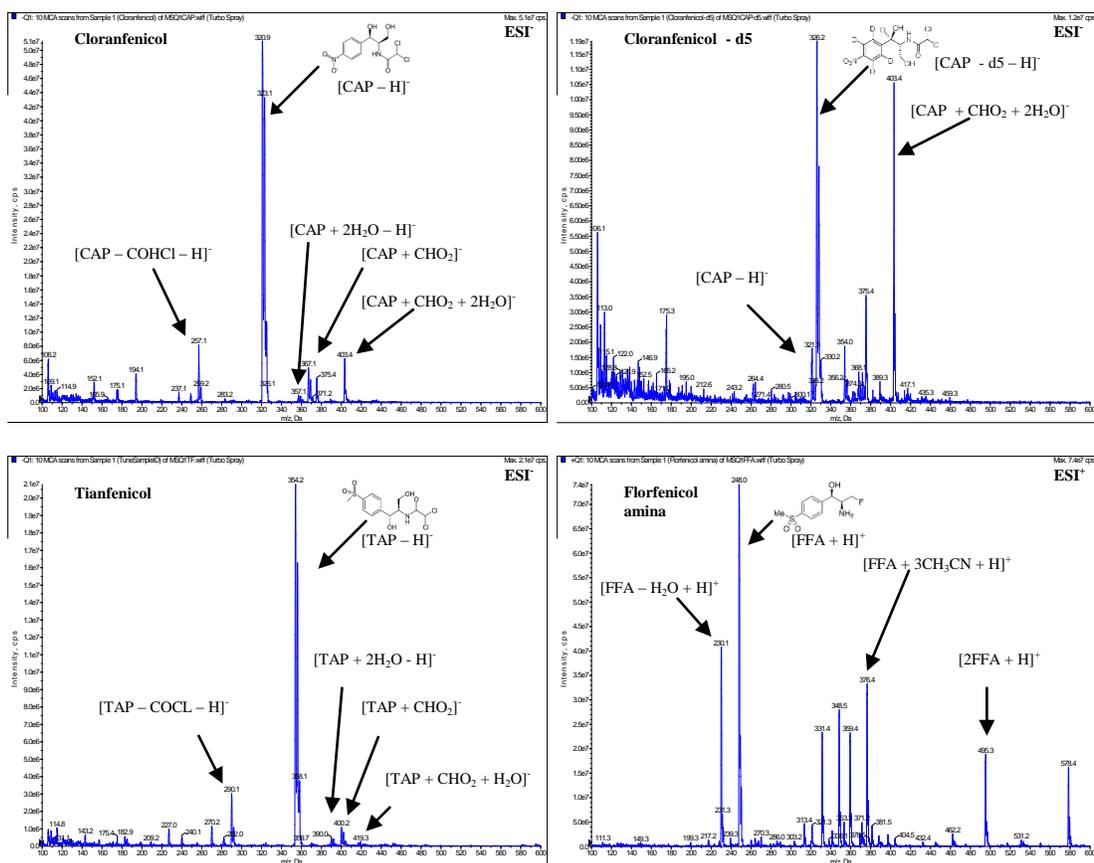


Figura 9: Espectros de primer orden de CAP, CAP – d5, TAP y FFA.

En el espectro correspondiente a cloranfenicol se observa una relación m/z de 320.9 Da con una intensidad de 5.1×10^7 cps, correspondiente a la especie molecular [CAP-H]⁻, se observa además la existencia de isótopos de cloro dentro de su especie molecular, generando una relación m/z de 323.1 Da de una intensidad de 4.4×10^7 cps y otra relación m/z de 326.1 Da de intensidad 1.2×10^7 cps. Estos son generados por la presencia de, ya sea uno o bien dos ³⁷Cl en la especie molecular por sobre el ³⁵Cl. Por otra parte se observa al menos un fragmento de cloranfenicol correspondiente a la señal m/z 257.1 Da generado por la pérdida de un grupo COHL [CAP-COHL-H]⁻ de intensidad 8.0×10^6 cps, fragmento que es generado a partir de la ionización del analito. Se observa en m/z igual a 357.1 Da la formación de un aducto de cloranfenicol con dos moléculas de agua [CAP+2H₂O-H]⁻, también se observa en m/z igual a 371.2 Da un aducto de cloranfenicol con formiato [CAP+CHO₂]⁻, similar al observado en el

florfenicol, por último se observa la formación de un aducto de cloranfenicol con un formiato y dos moléculas de agua ($[\text{CAP}+\text{CHO}_2+2\text{H}_2\text{O}]^-$), con m/z igual a 403.4 Da.

El espectro de cloranfenicol-d5 muestra una relación m/z de 326.2 Da correspondiente al ión molecular $[\text{CAP-d5-H}]^-$ con una intensidad de 1.19×10^7 cps, al igual que los analitos anteriores presenta la existencia de isótopos de cloro dentro de su especie molecular, también provocados por la presencia de ^{37}Cl por sobre ^{35}Cl . El cloranfenicol-d5 es un enriquecido de cloranfenicol con deuterio, lo que determina la presencia de cloranfenicol en m/z igual a 321.3 Da, pero con una baja intensidad. Se observan también formación de aductos de cloranfenicol (no enriquecido) con formiato y dos moléculas de agua $[\text{CAP}+\text{CHO}_2+2\text{H}_2\text{O}]^-$ en m/z igual a 403.4 Da.

En el espectro de tianfenicol se observa un m/z de 354.2 Da correspondiente al ión molecular $[\text{TAP-H}]^-$ con una intensidad de 2.1×10^7 cps, presentando también isótopos de cloro dentro de su especie molecular. Se observa además un fragmento de m/z igual 290.1 Da generado por la pérdida de un grupo COCl generando la especie $[\text{TAP-COCl-H}]^-$. La formación de aductos está dada por agua $[\text{TAP}+2\text{H}_2\text{O-H}]^-$, formiato $[\text{TAP}+\text{CHO}_2]^-$ y la combinación de ambos $[\text{TAP}+\text{CHO}_2+\text{H}_2\text{O}]^-$, dando como resultados en m/z 390.0, 400.2 y 419.3 Da respectivamente.

El m/z del ión molecular de florfenicol amina fue de 248.0 Da $[\text{FFA}+\text{H}]^+$ de intensidad 7.4×10^7 cps. En comparación a los analitos anteriores, el florfenicol amina no posee en su estructura cloro, por lo que en su espectro no se observan especies moleculares con isótopos de cloro. Además se observa la pérdida de 18 unidades de masa correspondientes a la pérdida de una molécula de agua que genera un m/z de 230.1 Da con intensidad 4.0×10^7 cps. Dado que la unión de agua es energéticamente débil, ésta puede perderse en el proceso de ionización. En este caso la formación de aductos se genera con acetonitrilo $[\text{FFA}+3\text{CH}_3\text{CN}+\text{H}]^+$ con un m/z igual a 371.2 Da y además la formación de un dímero $[\text{2FFA}+\text{H}]^+$ en m/z igual a 495.3 Da.

En la Tabla 8 se encuentran resumidas las especies de los iones moleculares, fragmentos representativos y aductos de cada analito.

Tabla 8: Resumen de los iones moleculares, fragmentos y aductos de cada analito. En negrita las especies moleculares con mayor intensidad.

Analito	Ión padre	Especies moleculares
FF	[FF-H] ⁻	[FF-H₂O-H]⁻ , [FF+CHO ₂] ⁻ , [FF+H ₂ O-H] ⁻
CAP	[CAP-H] ⁻	[CAP-COHC1-H]⁻ , [CAP+CHO ₂] ⁻ , [CAP+CHO ₂ +2H ₂ O] ⁻
CAP - d5	[CAP-d5-H] ⁻	[CAP+CHO ₂] ⁻ , [CAP+CHO₂+2H₂O]⁻
TAP	[TAP-H] ⁻	[TAP-COCl-H]⁻ , [TAP+CHO ₂] ⁻ , [TAP+2H ₂ O-H] ⁻
FFA	[FFA+H] ⁺	[FFA-H₂O+H]⁺ , [FFA+3CH ₃ CN+H] ⁺ , [2FFA+H] ⁺

Se puede observar que los analitos estudiados bajo el modo ESI⁻ forman de manera semejante aductos con formiato y con agua. Por otra parte en el modo ESI⁺ se observa la formación de un aducto con acetonitrilo y con el propio analito [2FFA+H]⁺.

Una vez obtenidos los iones moleculares para cada analito, se procedió a la optimización de los parámetros de voltaje en el modo Q1 MI.

El primer parámetro que se optimizó fue Dp, mediante la construcción de una rampa de voltaje. El máximo o mínimo obtenido según el modo de ionización, indica el valor óptimo de Dp para el ión molecular destinado con fines cualitativos y/o cuantitativos. Una vez optimizado Dp se ingresó este valor en las condiciones individuales para cada analito y se prosiguió con el siguiente parámetro a optimizar que corresponde a Ep. Para la optimización de Ep y Cep, se generaron rampas de voltaje de Ep y Cep, similares a la obtenida en Dp. Los valores óptimos de Ep y Cep también son reemplazados para cada analito. En la Figura 10 se presentan las rampas de Dp, Ep y Cep para el florfenicol.

Florfenicol

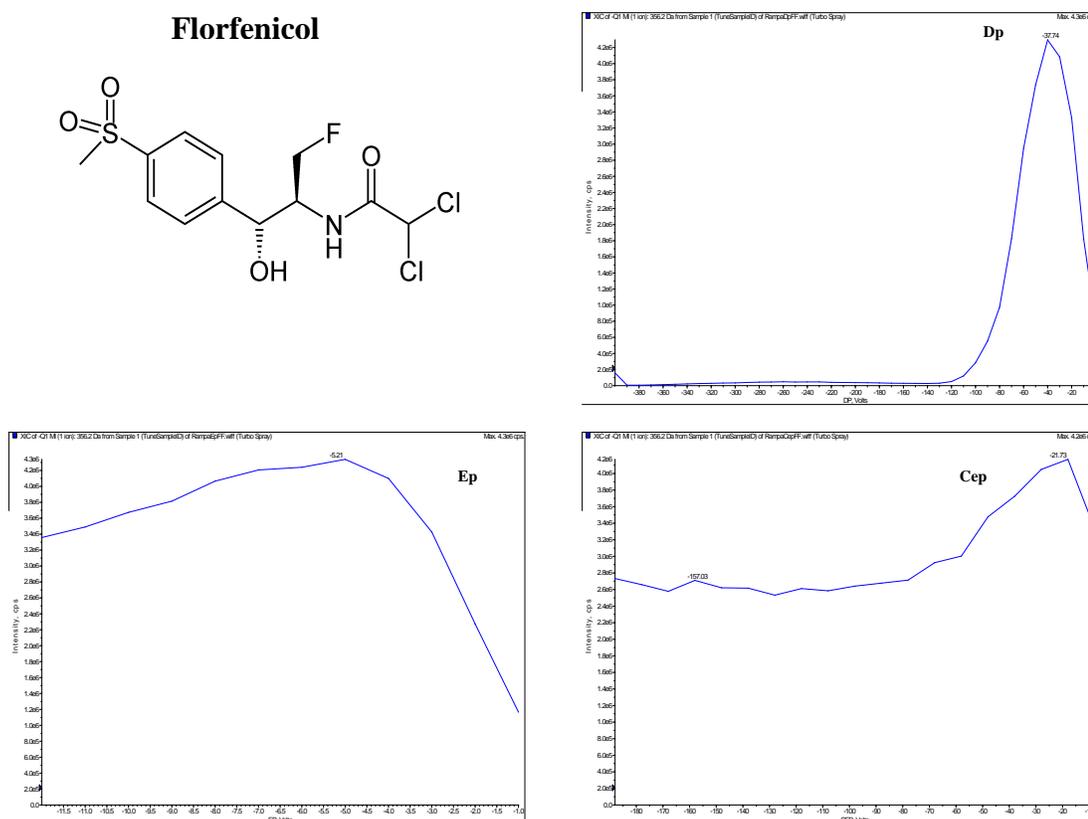
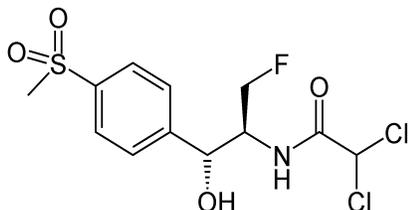


Figura 10: Rampas de voltaje de los parámetros Dp, Ep y Cep del FF.

En la figura se observa el barrido de Dp que se realiza en el intervalo entre los -400 a 0 volts. Se observa en la rampa de Dp, que en valores altamente negativos la intensidad del ión molecular es 0 o cercana a 0 y recién cuando el Dp tiene un valor de -120 volts la intensidad del ión molecular aumenta a 2.0×10^5 cps, este valor se duplica cuando el Dp tiene un valor de -90 volts, y cuando el Dp tiene un valor de -60 volts la intensidad del ión molecular ha sido multiplicado ya unas 17 veces (3.4×10^6 cps), bajo estas condiciones la rampa sugiere un comportamiento exponencial de la intensidad, respecto al aumento de voltaje de Dp. El punto máximo de intensidad del ión molecular ocurre a los -38 volts siendo igual a 4.3×10^6 cps, este punto es el valor óptimo de Dp, es decir, a este voltaje se permite la mayor entrada del ión molecular al orifice plate del espectrómetro, por esta razón la intensidad es mayor. Del mismo modo se optimizan los valores de Dp para los demás analitos. En el caso del florfenicol amina el barrido es entre 0 y +400 volts en modo positivo.

El barrido de E_p de los analitos se realiza en el intervalo entre -12 a 0 volts. La intensidad del ión molecular aumenta a medida que el E_p aumenta hasta su valor óptimo, por ejemplo en el florfenicol, cuando E_p es igual a -12 volts la intensidad es 3.4×10^6 cps mientras que a -9 volts la intensidad es igual a 3.8×10^6 cps. El valor óptimo de E_p para el florfenicol fue de -5 volts con una intensidad del ión molecular de 4.3×10^6 cps, en este valor los iones son focalizados dentro del espectrómetro, hacia una región de alto vacío. Posterior al valor óptimo de E_p , la intensidad del ión molecular cae rápidamente, por ejemplo cuando E_p es igual a -3 volts la intensidad del ión molecular posee un valor de 3.4×10^6 cps, ya a -2 volts posee una intensidad cercana a 2.2×10^6 cps. Del mismo modo se optimiza este parámetro para cada uno de los demás analitos. En el caso de florfenicol amina la rampa de E_p se construye entre 0 y +12 volts.

La rampa de C_{ep} posee un intervalo entre -190 y -10 volts. Se observa que la intensidad del ión molecular se mantiene entre 2.6×10^6 y 2.8×10^6 cps durante el intervalo entre -190 a -80 volts, desde ese voltaje comienza a aumentar hasta llegar a un máximo que es el valor óptimo de C_{ep} . A -50 volts la intensidad es de 3.2×10^6 cps, a -30 volts la intensidad es 3.9×10^6 cps y el valor óptimo de C_{ep} para el florfenicol ocurre a los -21 volts con una intensidad de 4.2×10^6 cps. A este valor de C_{ep} se optimiza la entrada de los iones a la celda de colisión. A partir del valor óptimo de C_{ep} , el aumento en voltaje de C_{ep} se traduce en un descenso de la intensidad del ión molecular. De la misma forma se optimiza C_{ep} para los demás analitos. Para el florfenicol amina la rampa de C_{ep} se construye desde 0 a +190 volts.

En la Tabla 9 se pueden observar los valores óptimos de los parámetros de voltaje del ión molecular de cada analito.

Tabla 9: Valores de Dp, Ep y Cep para cada analito.

Analito	Dp (volts)	Ep (volts)	Cep (volts)	Peso molecular (g/mol)
FF	- 38	- 5	- 21	357
CAP	- 28	- 7	- 20	322
TAP	- 40	- 8	- 20	355
CAP - d5	- 29	- 8	- 21	327
FFA	+ 33	+ 8	+ 19	247

Observamos que los analitos ionizados en el modo negativo presentan valores de Dp óptimos entre -28 y -40 Volts. El florfenicol y tianfenicol presentan valores de Dp similares y proporcionales con sus pesos moleculares, tal comportamiento también es observado en compuestos de estructura análoga como el cloranfenicol y el cloranfenicol-d5. El menor valor de Dp (-28 volts) corresponde a cloranfenicol siendo esto consecuencia de poseer el menor peso molecular de estos analitos. Se observa que el florfenicol amina, único analito ionizado en forma positiva, presenta un valor absoluto de Dp menor que el FF, consistente con el peso molecular que posee, aunque entre ellos poseen una similitud estructural, lo que comprueba que el Dp es un parámetro que es afectado en mayor magnitud por el peso molecular del analito en comparación con su estructura.

Se observa en la tabla que los analitos no poseen una gran diferencia en el valor de Ep, la mayor diferencia ocurre entre el FF y los demás analitos, esto se debe a que el FF es el que posee mayores cambios estructurales respecto a los demás, posee un grupo metilsulfonil en el anillo y un flúor en la cadena lateral, lo que tiene influencia sobre la medida de este parámetro. Por otra parte CAP y CAP-d5, que son análogos estructurales, poseen una diferencia de una unidad de volts, esto puede deberse a la influencia de los hidrógenos o de los deuterios. Este voltaje guía y focaliza los iones dentro de Q0, por lo que para analitos de semejanza estructural este voltaje no debiese variar en gran medida.

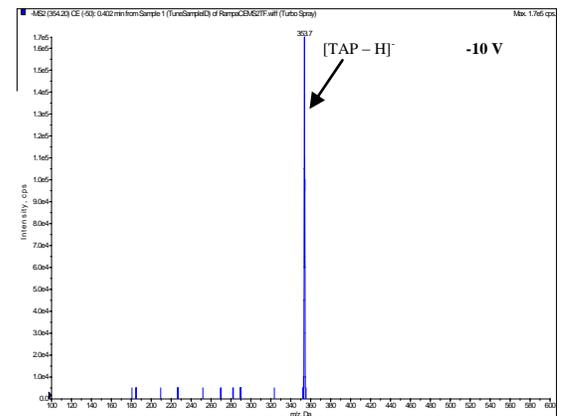
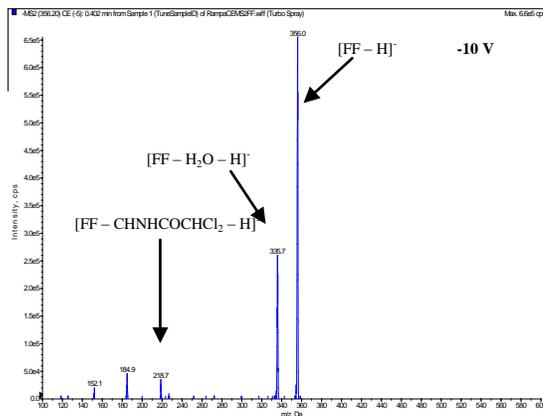
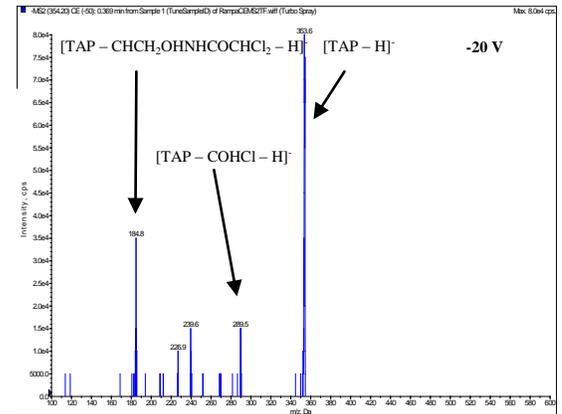
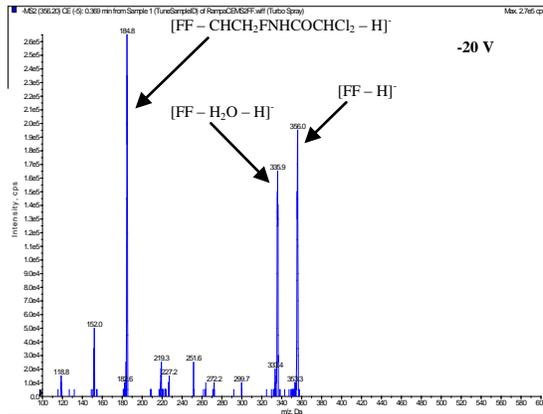
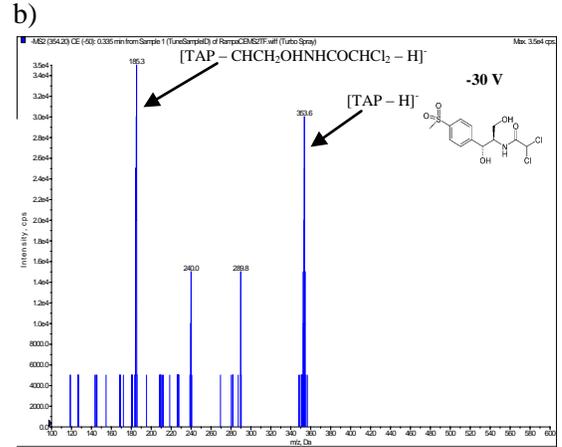
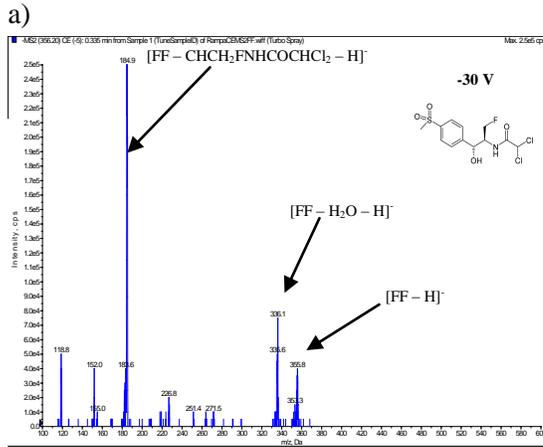
Para los valores de Cep se observa que no posee mayores diferencias entre los analitos. En este punto los analitos ya han entrado a Q0, por lo que la diferencia de potencial que exista entre

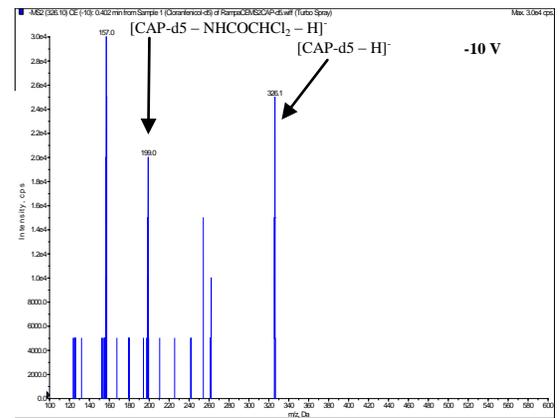
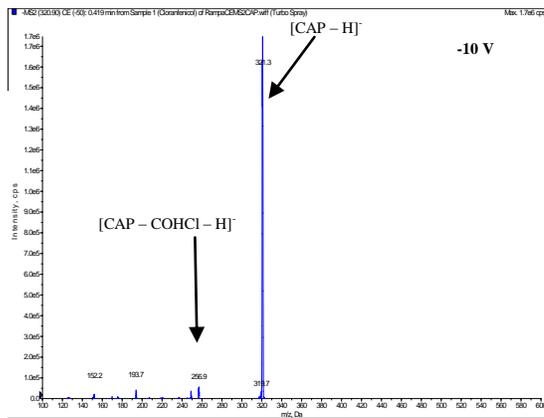
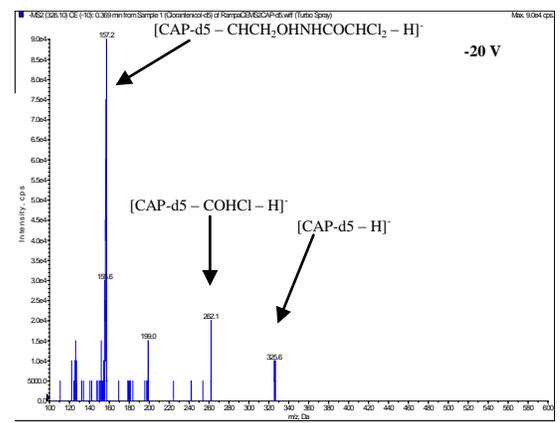
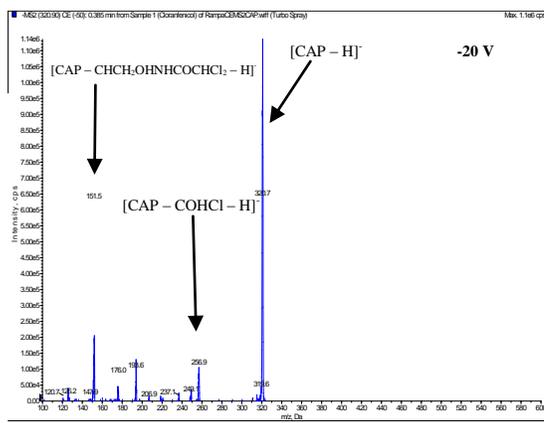
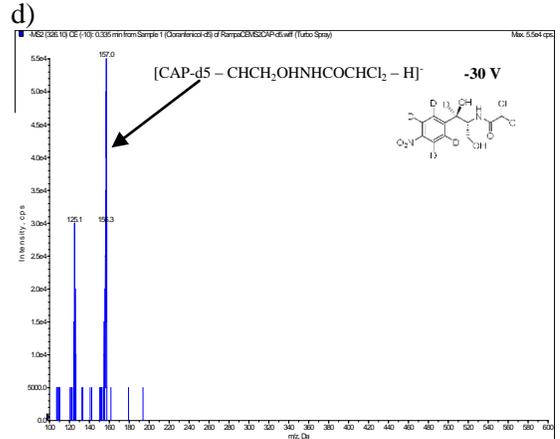
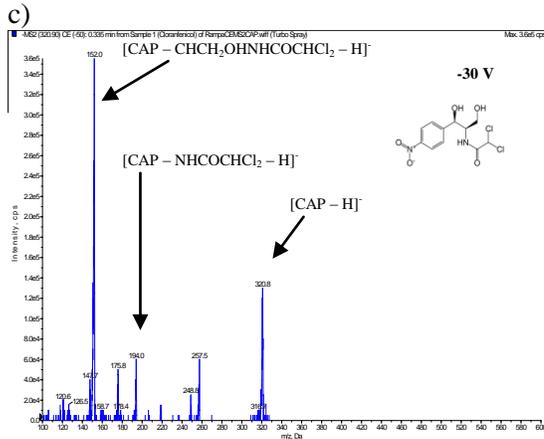
este punto e IQ2 en teoría siempre será más o menos similar, ya que los analitos ya han pasado por los mayores cambios de voltaje, de vacío y además poseen similitud estructural.

De manera general, se observa que los valores de Dp poseen una mayor diferencia entre los analitos en comparación con los valores de Ep y Cep, esto se debe a que Dp es afectado en mayor magnitud por el peso molecular de los analitos, no así Ep y Cep que son afectados por las estructuras de los analitos, que en este caso son medianamente similares con algunos cambios de sustituyentes.

5.1.1.2 Espectros de segundo orden

En el modo MS₂ se obtienen los espectros de segundo orden, mediante la construcción de una rampa de CE para cada analito, es decir, se realiza un barrido de energía de colisión desde -130 a -5 volts para los analitos estudiados bajo ESI⁻ y +5 a +130 volts para el FFA estudiado bajo ESI⁺, los distintos valores de CE fragmentan los iones moleculares de cada analito y de esta forma se obtienen los espectros de segundo orden. La Figura 11 corresponde a los espectros de segundo orden de todos los analitos a los valores de CE para ESI⁻ de -30, -20 y -10 volts y para ESI⁺ de +30, +20 y +10 volts.





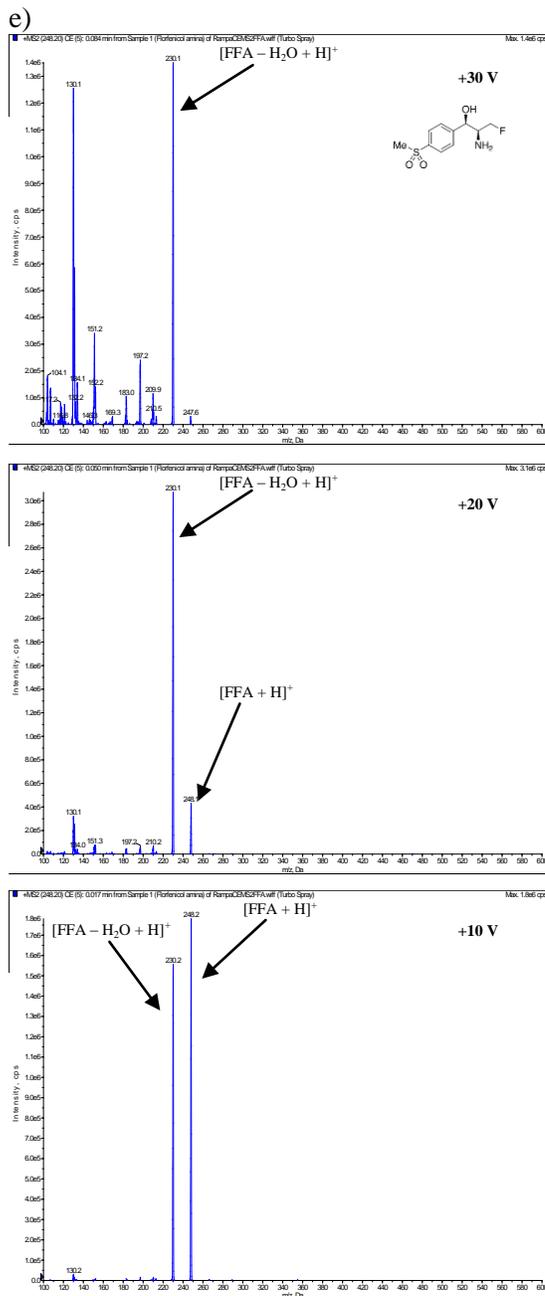


Figura 11: Espectros de segundo orden de: a) florfenicol b) tianfenicol, c) cloranfenicol, d) cloranfenicol-d5 y e) florfenicol amina extraídos desde la rampa de CE de cada uno de ellos.

En la figura se observa que la fragmentación del ión molecular del florfenicol $[FF-H]^+$, dentro de todos los valores de CE mostrados, muestran la presencia de la relación m/z igual a 336 Da, que es generada por la pérdida de una molécula de agua $[FF-H_2O-H]^+$, esto se debe a

que la fuerza de la unión oxígeno-carbono es débil, por ejemplo cuando la energía de colisión es igual a -10 volts se observa la mayor intensidad de esta transición igual a 2.5×10^5 cps, luego a -20 volts la intensidad de esta transición disminuye a 1.7×10^5 y en -30 volts la intensidad disminuye a la mitad siendo igual a 8.0×10^4 cps, esto se debe a la disminución en intensidad del ión molecular por el aumento del fraccionamiento de éste, además la energía de colisión con una mayor magnitud genera fraccionamientos de uniones más fuertes o resistentes. Se observa también la presencia de la relación m/z 185 Da correspondiente al ión $[\text{FF}-\text{CHCH}_2\text{FNHCOCHCl}_2-\text{H}]^-$, que a -10 volts alcanza una intensidad de 5.0×10^4 cps, mientras que la intensidad es igual para valores superiores o iguales a -20 volts siendo 2.7×10^5 cps, lo que demuestra una fuerte resistencia que ofrece la unión del carbono de la cadena dicloroacetamida y el carbono metilbenceno.

Para el tianfenicol se observa en todos los valores de la energía de colisión la presencia del ión molecular $[\text{TAP}-\text{H}]^-$, cuando la energía de colisión es igual a -30 volts la intensidad de este ión es 3.0×10^4 cps, mientras que a -20 volts la intensidad es 8.0×10^4 cps, presentándose la mayor intensidad de este ión cuando la energía de colisión es -10 volts alcanzando una intensidad de 1.7×10^5 cps. A diferencia del florfenicol se observa que la fragmentación del ión molecular ocurre a valores superiores a -20 volts, provocado por la estabilidad de la molécula de tianfenicol respecto al florfenicol, por ejemplo a los valores de la energía de colisión -30 y -20 volts se observa la presencia de la relación m/z 290 Da correspondiente a la transición $[\text{TAP}-\text{COHCl}-\text{H}]^-$ donde su intensidad se encuentra en 1.5×10^4 cps, este fenómeno también ocurre con la relación m/z 185 Da correspondiente a $[\text{TAP}-\text{CHCH}_2\text{OHNHCOCHCl}_2-\text{H}]^-$ que a esos valores de la energía de colisión posee una misma intensidad de 3.5×10^4 cps. Además se observa también que los espectros de segundo orden de tianfenicol poseen una intensidad baja y son espectros más discretos.

Los espectros de segundo orden de cloranfenicol muestran un comportamiento semejante al del florfenicol, donde la presencia del ión molecular $[\text{CAP}-\text{H}]^-$ disminuye a medida que la energía de colisión en magnitud aumenta, esto se observa a -10 volts donde la intensidad de este ión es de 1.7×10^6 , luego a -20 volts la intensidad del ión es 1.14×10^6 cps, mientras que a -30 volts la intensidad del ión disminuye hasta 1.4×10^5 cps, este fenómeno se produce por el aumento del fraccionamiento del ión molecular y la posterior aparición de fragmentos más

estables energéticamente. Se observa que el fragmento $[\text{CAP-CHCH}_2\text{OHNHCOCHCl}_2\text{-H}]^-$ correspondiente a la relación m/z igual a 152 Da aumenta en intensidad a medida que aumenta la energía de colisión en magnitud, cuando el valor de la energía de colisión es -10 volts la intensidad de este ión es inferior a 1.0×10^5 cps, mientras que a -20 volts la intensidad aumenta a 2.0×10^5 cps, generando a -30 volts una intensidad de este ión de 3.6×10^5 cps. También se observa un fragmento de relación m/z igual a 257 Da correspondiente al ión $[\text{CAP-COHCl-H}]^-$, que posee una intensidad cuando la energía de colisión es igual a -10 volts menor a 1.0×10^5 cps, aumentando a 1.0×10^5 cps cuando la energía de colisión es igual a -20 volts, disminuyendo posteriormente a 6.0×10^4 cps en energía de colisión igual a -30 volts. Cuando la energía de colisión posee un valor de -30 volts, se observa la presencia de la relación m/z igual a 194 Da correspondiente al ión $[\text{CAP-NHCOCHCl}_2\text{-H}]^-$, que genera una intensidad de 6.0×10^4 cps, este ión es resultado de una alta energía de colisión que mejora y produce una mayor fragmentación de los iones estables o de las uniones de alta energía.

El espectro de cloranfenicol-d5 muestra la presencia del ión molecular $[\text{CAP-d5-H}]^-$ en una baja intensidad, cuando la energía de colisión es igual a -10 volts la intensidad es de 2.5×10^4 cps, a -20 volts presenta una intensidad de 1.0×10^4 cps, mientras que a -30 volts no se observa la presencia de este ión, probablemente la resistencia a la energía de colisión por parte de este analito se ve desfavorecida por la presencia de deuterios, que le confieren estabilidad a la molécula frente a la fragmentación. Dada la semejanza del cloranfenicol-d5 con el cloranfenicol, se observan fragmentaciones parecidas, por ejemplo la presencia de la relación m/z igual a 157 Da correspondiente al ión $[\text{CAP-d5-CHCH}_2\text{OHNHCOCHCl}_2\text{-H}]^-$, este ión cuando la energía de colisión posee un valor de -10 volts la intensidad para él es de 3.0×10^4 cps, para -20 volts la intensidad aumenta hasta 9.0×10^4 cps, descendiendo a 5.5×10^4 cps cuando la energía de colisión es igual a -30 volts. Otro ión semejante es el de m/z igual a 199 Da correspondiente al ión $[\text{CAP-d5-NHCOCHCl}_2\text{-H}]^-$, que presenta una intensidad de 2.0×10^4 cps cuando la energía de colisión es igual a -10 volts, mientras que cuando la energía de colisión es igual a -20 volts presenta una intensidad de 1.5×10^4 cps. También se observa la presencia de otro ión semejante de 262 Da que corresponde al ión $[\text{CAP-d5-COHCl-H}]^-$, que presenta una intensidad de 2.0×10^4 cps cuando el valor de energía de colisión es igual a -20 volts.

En el espectro de segundo orden de florfenicol amina se observa que el ión molecular $[\text{FFA}+\text{H}]^+$ de relación m/z 248 Da presenta una alta intensidad, cuando la energía de colisión es igual a +10 volts la intensidad es de 1.8×10^6 cps, esta intensidad disminuye cuando la energía de colisión aumenta a +20 volts, siendo esta de 4.0×10^5 cps, finalmente a +30 volts no se observa la presencia de este ión que fue fragmentado totalmente. Se observa también la presencia de un ión de m/z igual a 230 Da correspondiente a la pérdida de una molécula de agua $[\text{FFA}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, este ión posee una intensidad de 1.55×10^6 cps cuando la energía de colisión es igual a +10 volts, también está presente a +20 volts con una intensidad de 3.1×10^6 cps para luego descender a 1.4×10^6 cps cuando la energía de colisión es +30 volts, comportamiento que también fue observado en la fragmentación del florfenicol.

De manera general, se pueden observar similitudes entre los fraccionamientos de los analitos, esto a causa de la semejanza estructural que poseen. Por ejemplo para el tianfenicol, cloranfenicol y cloranfenicol-d5 se observa la presencia del fragmento $[\text{M}-\text{CHCH}_2\text{OHNHCOCHCl}_2-\text{H}]^-$, donde M es el analito y para el florfenicol el fragmento $[\text{FF}-\text{CHCH}_2\text{FNHCOCHCl}_2-\text{H}]^-$, estos fraccionamientos han generado un patrón estructural de un espectro de segundo orden similar entre ellos. En estudios anteriores realizados sobre el cloranfenicol por Mottier y cols., se describió este ión como representativo para él, al cual se le asignó la estructura de la Figura 12, de acuerdo a esa estructura, para el cloranfenicol el R corresponde a la sustitución del grupo $-\text{NO}_2$, mientras que para el florfenicol y el tianfenicol la sustitución corresponde a $-\text{SO}_2\text{CH}_3$, esta diferencia de sustitución provoca una diferencia en la relación m/z de los fragmentos, siendo 152, 157, 185 y 185 Da para cloranfenicol, cloranfenicol-d5, tianfenicol y florfenicol, respectivamente. El patrón de fraccionamiento está influenciada por la cadena dicloroacetamida sobre la unión de los dos carbonos, uno correspondiente al carbono del metilbenceno y otro correspondiente a la misma cadena.

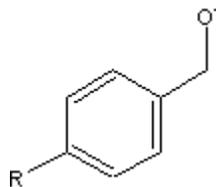


Figura 12: Estructura del fragmento $[\text{CAP}-\text{CHCH}_2\text{OHNHCOCHCl}_2-\text{H}]^-$ de CAP, según estudio de Pascal Mottier y cols. del año 2002.

Además se observa una semejanza en la fragmentación de tianfenicol, cloranfenicol y cloranfenicol-d5 generando el ión $[M-COHCl-H]^-$, donde M corresponde al analito estudiado. El mismo estudio planteó la estructura de este ión presente en la Figura 13. De acuerdo a la figura, para el cloranfenicol el R corresponde a la sustitución del grupo $-NO_2$, mientras que para el tianfenicol la sustitución corresponde a $-SO_2CH_3$, esta diferencia de sustitución provoca una diferencia en la relación m/z de los fragmentos, siendo 257, 262 y 290 Da para cloranfenicol, cloranfenicol-d5 y tianfenicol, respectivamente. La pérdida de COHCl, puede estar influenciada por el hidroxilo del carbono saliente, que por su electronegatividad arrastra electrones haciendo más débil la unión del carbono saliente con el carbono de la cadena dicloroacetamida.

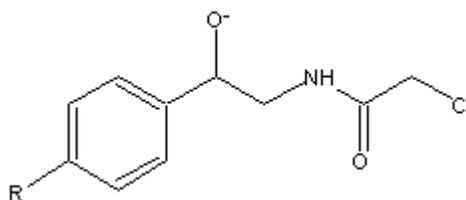


Figura 13: Estructura del fragmento $[CAP-COHCl-H]^-$ de CAP, según estudio de Pascal Mottier y cols. del año 2002.

Por otra parte el florfenicol y el florfenicol amina poseen una similitud en la pérdida de una molécula de agua, esto podría estar influenciado por la presencia del flúor, quien arrastra electrones hacia él o distribuye electrones hacia él, quitando los electrones más débiles frente a la ionización correspondientes a los más alejados del núcleo atómico, en este caso los electrones del oxígeno. Es decir, se arrastran los electrones de los orbitales p, que no participan en la unión con el carbono, permitiendo de esa forma la liberación del oxígeno en forma de agua.

Finalmente se observa que el tianfenicol es el más estable de los analitos, ya que su fragmentación no se logra a valores pequeños de energía de colisión, esto ocurre porque su ionización es baja, que se traduce en una baja generación del ión molecular. En el modo electrospray (ESI) la ionización de los analitos ocurre en interacción con la fase, la que es capaz de captar o ceder un protón a los analitos, en este sentido el pKa de cada analito tiene influencia sobre la pérdida o la ganancia de este protón. En la Tabla 10 se observa el valor de pKa de cada analito.

Tabla 10: Valor de pKa de cada analito. (Chemspider.com)

Analito	pKa
FF	9.03
TAP	9.76
CAP	9.61

De acuerdo a los valores de pKa presentados en la tabla, se observa que los valores de pKa son semejantes, aún así el valor de pKa del tianfenicol es ligeramente más alto dentro de los analitos, esto se traduce en el valor más bajo de la constante de acidez, por lo que se esperaría que la pérdida del protón sea menor para el tianfenicol en comparación con los otros analitos. En este sentido, cobra mucha importancia también los sustituyentes que posee cada estructura química, puesto que podrían tener influencia también en la pérdida del protón. En un anillo bencénico un grupo nitro atrae un gran número de electrones, debilitando uniones de oxígeno e hidrógeno, que es consecuente con el grado de ionización que posee el cloranfenicol, de la misma manera actúa un flúor en una cadena alquílica, atrae los electrones y debilita uniones oxígeno e hidrógeno, sin embargo estos efectos para el tianfenicol son menores, puesto que no presenta estos mismos grupos y presenta otros de menor atracción de electrones. Esto explicaría su baja ionización, la baja presencia de su ión molecular en el espectro de primer orden con una intensidad de este ión de 2.1×10^7 cps (Figura 9) y la posterior baja fragmentación, con la aparición de fragmentos recién a -20 volts (Figura 11). El florfenicol y el cloranfenicol que poseen una mejor ionización, presentan una intensidad más alta del ión molecular en el espectro de primer orden, igual a 5.0×10^7 cps y 5.1×10^7 cps (Figura 8 y Figura 9), respectivamente, concordante con su Ka, en valor y orden de magnitud, mientras que la fragmentación de ellos se observa a todos los niveles de energía (Figura 11). Para el florfenicol amina la presencia del grupo amino le confiere características básicas, por lo que su pKa está por sobre cualquiera de los otros analitos. Este capta un protón de la fase y se ioniza, teniendo el ión molecular en el espectro de primer orden (Figura 9) la mayor intensidad siendo igual a 7.4×10^7 cps y una fragmentación a todos los niveles de energía de colisión (Figura 11).

La elección de los fragmentos se realiza según la Decisión de la Comisión de la Unión Europea 2002/657/CE, que para un método confirmatorio por LC-MS/MS declara el cumplimiento de 4 puntos de identificación para sustancias prohibidas y de 3 puntos para

sustancias permitidas, estos puntos están detallados en la Tabla 11 de acuerdo a las distintas técnicas de MS.

Tabla 11: Puntos de identificación por ión para cada técnica de MS.

Técnica de MS	Puntos de identificación obtenidos por ión
Espectrometría de masas de baja resolución (LR)	1
Ión precursor LR-MS ⁿ	1
Productos de transición LR-MS ⁿ	1.5
HRMS	2.0
Ión precursor HR-MS ⁿ	2.0
Productos de transición HR-MS ⁿ	2.5

La técnica de MS/MS realizada en este estudio es de baja resolución, la cual permite la obtención del ión precursor (1 punto de identificación) y de productos de transición (1.5 puntos por cada transición), por lo que es necesaria la identificación del ión precursor más la elección de 2 fragmentos por cada analito para completar los 4 puntos (1 precursor + 2 transiciones). Para analitos utilizados como estándares internos se requiere sólo la elección de 1 fragmento representativo más el ión precursor.

La elección de los fragmentos con fines cualitativos y cuantitativos se basó en la intensidad de estos, siendo seleccionados los de mayor intensidad. En la Tabla 12 se encuentran los iones escogidos por intensidad en los espectros de primer y segundo orden.

Tabla 12: Iones moleculares y fragmentos escogidos para fines confirmatorios.

Analito	Ion padre (m/z)	Transición (m/z)
FF	356	185
		336
TAP	354	185
		290
CAP	321	152
		257
CAP – d5	326	157
FFA	248	230
		130

Los iones moleculares y los fragmentos representativos de cada analito son iguales a los obtenidos en el estudio de Jianzhong Shen y cols. en el año 2008 (Figura 7), aún así existen estudios de residuos de cloranfenicol en alimentos, que describen otros fragmentos como representativos, uno de ellos fue realizado por Forti y cols. en el año 2005, que describió la presencia de una transición de relación m/z 121 Da, otro estudio realizado por Bogusz y cols. en el año 2004, describió la presencia de un fragmento de relación m/z 194 Da, si bien estas transiciones fueron observadas en la generación de la rampa de energía de colisión para el cloranfenicol, no tuvieron una intensidad tal para ser representativos de este analito.

Conocidos los fragmentos representativos de cada analito, en el modo MRM se realizan posteriormente rampas de CE y de CXP para cada uno de ellos. La construcción de estas rampas permitió la optimización de tales parámetros dependiente de la fragmentación. El valor óptimo de cada uno de estos parámetros corresponde al punto de máxima intensidad alcanzada en la transición. En la Figura 14 se observan las rampas de CE y de CXP para los fragmentos del florfenicol de relación m/z 336 y 185 Da.

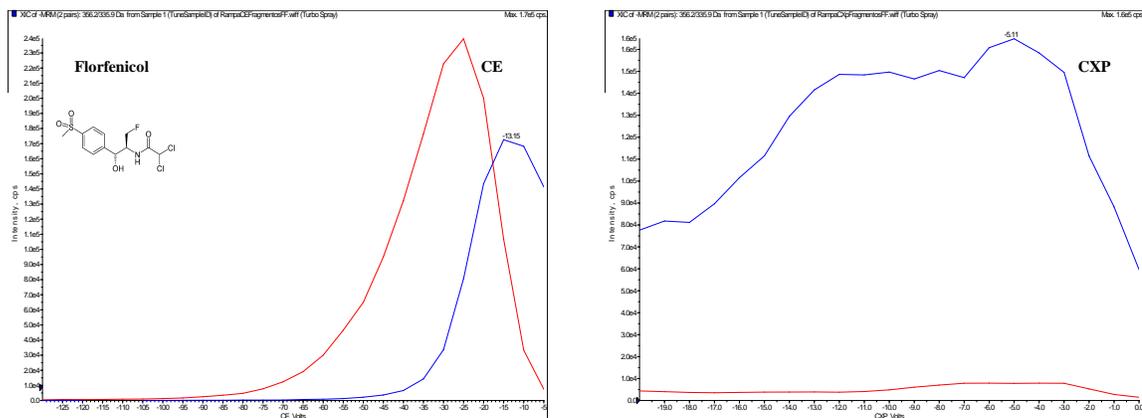


Figura 14: Rampa de CE y de CXP para los fragmentos del FF de relación m/z 185 Da (línea roja) y 336 Da (línea azul).

Se observa que el intervalo para la generación de la rampa de CE fue entre -130 y -5 volts. Se observa que a voltajes altos no existe presencia de ninguno de los fragmentos representativos de florfenicol, esto se explica porque la fragmentación ocurre a un nivel total de la molécula, sin selección de un enlace o una unión en particular, rompiendo enlaces de alta energía y generando fragmentos de alta complejidad. La aparición del fragmento correspondiente a la relación m/z 185 Da ocurre recién a los -80 volts aproximadamente, mientras que el fragmento de m/z 336 Da aparece recién con un valor de CE aproximado de -40 volts, este comportamiento se debe a las diferencias en las energías de enlace para la generación de estos fragmentos, donde la energía requerida para romper el enlace entre el carbono del metilbenceno y el carbono de la cadena dicloroacetamida versus el enlace carbono oxígeno es mayor, por ende la aparición de los fragmentos en la rampa de CE es primero para los enlaces de mayor energía y luego para los enlaces más lábiles. Ambos fragmentos a medida que disminuye el valor de CE hasta antes de su valor óptimo se ven aumentados en intensidad, por ejemplo para la transición de m/z igual a 185 Da a -45 volts presenta una intensidad de 1.0×10^5 cps, mientras que a -30 volts presenta una intensidad de 2.1×10^5 cps y para la transición de m/z igual a 336 Da a -30 volts una intensidad de 3.0×10^4 cps mientras que a -20 volts una intensidad de 1.3×10^5 cps. El valor óptimo de CE alcanzado para la transición de m/z igual a 185 Da fue de -26 volts con una intensidad de 2.4×10^5 cps, mientras que para la transición de m/z igual a 336 Da correspondió a -13 volts con una intensidad de 1.7×10^5 cps. Si disminuye en magnitud el valor de CE por sobre el valor óptimo la intensidad de los fragmentos también se ve disminuida, por ejemplo a -15 volts la

intensidad de la transición m/z igual a 185 Da es de aproximadamente 1.0×10^5 cps, tal comportamiento se debe a que la energía de colisión no es suficiente para generar esa transición. El mismo comportamiento también es observado en los demás analitos estudiados, pero en valores de CE diferentes, a excepción del florfenicol amina ya que su barrido comienza a +5 y concluye a +130 volts.

La rampa de CXP se realiza en el intervalo entre -20 volts y 0 volts. En la rampa de CXP de los fragmentos representativos del florfenicol, se observa que la intensidad de la transición m/z 185 Da, no varía mayormente en su intensidad siendo menor a 1.0×10^4 cps, teniendo su máximo de intensidad a los -3 volts siendo igual a 1.0×10^4 cps, esto se debe a que este fragmento por poseer una relación m/z baja su salida del espectrómetro no es totalmente influenciada por este parámetro. Por otra parte el fragmento de m/z igual 336 Da posee un comportamiento diferente, en un comienzo la intensidad posee un valor aproximado de 8.0×10^4 cps y a CXP -15 volts su intensidad aumenta hasta 1.1×10^5 cps, de esta manera continúa aumentando la intensidad hasta cuando llega a su valor óptimo en CXP igual a -5 volts siendo la intensidad igual a 1.6×10^5 cps, desde este punto la intensidad disminuye a medida que el CXP disminuye en magnitud. Para los demás analitos y sus fragmentos representativos se actúa de la misma manera, a excepción del florfenicol amina que comenzará el barrido de CXP a 0 volts y terminará a +20 volts.

La Tabla 13 resume la obtención de estos parámetros para cada uno de los analitos y sus fragmentos representativos.

Tabla 13: Valores de CE y CXP para cada analito y sus fragmentos representativos.

Analito	Ion precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	CE (volts)	CXP (volts)
FF	356	185	-26	-5
		336	-13	
TAP	354	185	-25	-8
		290	-14	
CAP	321	152	-25	-3
		257	-10	
CAP – d5	326	157	-29	-8
FFA	248	130	+25	+5
		230	+18	

Se observa que los fragmentos de m/z igual a 185 Da corresponden a fragmentos representativos del florfenicol y tianfenicol, poseen una semejanza en el valor de CE, debido a la semejanza estructural y de relación m/z que tienen estos fragmentos, estas semejanzas estructurales y de m/z no se traducen en una semejanza en el valor de CXP quizás sea por una influencia de los iones moleculares sobre la determinación de este valor. Por otra parte se observa que análogos estructurales tales como el cloranfenicol y el cloranfenicol-d5 con un fragmento en común de relación m/z igual a 151 y 157 respectivamente no generan valores de CE y CXP semejantes, provocado quizás por la presencia de deuterios en la molécula de cloranfenicol-d5. De manera general se observa que los fragmentos de cada analito con menor relación m/z, presentan valores de CE altos en magnitud, esto se provoca porque la obtención de estos fragmentos requiere en un paso previo la obtención de otro fragmento de mayor m/z y además la generación de este tipo de fragmentos requiere la fragmentación de uniones más fuertes.

En comparación con el estudio realizado por Jianzhong Shen y cols. descrito en la Figura 7, se observa una semejanza en el comportamiento del valor de CE, donde un mayor valor de CE obtiene fragmentos de menor relación m/z y un menor valor de CE obtiene fragmentos de mayor relación m/z. Los valores de CE obtenidos difieren de los valores obtenidos por Jianzhong Shen

y cols., lo que podría deberse a diferencias en el uso de los modificadores orgánicos, en los aditivos de ionización e incluso en las condiciones propias del equipo.

5.1.2 Realización y optimización del FIA

En la Figura 15, se encuentra el resultado de la optimización de los parámetros de la fuente de iones para los analitos florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol estudiados bajo el modo ESI.

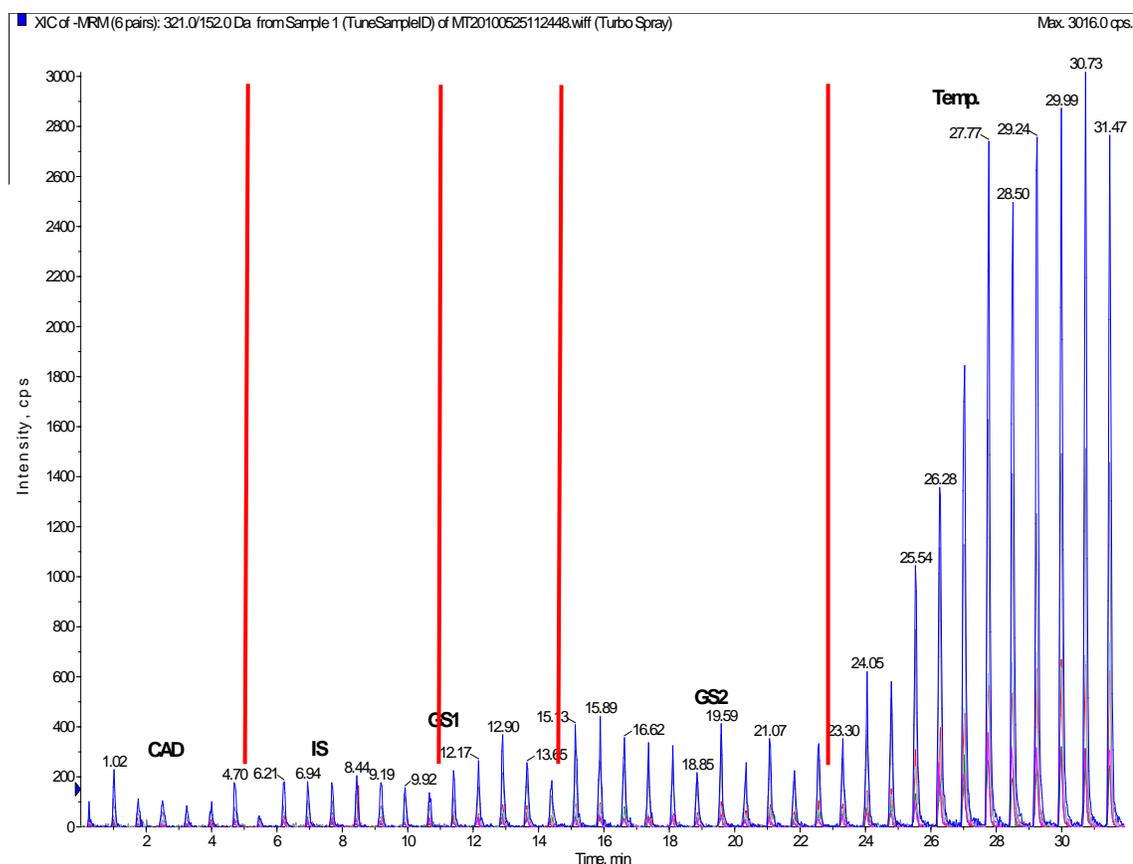


Figura 15: Optimización de la fuente de iones para los analitos cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol.

Los peaks correspondientes a CAD poseen valores de 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 2 nuevamente. Se observa que cuando el valor de CAD es igual a 1 y a 8 se obtiene la menor intensidad de los iones, siendo inferior a 100 cps, mientras cuando CAD es igual a 2 se observa la mayor

intensidad siendo igual a 200 cps, este valor es considerado el óptimo para CAD, puesto que presenta la mayor intensidad. Este valor óptimo permite que la presión que ejerce el gas de colisión en la celda de colisión sea la óptima para fragmentar.

Para IS los valores de acuerdo a los 8 peaks presentes son: -3000, -3500, -4000, -4500, -3500, -3500, -3000 y -3500 V. Se observa que el primer peak de IS es el que posee la menor intensidad (bajo los 100 cps), posteriormente se observa la presencia de un peak de mayor intensidad igual a 200 cps, peak que se repite luego de dos intentos, siendo un poco mayor a 200 cps. Se vuelve a intentar una vez más con IS igual a -3500, pero sus nuevos intentos no superan los 200 cps, aún así el valor óptimo de IS corresponde a -3500 puesto que fue el de mayor intensidad en todos los intentos de IS.

Los valores de GS1 fueron, 10, 20, 30, 40 y 50, siendo claramente el valor de GS1 igual a 30 el que obtuvo la mayor intensidad por parte de estos analitos, siendo superior a 400 cps. Posteriormente se evaluó GS2 en 10, 20, 30, 40 y 50, para posteriormente combinar GS1 con GS2 en los valores 25/15, 30/10, 30/15, 25/10, 30/10 y 30/10. Se observó que cuando GS2 era igual a 10 poseía la mayor intensidad superior a 400 cps, mientras que el valor de GS2 que generó la menor intensidad fue de 50. La combinación de estos dos parámetros responde a la semejanza de ambos y a que GS2 controla el gas auxiliar que ayuda a GS1. Allí se observa que la combinación correspondiente a 30/10 fue la que generó la mayor intensidad, siendo la menor para 25/15. Optimizar estos dos parámetros son relevantes en la evaporación de las gotas de spray y en evitar la entrada de solvente al equipo.

En la figura por último se ve la optimización de la temperatura, la cual posee una alta influencia en la intensidad. La dificultad para enfriar las zonas de alta temperatura, hacen imposible volver a temperaturas más bajas, de acuerdo a esto los peaks que se presentan son: 100, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 600, 500, 600 y 600 °C. Se observa que el peak de menor intensidad fue obtenido cuando la temperatura era de 100 °C, siendo no superior a los 400 cps, aún así este punto podría estar considerado fuera de la temperatura ya que no se alcanzó esta temperatura antes de que se inyectara la muestra desde el autosampler, por esta razón este punto se repitió, dando una intensidad cercana a los 600 cps. Se observa que la temperatura que generó la mayor intensidad fue de 600 °C, siendo cercana a 2800 cps, se repitió en una segunda

oportunidad disminuyendo a 2600 cps aproximadamente, aquí es donde ocurre la única baja de temperatura a 500 °C, donde se observa un crecimiento de la intensidad hasta 2800 cps, posteriormente se repitió en 2 nuevas oportunidades la temperatura de 600 °C y alcanza una mayor intensidad superior a 2800 cps, alcanzando la intensidad de 3000 cps aproximadamente.

En la Tabla 14, se presentan los valores optimizados del FIA bajo el modo ESI.

Tabla 14: Valores óptimos de los parámetros de la fuente de iones para analitos bajo modo ESI.

Parámetro	Valor óptimo
CAD	2
IS (V)	-3500
GS1	30
GS2	10
T° (°C)	600

En la Figura 16, se observa la optimización de los parámetros dependientes de la fuente de iones para el florfenicol amina, analizado bajo el modo ESI⁺.

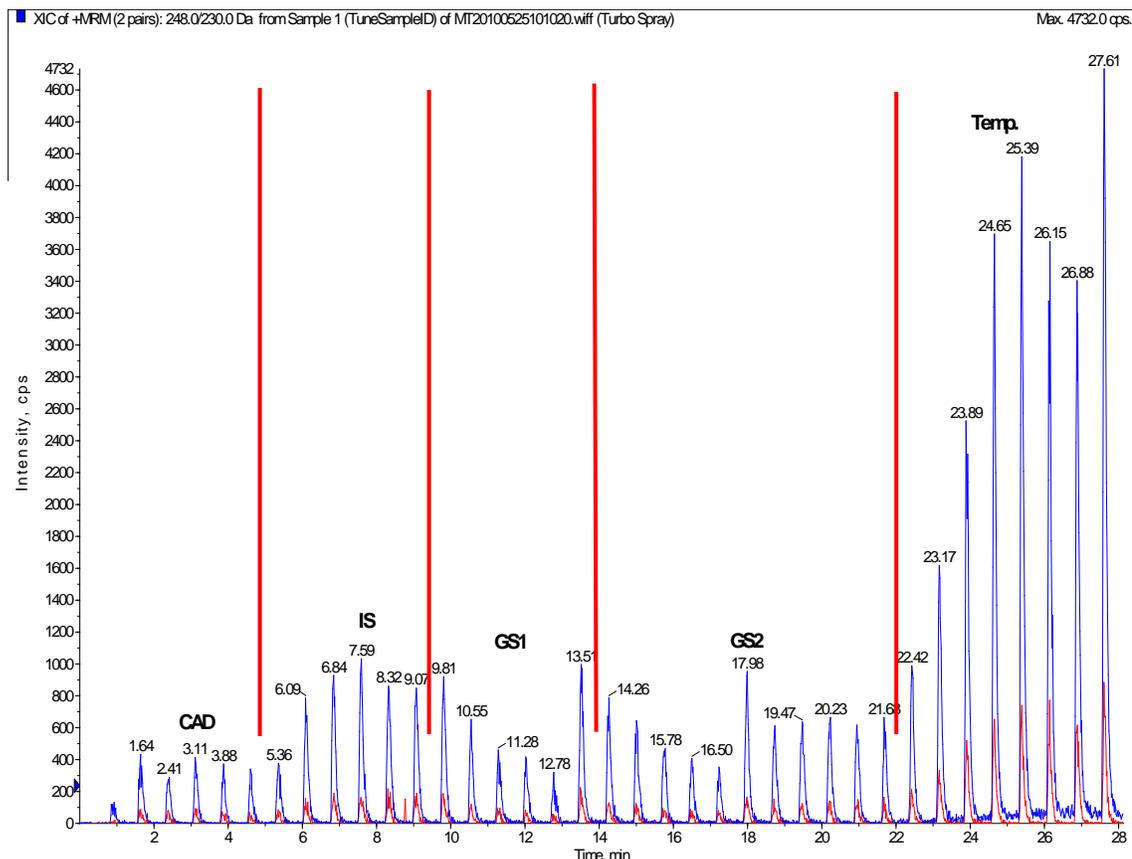


Figura 16: Optimización de los parámetros dependientes de la fuente de iones para el florfenicol amina, analizado bajo el modo ESI⁺.

Se realizan 6 intentos para obtener el valor óptimo de CAD, con los valores 1, 2, 4, 6, 8 y 10. Se observa que cuando CAD es igual a 1, presenta la menor intensidad, siendo inferior a 100 cps, mientras que la mayor intensidad se alcanza cuando CAD es igual a 2 siendo superior a 400 cps, luego disminuye la intensidad y se mantiene constante bajo los 400 cps.

Para IS los valores que se observan para obtener el valor óptimo es 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 y 5200 V. Cuando el valor es de 3000 V presenta la menor intensidad siendo inferior a 400 cps, posteriormente el valor de la intensidad aumenta, por ejemplo cuando IS es igual a 3500 V la intensidad es de 800 cps, presentando el valor óptimo a los 4500 V con una intensidad de 1000 cps. Posteriormente la intensidad decae por bajo los 1000 cps.

En GS1, el valor óptimo se alcanza al menor valor de GS1, es decir a 10, con una intensidad cercana a 1000 cps, los ensayos posteriores de GS1 disminuyen la intensidad llegando aproximadamente a 400 cps cuando GS1 es igual a 50, posteriormente se vuelve uno igual a 10 y vuelve a dar una intensidad cercana a 1000 cps. En la optimización de GS2, el valor óptimo se encuentra cuando es igual a 10, luego GS2 tiene valores de 20, 30, 40, 50, luego una combinación de GS1/GS2 10/10, 15/15, 10/15, 15/10, 10/20 y 20/10, generando la mayor intensidad cuando ambos GS eran igual a 10, ya sea en el primer peak con intensidad de 800 cps y luego con 1000 cps aproximadamente.

La optimización de la temperatura toma valores de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 600 y 500 °C respectivamente, donde se observa que a temperatura igual a 100 °C, presenta la menor intensidad de detección de FFA siendo igual a 1000 cps, siendo óptimo los valores de 500 °C que son iguales a 4200 cps y 4700 cps respectivamente.

En la Tabla 15 se presentan los valores óptimos de los parámetros dependientes de la fuente de iones para la detección de florfenicol amina.

Tabla 15: Valores óptimos de los parámetros de la fuente de iones para florfenicol amina bajo modo ESI⁺.

Parámetro	Valor óptimo
CAD	2
IS (V)	4500
GS1	10
GS2	10
T° (°C)	500

5.1.3 Estudio del comportamiento cromatográfico de elución isocrática, modificador orgánico y aditivo de ionización.

En la Figura 17 se observan los cromatogramas correspondientes a la solución multiestándar de florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol de 50 ppb para las distintas composiciones de la fase móvil. En esta figura se observa la influencia de la concentración de acetonitrilo de la fase móvil, sobre la respuesta instrumental de cada analito, observándose que la intensidad de la señal de los analitos aumenta a medida que aumenta la concentración de acetonitrilo. Esto responde básicamente a una mejoría de la eficiencia de la columna, ya que el número de platos teóricos es mayor cuando existe mayor proporción de acetonitrilo, es decir, existe una mejor dispersión de los analitos que se traduce en peaks cromatográficos más angostos y por ende mayor intensidad. Por otro lado, se observa que en la proporción acetonitrilo/agua 10/90, la eficiencia de la columna disminuye, presentándose anchos de peaks mayores y mayor retención de los analitos, inclusive siendo un analito totalmente retenido. Esto sin duda, influye directamente en la intensidad de las señales, ya que son menores a las presentadas por concentraciones mayores de acetonitrilo.

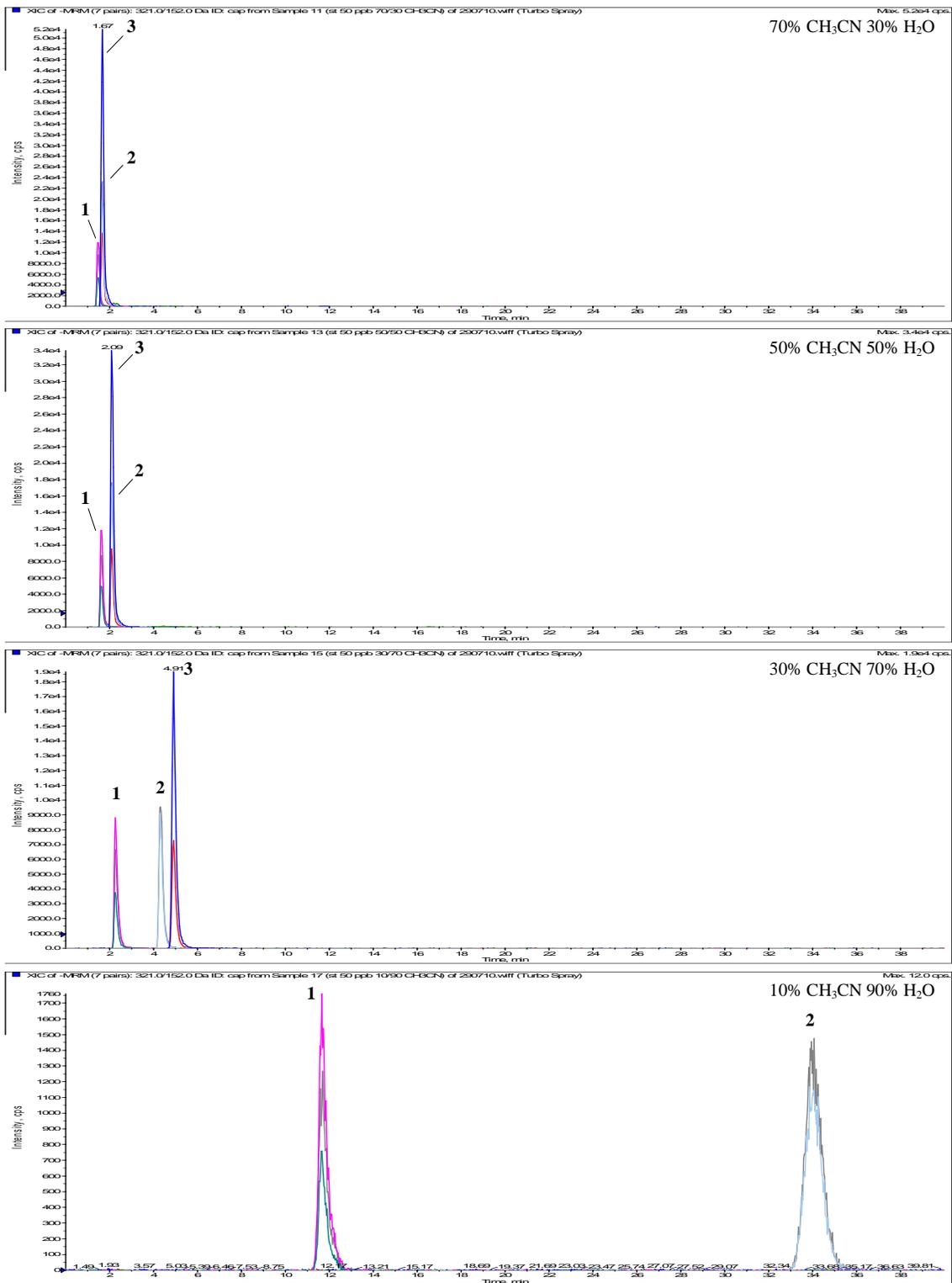


Figura 17: Cromatogramas de una solución multiestándar de 50 ppb en distintas composiciones de fase móvil. 1: TAP, 2: FF, 3: CAP.

En la Tabla 16 se presenta la intensidad (I), el tiempo de retención (t_r) y el ancho de peak (ω) para el cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, de acuerdo a la composición de la fase móvil utilizada. Según los resultados obtenidos en la separación cromatográfica de los tres analitos se desprende que, en una fase estacionaria apolar se presenta una mayor afinidad por compuestos apolares frente a una fase móvil relativamente polar. Al aumentar la proporción del modificador orgánico (índice de polaridad $P_{\text{CH}_3\text{CN}}=5,8$), se disminuye la polaridad de la fase, aumentando la fuerza de elución para los tres analitos, que genera la disminución de los tiempos de retención. Por otra parte el acetonitrilo disminuye la viscosidad de la fase móvil, por lo tanto cuando se presenta una menor concentración de acetonitrilo en la fase móvil, existirá una menor difusión de los analitos hacia la fase móvil y una disminución en la elución de éstos. La polaridad de un analito está sujeta a la presencia de ciertos grupos funcionales en su estructura química, los que influyen directamente sobre el comportamiento cromatográfico que poseen, así la polaridad aumenta cuando se presentan grupos hidroxilos, en este caso las semejanzas y las diferencias estructurales entre los analitos determinan las diferencias en la retención, así por ejemplo la presencia de grupos sulfonilos aumentan la polaridad de los analitos en comparación al grupo nitro presentado por el cloranfenicol, de igual manera un hidroxilo genera mayor polaridad que un flúor en la molécula de florfenicol. Según lo observado se describe que el orden decreciente de polaridad es la siguiente:



La conjunción de estos tres factores explica el comportamiento cromatográfico de los analitos en base a las distintas proporciones del modificador orgánico, como así también la fuerte retención observada para el cloranfenicol en presencia de una composición de fase móvil acetonitrilo/agua 10/90.

Tabla 16: Intensidad, tiempo de retención y ancho de peak de cada analito, de acuerdo a proporción acetonitrilo/agua.

Proporción CH ₃ CN/H ₂ O	CAP			TAP			FF		
	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)
70/30	5,2x10 ⁴	1,67	33	1,2x10 ⁴	1,47	33	2,3x10 ⁴	1,65	45
50/50	3,4x10 ⁴	2,09	37,8	1,2x10 ⁴	1,62	36	1,8x10 ⁴	2,08	42
30/70	1,9x10 ⁴	4,91	51	8812	2,26	48	9548	4,31	51
10/90	-	-	-	1760	11,66	90	1460	34,07	156

En la Figura 18 se observan los cromatogramas de florfenicol para las distintas proporciones de fases móviles. En la fase móvil de proporción acetonitrilo/agua 70/30 se observa un doble peak en la señal cromatográfica, comportamiento que se acentúa cuando disminuye la concentración de acetonitrilo, observándose claramente un desdoblamiento de la señal cromatográfica correspondiente a la transición 356/185, mientras que para la transición 356/336 no se observa este comportamiento.

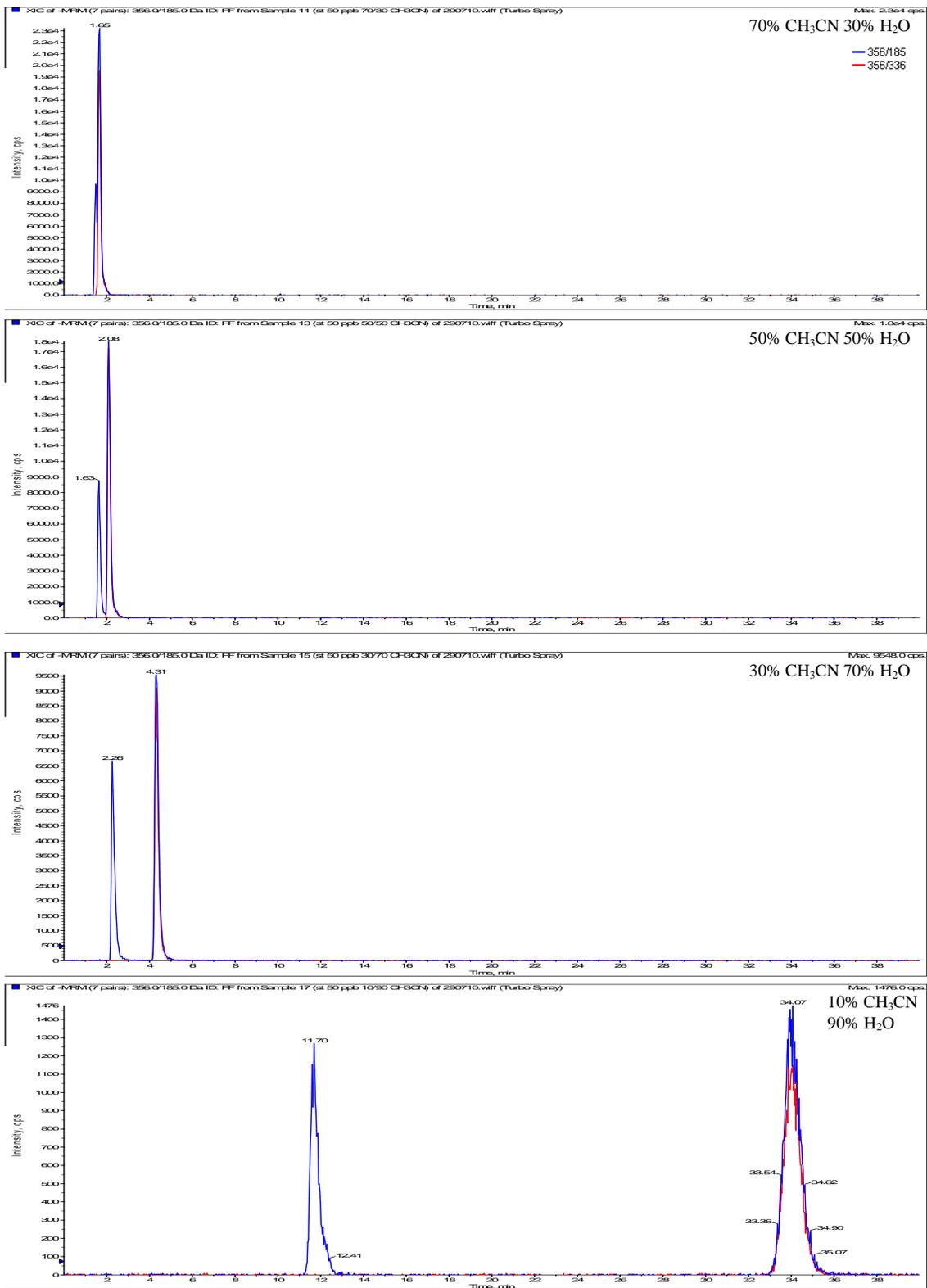


Figura 18: Cromatogramas para el florfenicol y sus transiciones representativas.

Este fenómeno tiene que ver con la presencia de un isótopo de cloro en la molécula de tianfenicol. El ión molecular del tianfenicol posee una relación m/z de 354 Da, dos unidades inferiores a las del ión molecular de florfenicol (356 Da), si existiese la presencia de un ³⁷Cl en la molécula de tianfenicol este tendría un ión molecular de relación m/z igual a la del florfenicol. La semejanza en la fragmentación de estos analitos, generando ambos un fragmento de relación m/z 185 Da, causaría este fenómeno de doble peak para la transición 356/185. Dado a que la extracción de los iones desde el software Analyst en las corridas cromatográficas no discrimina analitos, sino que discrimina relaciones m/z, permitiría que la señal cromatográfica de un isótopo de cloro en tianfenicol aparezca en la señal cromatográfica de florfenicol. Es sabido que la separación cromatográfica es un fenómeno que depende de los analitos, pero la cual no reconoce a los isótopos de una molécula, lo que permite que el tiempo de elución en la columna de un analito con isótopo sea el mismo que el de un analito sin isótopo, lo que hace probable que el tiempo de retención de este peak cromatográfico coincida con el tiempo de retención para las transiciones del tianfenicol. En la Tabla 17 se presentan los tiempos de retención de las transiciones extraídas del cromatograma referentes al tianfenicol y el tiempo de retención de la señal cromatográfica 356/185.

Tabla 17: Tiempos de retención para las transiciones de tianfenicol y de la señal 356/185.

Fase móvil	TAP	356/185
50/50	1,62	1,63
30/70	2,26	2,26
10/90	11,66	11,70

De acuerdo a los valores entregados en la tabla y observados en los cromatogramas de las Figuras 17 y 18, se infiere que esta señal cromatográfica sea resultado de la presencia del isótopo de cloro en la molécula de tianfenicol. De esta manera se plantea un nuevo estudio con la finalidad de asegurar esta conclusión, con la presencia de isótopos de cloro tanto para tianfenicol como para florfenicol, utilizando una relación m/z de 358 Da, que corresponderían a dos isótopos de cloro en tianfenicol y un isótopo de cloro en florfenicol, este estudio se decide realizar en las condiciones cromatográficas óptimas. Finalmente en la Figura 19 se observa el cromatograma obtenido bajo esas condiciones.

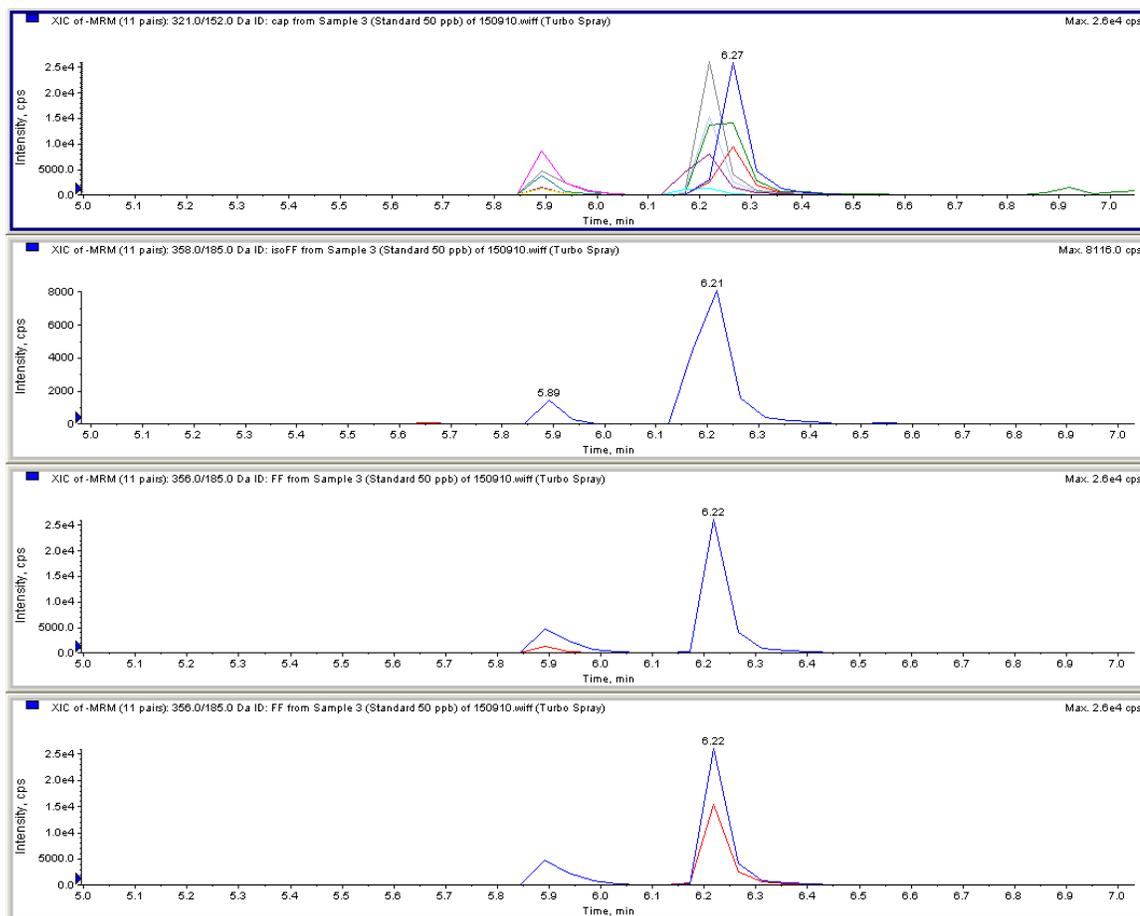


Figura 19: Cromatogramas de estudio de isótopos de Cl.

Según lo presentado en la figura anterior, se puede observar en el segundo cromatograma la presencia de dos peaks cromatográficos correspondientes a la transición m/z 358/185. Este fenómeno es resultado de la presencia de isótopos de cloro tanto en la molécula de florfenicol como de tianfenicol, siendo de un ^{37}Cl para el florfenicol y de dos ^{37}Cl para el tianfenicol. En el tercer cromatograma con línea azul se observa la transición 356/185 y con línea roja la transición 356/290, es así como se observa la presencia de ambas transiciones para el peak correspondiente al tianfenicol y sólo una transición para el florfenicol, ya que éste no posee un fragmento característico a 290 Da. Finalmente el cuarto cromatograma corresponde a en línea azul a la transición 356/185 y en línea roja 356/336, observando dos peaks cromatográficos, uno correspondiente al florfenicol con sus dos transiciones y otro a tianfenicol con presencia de un isótopo de cloro en la molécula. La presencia de los isótopos de cloro en las distintas moléculas está directamente relacionado con la intensidad de la señal, dado a la abundancia que poseen los

isótopos de cloro de forma natural, así se puede observar que para señales correspondientes a tianfenicol con 2 isótopos de cloro, su intensidad es menor a 2000 cps, mientras que cuando existe sólo un isótopo la intensidad de la señal es cercana a 5000 cps, de la misma forma se observa que cuando el florfenicol posee un isótopo de cloro la señal es de 8116 cps, mientras que cuando no posee isótopos su señal es de 2.6×10^4 cps. De esta manera, se entiende que este desdoblamiento de señal ocurrido por los peaks cromatográficos de la transición 356/185 corresponden: uno a la presencia de un isótopo de cloro en la molécula de tianfenicol y el otro a la transición correspondiente a florfenicol.

Se observa en la Figura 17 y en la Tabla 16, que la composición de fase móvil que generó en conjunto la mejor separación cromatográfica, y que además presentó la mayor intensidad de los analitos, ocurrió cuando se utilizó en modo isocrático una composición de fase móvil acetonitrilo/agua 30/70. Con la elección de la proporción entre modificador orgánico/agua de la fase móvil, se realiza una nueva elución, esta vez con otro modificador orgánico (metanol). La Figura 20 presenta el cromatograma del modo isocrático de composición metanol/agua 30/70.

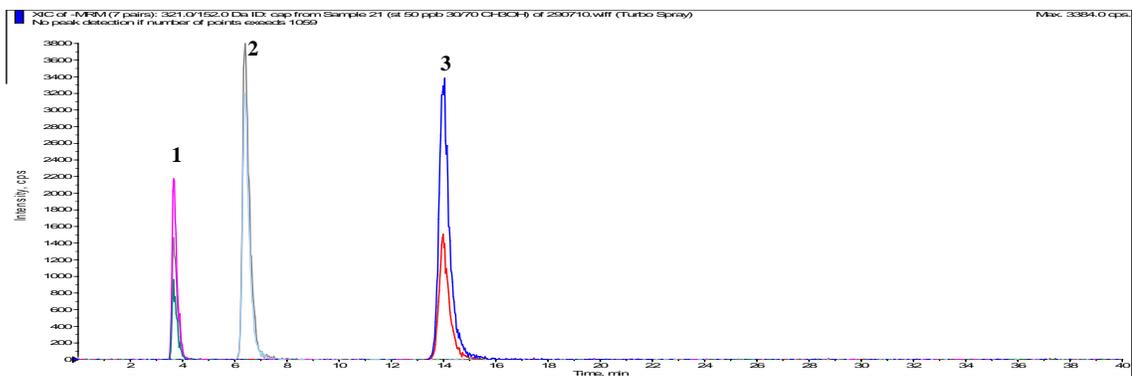


Figura 20: Cromatogramas de la solución multiestándar de 50 ppb en la composición metanol/agua 30/70. 1: TAP, 2: FF, 3: CAP.

Se observa en el cromatograma, un aumento en la separación cromatográfica de los analitos, en comparación con la fase móvil compuesta por acetonitrilo, pero esta vez se ve disminuida la intensidad de los analitos en un 50% aproximado, además se ven peaks anchos y de baja definición, lo que podría afectar enormemente a la cuantificación de estos analitos. El metanol influyó de dos formas, disminuyendo la polaridad de la fase móvil, dado principalmente por su índice de polaridad ($P_{\text{CH}_3\text{OH}}=5,1$) y por otro lado a través de la viscosidad, si bien el metanol es

menos viscoso que el agua, es más viscoso que el acetonitrilo, cambiando la eficiencia de la columna, ya que disminuye el número de platos teóricos y aumenta la altura equivalente de platos teóricos, que se traduce en una mayor separación y mayor retención de los analitos. En la Tabla 18 se encuentran resumidos los resultados de la intensidad, tiempos de retención y la anchura de peak para cada uno de los analitos.

Tabla 18: Resumen de los resultados obtenidos del cromatograma de fase móvil 30/70 CH₃OH/H₂O.

Analito	Intensidad (cps)	tr (min)	Ancho de peak (seg)
CAP	3384	14,1	126
TAP	2176	3,8	42
FF	3800	6,3	72

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio sobre la composición de la fase móvil, el mejor modificador orgánico fue el acetonitrilo en la proporción 30/70 (acetonitrilo/agua), aunque la separación cromatográfica no haya sido del todo satisfactoria. Esta separación podrá ser mejorada utilizando un modo en gradiente y además podría mejorarse a través del uso de otra columna.

El uso de aditivos de ionización, en teoría permitirán una mejor definición de los peaks cromatográficos, ya sea en anchura como en intensidad. De esta manera se preparan soluciones de fases móviles, ya sea orgánica como acuosa que contengan 5 mM de un aditivo de ionización y luego otra fase móvil tanto orgánica como acuosa con otro aditivo de ionización.

El primer aditivo utilizado fue el acetato de amonio (AA), posteriormente se utilizó formiato de amonio (FA). De acuerdo a la Figura 21 se observan los cromatogramas generados por el uso de los aditivos en modo isocrático de composición acetonitrilo/agua 30/70, donde se observa que cuando se utilizó acetato de amonio disminuyó la intensidad de todos los analitos y sus transiciones en comparación a la misma fase móvil realizada anteriormente. Esto podría deberse a una alta generación de aductos entre acetato y analitos, lo que perjudica en la generación de sus espectros de primer orden y posteriormente a la fragmentación y obtención de las transiciones

representativas de cada analito. Por otra parte se observa que cuando se utilizó formiato de amonio como aditivo, se obtuvo peaks más definidos, con una anchura menor, aunque la intensidad varió negativamente respecto a lo ocurrido sin aditivo.

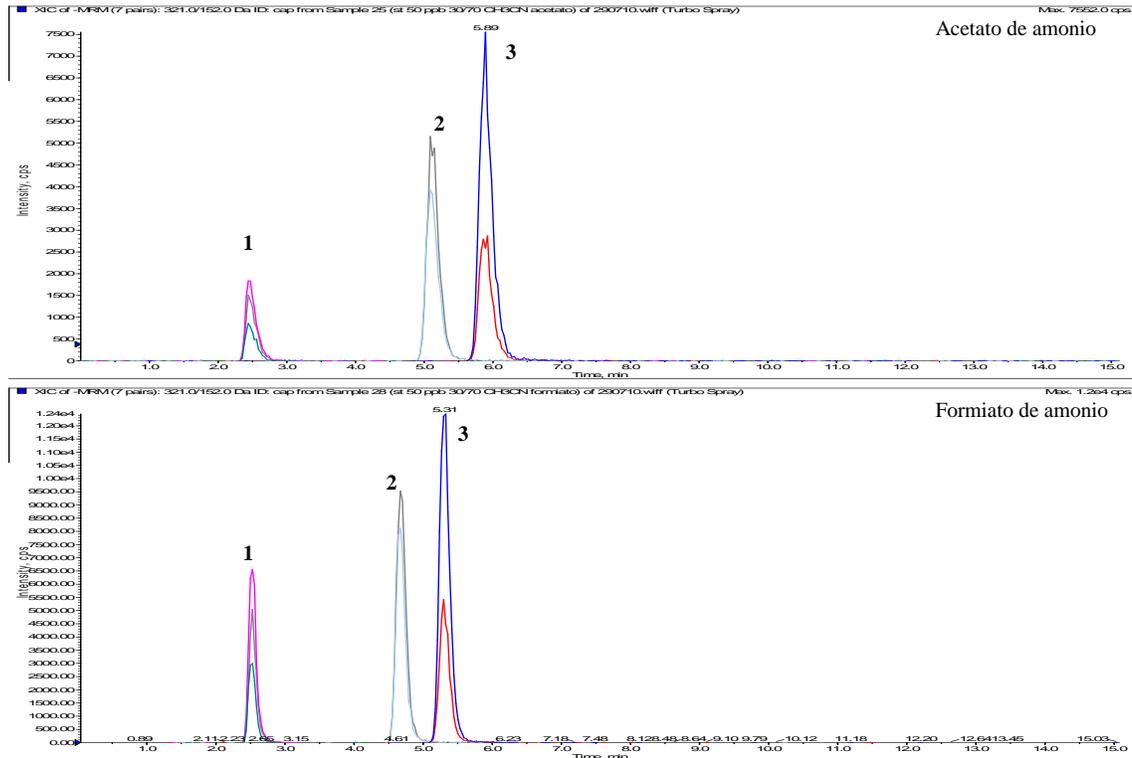


Figura 21: Cromatogramas de la solución multiestándar de 50 ppb con fases móviles con 5 mM de aditivo de ionización. 1: TAP, 2: FF, 3: CAP.

La Tabla 19 presenta los valores obtenidos de intensidad, tiempo de retención y anchura de peak para cada analito, en presencia de los aditivos de ionización estudiados. Se observa de manera general que los aditivos de ionización disminuyeron notoriamente la anchura de peak para cada analito, haciéndolos más simétricos. El aditivo de ionización está encargado de acelerar el proceso de ionización de los analitos por la propia capacidad que poseen los aditivos de ceder o captar protones, quizás por efecto del desplazamiento del equilibrio ácido-base de los analitos, se genera un cambio cinético en la separación cromatográfica, efecto que podría estar ligado a un cambio en la afinidad de la columna por los analitos ionizados por sobre los no ionizados ó viceversa. Esto se traduciría en una mayor resolución de los peaks, disminución de los anchos de peaks y aumento en la intensidad de detección de los analitos.

Tabla 19: Intensidad, tiempo de retención y anchura de peak, de acuerdo al aditivo de ionización utilizado.

Analito	AA			FA		
	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)
CAP	7552	5,89	48	$1,2 \times 10^4$	5,31	41,4
TAP	1800	2,45	39,6	6560	2,52	33,6
FF	5196	5,10	54	9532	4,68	42

Desde la tabla se desprende que el mejor aditivo de ionización correspondió a formiato de amonio, ya que se obtuvo mejor intensidad y un menor ancho de peak. De esta manera se optimizó la composición de la fase móvil, al usar acetonitrilo como modificador orgánico y FA como aditivo de ionización.

5.1.4 Estudio en gradiente de columnas cromatográficas y medio de inyección de los analitos.

Utilizando acetonitrilo para la composición de la fase móvil y formiato de amonio como aditivo de ionización, se realiza el estudio cromatográfico de los analitos en gradiente (ver Tabla 5) y en distintas columnas. La Figura 22 presenta los cromatogramas de las eluciones para cada columna, observándose cambios en los tiempos de retención de los analitos en comparación a los realizados de forma isocrática, esto se debe a la utilización del modo en gradiente, observándose también una variación en los tiempos de retención de los analitos entre columnas, provocado por las diferencias de los rellenos de las columnas. Se observa uniformidad en el ancho de peak de cada analito para cada columna, sin embargo el tianfenicol en la columna Xterra generó un ancho de peak lejano a la normalidad de este mismo analito en las otras columnas, que podría deberse a un aumento en la retención del analito por la columna.

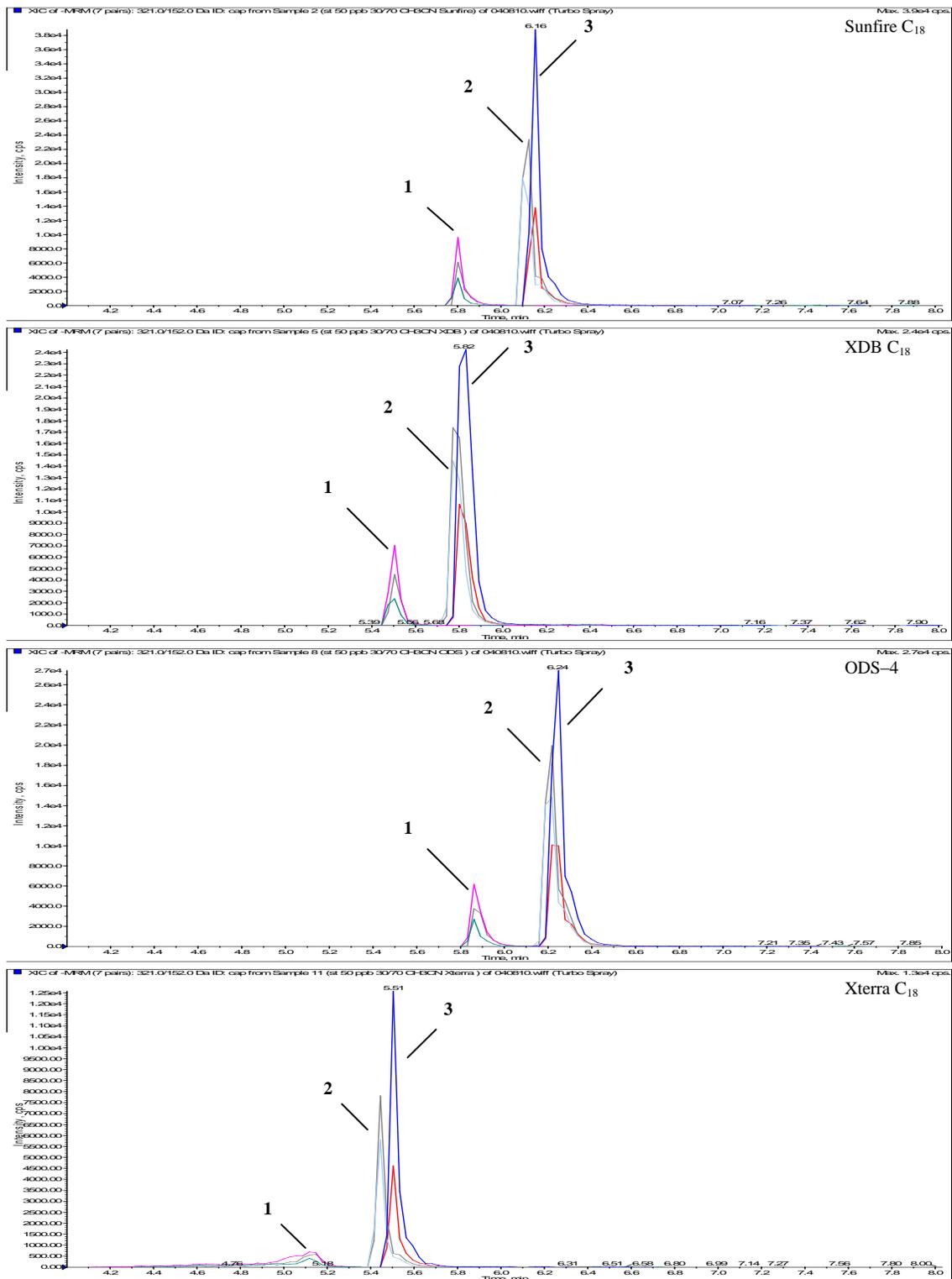


Figura 22: Cromatogramas de la solución multiestándar de 50 ppb, para distintas columnas cromatográficas. 1: TAP, 2: FF, 3: CAP.

La Tabla 20 presenta la influencia de la columna cromatográfica en los valores obtenidos de intensidad, tiempo de retención y anchura de peak para cada analito. Se observa que la mayor intensidad de detección de los analitos ocurre con la columna Sunfire, mientras que la más baja intensidad ocurre con la participación de la columna Xterra, siendo tres veces menor tanto para el cloranfenicol y el florfenicol, llegando a ser diez veces menor la intensidad para el tianfenicol. Estos fenómenos de baja intensidad para el tianfenicol responden al ancho de peak, donde se observa un aumento de cuatro veces respecto a la columna Sunfire, provocado por la afinidad del tianfenicol por el relleno de la columna Xterra, que está formada por partículas híbridas de tres silanoles y un metilo que le otorgan hidrofobicidad al relleno, esto genera una competencia entre la fuerza de atracción entre el tianfenicol y el relleno y la fuerza de elución generado por la fase móvil, equilibrando las fuerzas hasta el momento en que el gradiente incorpora acetonitrilo y permite la salida completa del tianfenicol, causando durante todo este equilibrio de fuerzas la salida de pequeñas cantidades de tianfenicol.

Tabla 20: Influencia de la columna cromatográfica sobre la intensidad, el tiempo de retención y anchura de peak para cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol.

Columna	CAP			TAP			FF		
	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)
Sunfire	$3,9 \times 10^4$	6,16	16,8	9588	5,80	16,8	$2,3 \times 10^4$	6,12	16,8
XDB	$2,4 \times 10^4$	5,82	16,8	7040	5,50	13,2	$1,7 \times 10^4$	5,79	20,4
ODS-4	$2,7 \times 10^4$	6,24	18,6	6192	5,87	15	$2,04 \times 10^4$	6,21	18,6
Xterra	$1,3 \times 10^4$	6,24	16,2	696	5,51	72	7812	5,45	16,8

El orden de elución de los analitos también se relaciona con la hidrofobicidad de estos, es decir, serán más atraídos por la fase estacionaria cuando la fase móvil posea gran cantidad de agua, de esta manera el tiempo de retención es directo al grado de hidrofobicidad, esto es:

$$\text{CAP} > \text{FF} > \text{TAP}$$

esto responde al gradiente utilizado, ya que los analitos eluyen ante un pequeño aumento de acetonitrilo en la fase móvil.

Se puede evaluar la eficiencia de una columna cromatográfica por medio del estudio de la altura equivalente de los platos teóricos (HETP), donde mientras más pequeño sea el valor de la HETP, más eficiente es el sistema cromatográfico. La HETP se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\boxed{\text{HETP} = L / N} \quad (1)$$

Donde:

L : Largo de la columna cromatográfica

N : n° de platos teóricos

Para conocer el número de platos teóricos (N), es necesario conocer el tiempo de retención y el ancho del peak, descritos en la Tabla 20, utilizando la siguiente fórmula:

$$\boxed{N = 16 (tr / \omega)^2} \quad (2)$$

Donde:

tr : Tiempo de retención en segundos

ω : Ancho de peak en segundos

Mediante la utilización de las fórmulas anteriores se calculó la HETP, para cada columna generada en la medición del florfenicol. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 21:

Tabla 21: Resultados de N y HETP de acuerdo a columna utilizada.

Columna	N	HETP (mm/plato)
Sunfire	7644	0,020
XDB	4640	0,032
ODS-4	6421	0,023
Xterra	6062	0,016

De esta manera, se observa que las columnas que resultaron ser más eficientes para el florfenicol correspondieron a Sunfire C₁₈ y Xterra, sin embargo, en el cromatograma correspondiente a la columna Xterra, se observa una retención irregular del tianfenicol y un arrastre por la columna, que determinó para este analito una menor eficiencia, esto es determinante en la elección de la columna cromatográfica, puesto que esta baja eficiencia para este analito en esta columna podría generar errores en la cuantificación de éste.

De acuerdo a lo presentado anteriormente, la columna cromatográfica que generó la mayor intensidad, la mejor separación cromatográfica, menor ancho de peak y mejor eficiencia fue la columna Sunfire C₁₈, columna que retuvo los analitos cuando la fase era predominantemente acuosa y permitió su salida ante un pequeño aumento de acetonitrilo en la fase, es decir, una baja en la polaridad de la fase móvil.

En la Tabla 22 se presentan los valores de intensidad, tiempo de retención y ancho de peak de cada analito según la composición del medio de inyección. Éste y por ende los analitos, sufren dilución y difusión, resultado de su ingreso (25 µL por cada inyección) a la fase móvil de flujo 250 µL/min. Entre mayor similitud que existe entre la composición del medio de inyección y la fase móvil menor es la difusión de la banda o frente cromatográfico con lo cual se obtienen peaks más estrechos.

Tabla 22: Influencia del medio de inyección sobre la intensidad, el tiempo de retención y anchura de peak para cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol.

Proporción Vehículo	CAP			TAP			FF		
	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)	I (cps)	tr (min)	ω (seg)
70/30	1.5x10 ⁴	6.12	21.6	1624	5.76	258	1.1x10 ⁴	6.09	22.2
50/50	2.2x10 ⁴	6.14	16.8	2968	5.77	31.8	1.8x10 ⁴	6.10	16.8
30/70	2.9x10 ⁴	6.16	15	4256	5.78	11.4	2.3x10 ⁴	6.13	13.2
10/90	3.0x10 ⁴	6.16	13.2	4380	5.80	15	2.1x10 ⁴	6.13	15

Se observa que cuando la proporción acetonitrilo/agua del vehículo es 70/30 son mayores los anchos de peak, incluso se observa el arrastre del tianfenicol que desarrolla un ancho de peak

considerable de 258 seg., siendo resultado de un microgradiente. Por otra parte se observa que cuando la proporción acetonitrilo/agua del vehículo es 30/70 o 10/90, el ancho de peak disminuye y aumentan las intensidades, relacionado con la afinidad por la fase móvil, dado a su semejanza en composición, evitando microgradientes.

5.2 Validación de metodología para determinación de impurezas de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos que contienen florfenicol.

5.2.1 Determinación de Linealidad y Sensibilidad.

Durante los tres días se realizan las curvas de calibración externas, a niveles de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 3 ng/mL (ppb) con el propósito de evaluar el comportamiento lineal de éstas. En la Figura 23 se presentan las curvas de calibración de los 3 días, presentándose correlaciones superiores a 0.9934 (r), sin cambios significativos en la pendiente dentro del intervalo de concentraciones evaluado. En la Tabla 23 se observan los diferentes parámetros de las curvas externas.

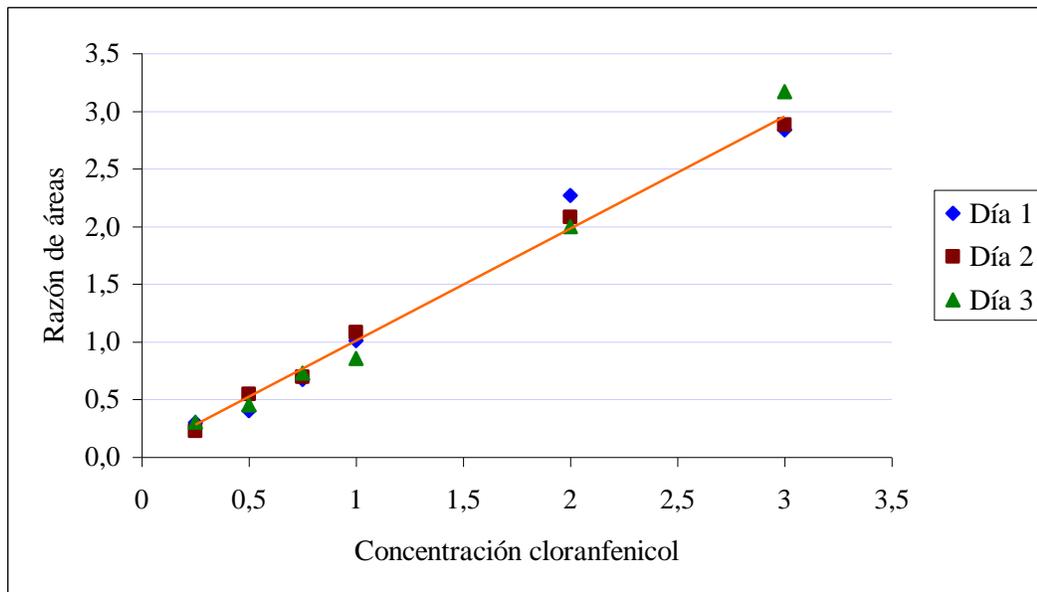


Figura 23: Curva Externa de calibración

Tabla 23: Parámetros de curva externa

Día	pendiente (m)	intercepto	r
1	1.1	-0.00318	0.9981
2	1.06	0.00494	0.9966
3	1.11	-0.078	0.9934

Dentro del intervalo de concentración estudiado no se observaron cambios significativos en la pendiente.

Luego se realiza el estudio de prueba t, para cada uno de los coeficientes de correlación de cada curva realizada. En la Tabla 24 se resumen los datos del análisis estadístico para la prueba t en las curvas externas de cloranfenicol.

Tabla 24: Estudio de prueba t para coeficientes de correlación

Curva	n	gr. libertad	r^2	r	t calc	t tab	H_0
1	6	4	0.9962	0.9981	32.4	2.132	Rechazada
2	6	4	0.9932	0.9966	24.2	2.132	Rechazada
3	6	4	0.9868	0.9934	17.3	2.132	Rechazada

Se observa en la tabla que en cada una de las curvas externas de cloranfenicol, existe una correlación lineal (se rechaza la hipótesis nula), luego existe una relación significativa entre las variables X e Y a un nivel de significancia del 95 %.

Con las curvas de calibración se obtuvieron tres pendientes (m), que permiten la obtención de los valores de sensibilidad. En la Tabla 23 se observan los valores obtenidos de las pendientes. Los que se aproximan a 1 considerando razón de áreas versus razón de concentración con respecto al patrón interno.

5.2.2 Exactitud, Precisión e Incertidumbre.

Exactitud:

La medición de la exactitud requiere la evaluación de la recuperación de cloranfenicol de cada muestra estudiada, en condiciones de repetibilidad. En la Tabla 25 se presenta el porcentaje de recuperación de cloranfenicol desde los set de muestras realizadas en los tres días diferentes, donde se obtuvo el valor t_{obs} por medio de un estudio t, de acuerdo a la ecuación (3), para n-1 grados de libertad (6-1).

Tabla 25: % de recuperación de cloranfenicol para cada set de muestras.

Muestra	Recuperación (%) Set 1	Recuperación (%) Set 2	Recuperación (%) Set 3
1	104	115	114
2	110	91.3	117
3	111	118	83.7
4	102	104	108
5	77.4	112	87.6
6	86.4	80.2	84.9
Promedio	98.5	103.4	99.2
DE	13.6	14.9	15.4
CV	13.8	14.4	15.6
t_{obs}	0.046	0.094	0.021

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que los valores de coeficientes de variación son menores a 15.6 %, esto demuestra una aceptable repetibilidad por día, ya que según el criterio de aceptación de Horwitz (ver Anexo II, ecuación 4), la repetibilidad debe ser menor a 22.63 %.

Por otra parte el t_{tabla} para un nivel de significancia de 95 % y n-1 grados de libertad corresponde a 2.015, se observa que para las condiciones de repetibilidad, los t_{obs} fueron menores a 0.094, comprobándose de esta manera la exactitud en la medición bajo condiciones de repetibilidad.

Según el criterio de aceptación AOAC para 1 ppb, el porcentaje de recuperación estimado debe encontrarse entre 40 y 120%, según los resultados promedios obtenidos por día, el porcentaje de recuperación estuvo entre 98.5 y 103.4 %, de esta forma la recuperación por set de muestras se encuentra dentro del intervalo teórico.

Veracidad:

Para su determinación, se evaluó la recuperación en condiciones de reproducibilidad, es decir, considerando el total de replicados de las muestras (18). En la Tabla 26 se observan los valores obtenidos de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y t_{obs} para el total de las muestras estudiadas.

Tabla 26: Resultados de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y t_{obs} para total de muestras (n = 18).

Promedio recuperación (%)	100.4
DE	13.9
CV	13.9
t_{obs}	0.007

Según el criterio de aceptabilidad de Horwitz, para una concentración de 1 ppb, el coeficiente de variación en condiciones de reproducibilidad es de 45.25 %, observándose un coeficiente de variación menor a 13.9 %, es decir, cumpliendo con el criterio de aceptación.

Para un nivel de significancia del 95 % y n-1 grados de libertad (18-1), el t_{tabla} corresponderá a 1.740, el t_{obs} para la recuperación en condiciones de reproducibilidad fue de 0.006, valor muy inferior al t_{tabla} , lo que demuestra una alta coincidencia entre los valores medios del total de replicados y el valor de referencia aceptado.

El promedio de recuperación fue de 100.4 %, de acuerdo al criterio de aceptación según AOAC (ver Anexo II, Tabla 2), para 1 ppb, el porcentaje de recuperación estimado debe estar entre 40 y 120 %, observándose de esta forma, que la recuperación en condiciones de reproducibilidad se encuentra dentro del intervalo teórico deseado.

Precisión:

- Repetibilidad:

Se obtienen las concentraciones de cloranfenicol de cada ensayo realizado, mediante la integración de los valores de las áreas cloranfenicol/áreas cloranfenicol-d5 y su relación con los valores de integración obtenidos en la curva de calibración. De esta manera, los valores obtenidos de concentración de cloranfenicol en cada muestra correspondieron a los observados en la Tabla 27.

Tabla 27: Concentraciones de cloranfenicol en las muestras.

Ensayo	Set 1 (ng/mL)	Set 2 (ng/mL)	Set 3 (ng/mL)
1	1.040	1.150	1.140
2	1.100	0.913	1.170
3	1.110	1.180	0.837
4	1.020	1.040	1.080
5	0.774	1.120	0.876
6	0.864	0.802	0.849
Promedio (ng/mL)	0.985	1.034	0.992
DE	0.136	0.149	0.154
CV %	13.795	14.386	15.569

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que los coeficientes de variación son menores a 15.6 %, cumpliendo con el criterio de aceptación de Horwitz, que para 1 ppb de concentración y en condiciones de repetibilidad, se estima que deben ser menores a 22.63 %.

- Reproducibilidad:

Para su determinación, será necesario el estudio de las concentraciones de cloranfenicol considerando el total de replicados de las muestras (18). En la Tabla 28 se observan los valores obtenidos de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 28: Resultados de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y t_{obs} para total de muestras (n = 18).

Promedio recuperación (%)	1.004
DE	0.139
CV	13.898

Según las estimaciones determinadas de acuerdo al criterio de aceptación de Horwitz, el coeficiente de variación en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio debe ser menor a 30.17 %, de esta forma y según los resultados obtenidos, se observa que el coeficiente de variación para el total de replicados fue de 15.569 %, es decir, cumpliendo con el criterio de aceptación.

Incertidumbre:

De acuerdo a los valores obtenidos tanto para la precisión de repetibilidad con el coeficiente de variación más desfavorable y para el sesgo por recuperación, se calcula el μ relativo tanto de repetibilidad como de recuperación, de acuerdo a la ecuación (ver Anexo II, ecuación 6), de esta forma los valores de ambos son:

$$\mu \text{ relativo de repetibilidad} = 15.569$$

$$\mu \text{ relativo de recuperación} = 13.898$$

Luego se obtiene el μ combinado de ambas, de acuerdo a la ecuación (ver Anexo II, ecuación 7), dando como resultado:

$$\mu \text{ combinado} = 16.968$$

Finalmente la incertidumbre expandida corresponderá a:

$$U = 33.936$$

Es decir, la medida de cloranfenicol en la validación, en términos de recuperación estará dada por $100.4 \pm 33.936 \%$ o bien en términos de concentración como $1.004 \pm 0.339 \text{ ng/mL}$.

5.2.3 Límite de Detección.

Relación Señal/Ruido:

En las Tablas 29 y 30, se observan las relaciones señal/ruido para las distintas concentraciones de las curvas de calibración y se observa la relación señal/ruido para los distintos grupos de muestras, calculados a partir de la señal que genera la transición minoritaria de cloranfenicol (321/257). De acuerdo a estos resultados, todos los puntos y muestras estudiados poseen una relación señal/ruido mayor a 3.

Tabla 29: Relaciones señal/ruido para los distintos puntos de la curva de calibración.

Estándar (ng/mL)	Día 1	Día 2	Día 3
0.25	22.1	68	37.3
0.5	56.8	56.3	115.2
0.75	143.1	136.5	142.9
1	175	170	243.1
2	297.5	492.1	189.6
3	639.4	587.9	761

Se observa que la relación señal/ruido a todos los niveles de concentración fue superior a 3, si se extrapolase ese valor de relación, la concentración debiese ser aproximadamente 7 veces inferior, es decir, estaría entre los 10 y 36 pg/mL. Es posible que a niveles tan bajos de concentración, la fluctuación de la señal/ruido pudiese ser mucho mayor, por lo que en esas condiciones, es difícil asegurar la calidad de los resultados.

Tabla 30: Relaciones señal/ruido para cada una de las muestras estudiadas.

Estándar (1 ng/mL)	Día 1	Día 2	Día 3
Ensayo 1	38.5	58.8	73.4
Ensayo 2	32	70.7	57.8
Ensayo 3	62.6	29.1	27.2
Ensayo 4	46.2	23.3	87
Ensayo 5	50.9	45	49.3
Ensayo 6	24.5	52.9	55.2
X	42.5	46.6	58.3
DE	13.7	18.0	20.5
CV %	32.3	38.6	35.2

Se observa que los valores de los ensayos que poseen teóricamente una concentración de cloranfenicol de 1 ng/mL, poseen una relación señal/ruido inferior a la mostrada por un estándar de 1 ng/mL, esto ocurre por la influencia que posee el florfenicol de la muestra, que se encuentra en una alta concentración (teórica de 10 µg/mL), que genera una supresión de la señal instrumental de cloranfenicol. Si bien este efecto es notorio, no posee ninguna influencia mayor sobre la determinación de trazas de cloranfenicol, ya que este criterio es cualitativo y sólo debe ser la señal/ruido superior a 3. Por otra parte se ve una alta variación entre cada grupo de muestras (CV% > 30%), esto ocurre por la competencia en el proceso de ionización, que determina la variación entre las señales analíticas obtenidas y los ruidos generados. Al igual que en el efecto anterior, estos valores al pertenecer a un criterio cualitativo, no poseen mayor significancia.

Tiempos de retención:

Se observa en la Tabla 31, los promedios de los tiempos de retención del cloranfenicol de cada curva de calibración y sus tolerancias permitidas de $\pm 2.5\%$. Se observa similitud entre las curvas, con tiempos de retención promedio de 6.29 y 6.28 minutos.

Tabla 31: Tiempos de retención de las curvas de cloranfenicol.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3
X tr (min)	6.29	6.28	6.28
+ 2,50% (min)	6.45	6.44	6.44
- 2,50% (min)	6.14	6.13	6.13
X tr relativo (min)	1.0021	1.0021	1.0019
+ 2,50 % (min)	1.0272	1.0272	1.0269
- 2,50 % (min)	0.9770	0.9770	0.9769

En la Tabla 32 se presentan los tiempos de retención del cloranfenicol para cada set de muestras, en esta tabla se observa el comportamiento del tiempo de retención de los ensayos realizados, teniendo como límites de tolerancia, los planteados por la Tabla 31, para cada set de muestra, corresponde cada curva de calibración.

Tabla 32: Tiempos de retención de cloranfenicol para cada set de muestras.

Nº de muestra	tr Set 1 (min)	tr Set 2 (min)	tr Set 3 (min)
1	6.31	6.28	6.28
2	6.31	6.30	6.28
3	6.28	6.28	6.30
4	6.29	6.30	6.28
5	6.29	6.28	6.28
6	6.30	6.28	6.28
X	6.30	6.29	6.28
DE	0.01	0.01	0.01
CV %	0.19	0.16	0.13

Como se observa en la tabla anterior, los tiempos de retención del cloranfenicol de las muestras se encuentran dentro de los límites de tolerancia. Los cambios en los tiempos de retención dependen principalmente de las fases móviles, con sus modificadores orgánicos y sus proporciones, además del flujo utilizado. Lo anterior demuestra que el gradiente utilizado es reproducido con gran exactitud para muestras sucesivas. Por otra parte el florfenicol en altas concentraciones, no alteró el tiempo de retención del cloranfenicol.

Tiempos de retención relativos:

En la Tabla 31, se incluyen los resultados de los tiempos de retención relativos de cada set de curvas de calibración y sus tolerancias permitidas de ± 2.5 %. En la Tabla 33 se observan los tiempos de retención relativos de cada set de muestra.

Tabla 33: Tiempos de retención relativos de cloranfenicol para cada set de muestras.

Nº de muestra	tr Rel. Set 1	tr Rel. Set 2	tr Rel. Set 3
1	1.0032	1.0016	1.0016
2	1.0032	1.0032	1.0016
3	1.0016	1.0016	1.0032
4	1.0016	1.0032	1.0032
5	1.0016	1.0032	1.0016
6	1.0032	1.0000	1.0000
X	1.0024	1.0021	1.0019
DE	0.0009	0.0013	0.0012
CV %	0.0868	0.1299	0.1198

Al igual que lo ocurrido con los tiempos de retención, se observa que los tiempos de retención relativos se encuentran dentro de los límites de tolerancia. El tiempo de retención del estándar interno cloranfenicol-d5, no es alterado por la presencia de otro analito (florfenicol) en alta concentración.

Ratios²:

Se observa en la Tabla 34, los ratios de las transiciones de cloranfenicol, de las concentraciones de cada set de curva de calibración, los promedios de los ratios, la intensidad relativa promedio y las tolerancias permitidas. Se observa que los promedios de los ratios de cada curva son superiores a 0.40 pero menores que 0.50, sus intensidades relativas por ende están en el intervalo de > a 20% - 40%, intervalo al cuál le corresponde un $\pm 25\%$ de tolerancia (ver Anexo II, Tabla 3). De esta forma, las intensidades relativas de los set de muestras deben estar dentro de las tolerancias obtenidas a partir de la curva correspondiente al set de muestras.

² Correspondiente a la Razón entre la intensidad de la transición minoritaria y la transición mayoritaria del cloranfenicol.

Tabla 34: Ratios de cloranfenicol de las curvas de calibración.

Concentración (ppb)	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,25	0.42	0.47	0.37
0,5	0.33	0.41	0.46
0,75	0.38	0.47	0.37
1	0.46	0.44	0.46
2	0.47	0.46	0.43
3	0.40	0.44	0.37
Ratios			
Promedio	0.41	0.45	0.41
I.R. (%)	41.04	44.56	41.13
+ 25 %	51.30	55.70	51.41
- 25 %	30.78	33.42	30.84

La Tabla 35 presenta los valores de intensidad relativa de cada set de muestras. Se observa que el comportamiento de las intensidades relativas del cloranfenicol, se encuentran dentro de lo comprendido como límites. No se encuentra influencia por parte del florfenicol en las medidas de intensidad relativa. Presentar una estabilidad dentro de los límites de tolerancia, significa que las muestras y las soluciones utilizadas, no se encuentran descompuestas o vencidas, además demuestra que el espectrómetro de masas está trabajando de forma óptima y la detección y cuantificación de las trazas de cloranfenicol pueden ser efectivamente posibles.

Tabla 35: Intensidad relativa de cloranfenicol para cada set de muestras.

Nº de muestra	IR Set 1	IR Set 2	IR Set 3
1	38,28	51,97	40,53
2	39,22	43,28	40,47
3	50,92	41,72	46,34
4	43,89	42,12	42,25
5	38,98	34,42	49,26
6	42,58	40,03	48,01
X	42,31	42,26	44,48
DE	4,77	5,69	3,88
CV %	11,26	13,47	8,73

Finalmente el límite de detección de cloranfenicol en productos farmacéuticos de uso veterinario, es menor a 0.25 ng/mL, demostrado en la medición de la relación señal/ruido, sin embargo, considerando que 0.25 ng/mL de cloranfenicol está dentro del rango lineal y cumple con todos los criterios de aceptación para la obtención del límite, se considerará 0.25 ng/mL como el límite de detección empírico, que asegura la calidad de los resultados. Se podría establecer otro límite de detección, a través de expresiones matemáticas (ecuación 9, Anexo II), que podrían sobreestimar la capacidad de los equipos, o simplemente no cumplir con los criterios de aceptación y confirmación de las muestras por espectrometría de masas/masas.

5.3 Análisis de muestras de productos farmacéuticos de uso veterinario que contienen florfenicol como principio activo.

Con la metodología validada se analizaron las muestras de materias primas y de productos farmacéuticos terminados. Los resultados obtenidos para cada set de muestras se encuentran detallados en la Tabla 36.

Tabla 36: Concentración de cloranfenicol en muestras de productos farmacéuticos de florfenicol.

Muestra	Set 1	Set 2
	CAP (ng/g)	CAP (ng/g)
MP Emp 2	n/d ³	n/d
MP Emp 3	n/d	n/d
MP Emp 4	n/d	n/d
PT Emp 1 S1	n/d	n/d
PT Emp 2 S1	n/d	n/d
PT Emp 2 S2	n/d	n/d
PT Emp 3 S1	n/d	n/d
PT Emp 3 S2	n/d	n/d
PT Emp 4 S1/1	n/d	n/d
PT Emp 4 S1/2	n/d	n/d
PT Emp 4 S2/1	n/d	n/d
PT Emp 4 S2/2	n/d	n/d

De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla, ninguna muestra resultó positiva a cloranfenicol, en la Figura 24 se observa el cromatograma del control positivo de cloranfenicol, en las Figuras 25 y 26 se pueden observar cromatogramas correspondientes a las transiciones de cloranfenicol de una materia prima y de un producto terminado.

³ n/d: no detectado

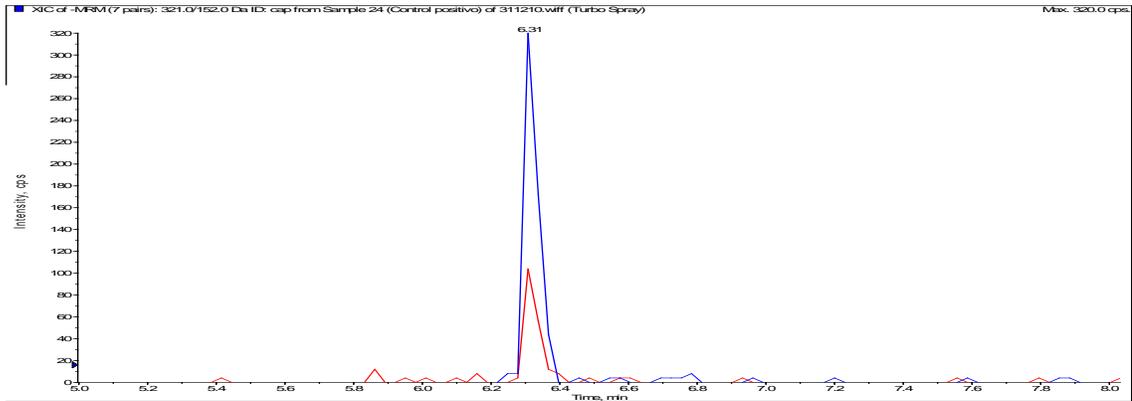


Figura 24: Cromatograma correspondiente a control positivo de cloranfenicol a un nivel 1 ng/mL.

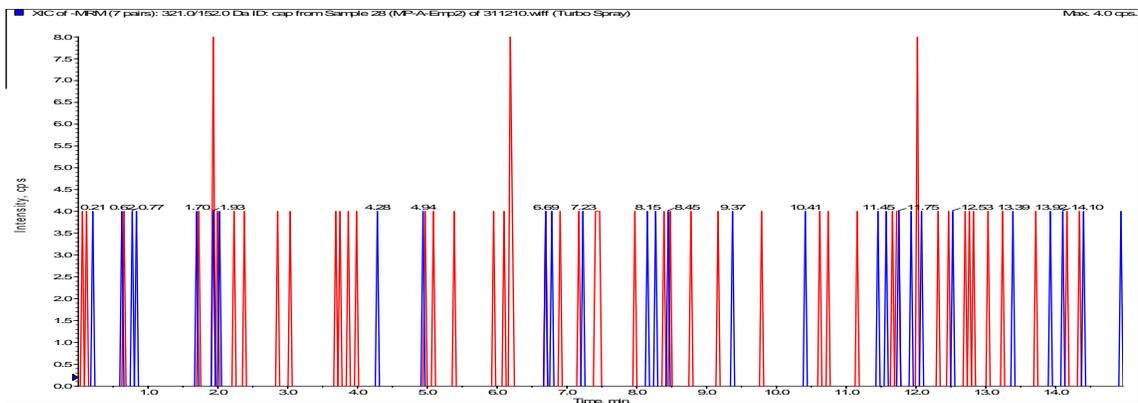


Figura 25: Cromatograma correspondiente a muestra de materia prima (MP Emp2 de set 1) de cloranfenicol.

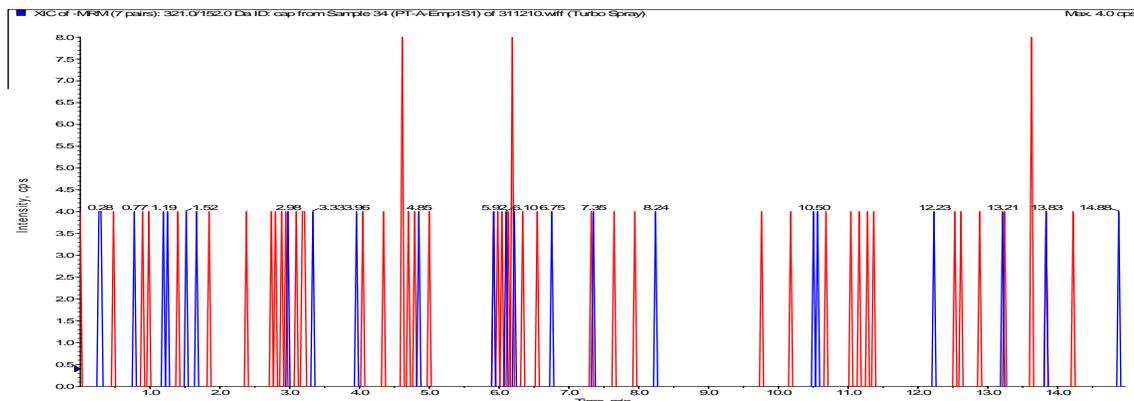


Figura 26: Cromatograma correspondiente a muestra de producto terminado (PT Emp1 de set 1) de cloranfenicol.

Según las figuras anteriores, se observa en ambas muestras que al tiempo de retención del cloranfenicol expuesto en el cromatograma del control positivo, correspondiente a 6.31 min., no se observa ningún peak cromatográfico detectable y cuantificable. Al analizar las muestras referentes a otros fenicoles, se pudo observar la presencia de tianfenicol en todas las muestras estudiadas que desarrolla un peak cromatográfico a los 5.96 min. aproximadamente, es decir, todas las muestras resultaron ser positivas a tianfenicol, inclusive en el control positivo de cloranfenicol, realizado sólo con estándar de florfenicol y cloranfenicol.

Se decidió estudiar el estándar de florfenicol utilizado y compararlo con otro estándar de florfenicol presente en el laboratorio, el cual presenta una fecha de elaboración más cercana, mientras que el utilizado en el estudio, está más cercana a la fecha de caducidad, pensando en que pudiese existir algún tipo de descomposición de florfenicol a tianfenicol.

Los resultados cromatográficos de este estudio se demostraron similares entre los estándares, con un nivel de intensidad aproximadamente similar (en cuentas por segundo), de acuerdo a lo mostrado en los cromatogramas de las Figuras 27 y 28, por lo que la presencia de tianfenicol en los estándares de florfenicol, no son debido a descomposición, sino que podrían estar asociados a la síntesis de florfenicol, este resultado permite seguir utilizando el estándar de florfenicol, para futuros estudios.

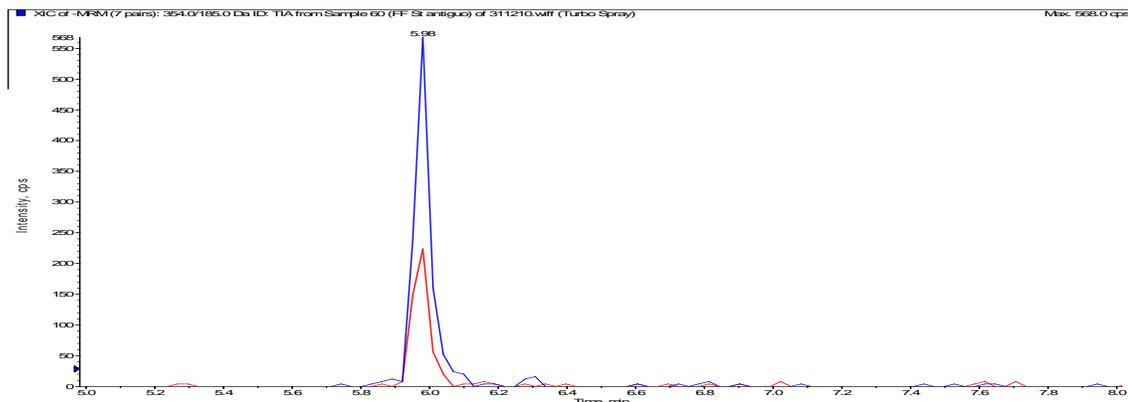


Figura 27: Cromatograma de tianfenicol en estándar de florfenicol cerca de fecha de caducidad.

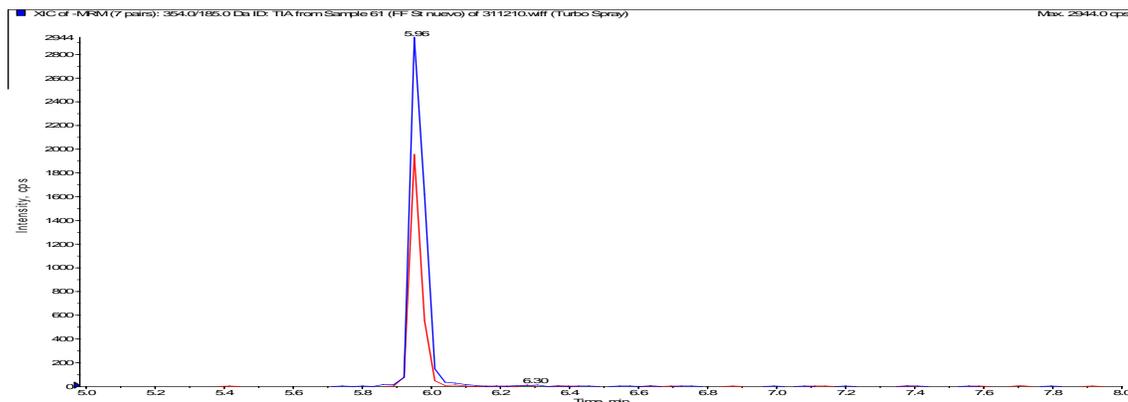


Figura 28: Cromatograma de tianfenicol en estándar de florfenicol cercano a la fecha de elaboración.

Para la cuantificación de las muestras, será necesaria la preparación de una curva de calibrado de tianfenicol, esta curva se resuelve hacerla en matriz, puesto que no consideraría concentración por recuperación, sino que por interpolación de la razón de área analito/área estándar interno obtenido por cada muestra, siendo un valor corregido y directo. Para esto se decide estudiar 5 puntos de concentración distinta de tianfenicol, se pesan 5 veces aproximadamente 10 mg de estándar de florfenicol, que son traspasados a matraces de aforo de 10 mL con acetonitrilo/agua 30/70, se fortifican cuatro de estos matraces con alícuotas de 0, 50, 100, 200 y 500 μL de una solución de tianfenicol de concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo concentraciones de 0, 0.5, 1, 2 y 5% de tianfenicol en florfenicol y agregados a estos una alícuota de 1000 μL de cloranfenicol-d5 en una concentración de 1000 ng/mL y aforados los

matraces en el mismo vehículo. Luego se tomo una alícuota de 100 µL de cada una de las soluciones de las muestras y fueron llevadas a un matraz de aforo de 10 mL, cada muestra fue también aforada en el mismo vehículo utilizado anteriormente. Posteriormente fueron filtrados en membrana de 0,22 µm y depositados en viales previamente rotulados para realizar el análisis instrumental por LC-MS/MS.

La Tabla 37 presenta los resultados de la cuantificación de tianfenicol en las muestras de materias primas y productos terminados de florfenicol.

Tabla 37: Concentración de tianfenicol en muestras de productos farmacéuticos de florfenicol.

Muestra	Set 1	Set 2
	TAP (% ⁴)	TAP (%)
MP Emp 2	0.421	0.449
MP Emp 3	0.477	0.432
MP Emp 4	0.419	0.475
PT Emp 1 S1	0.216	0.214
PT Emp 2 S1	0.212	0.238
PT Emp 2 S2	0.207	0.213
PT Emp 3 S1	0.232	0.211
PT Emp 3 S2	0.214	0.215
PT Emp 4 S1/1	0.258	0.229
PT Emp 4 S1/2	0.265	0.259
PT Emp 4 S2/1	0.237	0.210
PT Emp 4 S2/2	0.312	0.226

Se observa que las materias primas poseen entre un 0.419 y 0.475 % de tianfenicol, por su parte los productos terminados presentan una impureza de tianfenicol entre 0.207 y 0.319 %, coincidente con los resultados a las materias primas, ya que corresponden al doble en peso. En la

⁴ Porcentaje referido a mg de tianfenicol en g de materia prima o producto terminado.

Figura 29 y 30 se observan cromatogramas de tianfenicol para materias primas y productos terminados.

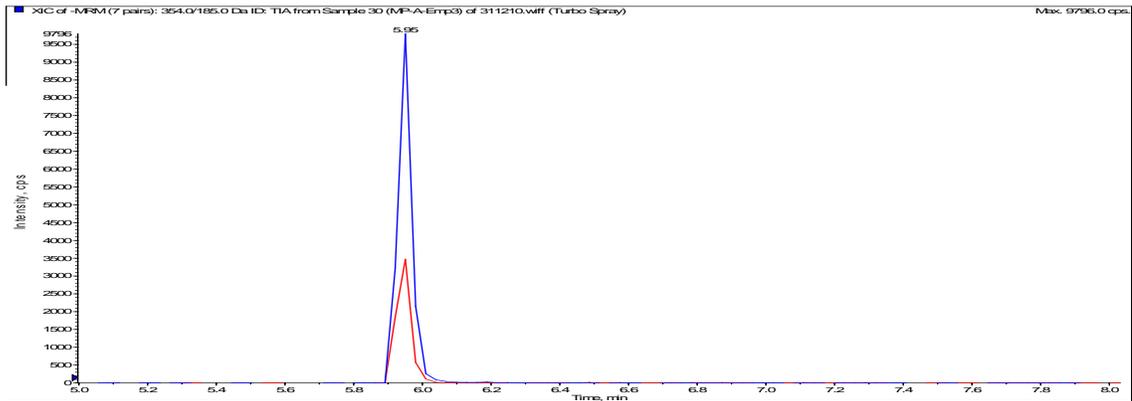


Figura 29: Cromatograma de tianfenicol en materia prima de empresa 3 (MP Emp 3).

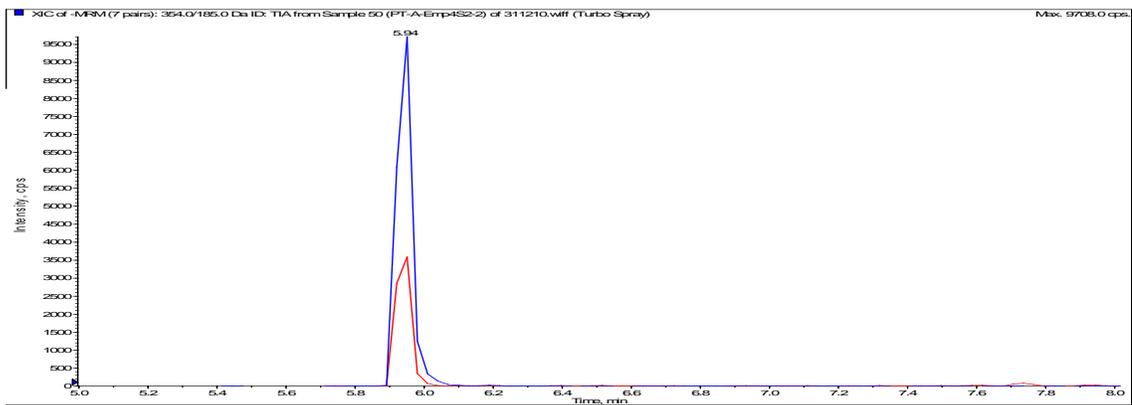


Figura 30: Cromatograma de tianfenicol en producto terminado de empresa 4 (PT Emp 4 S.2-2).

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Los espectros de primer y segundo orden, junto con cada uno de los parámetros de voltaje y las energías de colisión optimizadas son adecuadas para la determinación de florfenicol, cloranfenicol, cloranfenicol-d5, tianfenicol y florfenicol amina.
- En los espectros de segundo orden, se encontró un fragmento representativo para cloranfenicol y tianfenicol, correspondiente a $[M-CHCH_2OHNHCOCHCl_2-H]^-$, donde M es el analito y para el florfenicol el fragmento $[FF-CHCH_2FNHCOCHCl_2-H]^-$. Siendo ambas especies representativas de los fenicoles.
- Se obtuvo un fragmento característico para cloranfenicol y tianfenicol correspondiente a $[M-COHCi-H]^-$.
- De todos los analitos estudiados, el tianfenicol presentó la más baja ionización, que influyó directamente en su cuantificación, al poseer una sensibilidad, intensidad y área más baja, coincidente con los grupos funcionales de su estructura química, polaridad y menor valor de pKa.
- La metodología de análisis cromatográfica resultó ser sensible y reproducible para la determinación de florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol a través de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección MS/MS, utilizando una elución en gradiente y una fase móvil consistente en acetonitrilo-formiato de amonio y agua-formiato de amonio.
- El desdoblamiento ocurrido por los peaks cromatográficos de florfenicol, en las soluciones multiestándares que contienen florfenicol y tianfenicol, se debe a la presencia de isótopos de cloro (^{37}Cl) en la molécula de tianfenicol.
- Se validó la metodología de análisis mediante el desarrollo de un plan de validación para una impureza de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos de florfenicol

a un nivel de 1×10^{-4} %. La metodología validada en términos de recuperación está dada por $100.4 \pm 34\%$ o bien en términos de concentración como 1.004 ± 0.3 ng/mL, demostrando una incertidumbre de 33.9%.

- La validación de este método permite establecer que cumple con todos los criterios de aceptación establecidos por la Comunidad Europea.
- Se estudiaron 12 muestras totales de materias primas y productos terminados de florfenicol, siendo todas negativas a cloranfenicol, pero positivas a tianfenicol, en concentraciones que van desde 0.419 y 0.475 % para materias primas y entre 0.207 y 0.319 % para productos terminados.
- Los niveles de tianfenicol detectados son residuales dentro de las materias primas y productos farmacéuticos terminados, confirmando la hipótesis planteada en este trabajo. Su detección en salmones de consumo humano, podría deberse a su presencia en productos farmacéuticos de uso veterinario de florfenicol, este estudio sirve de antecedente frente a esta problemática.
- La información entregada en este trabajo será de gran relevancia al momento de poner en marcha un plan de detección de impurezas de medicamentos veterinarios, el cual deberá considerar aspectos de similitud estructural de los medicamentos, síntesis orgánica de éstos y datos farmacocinéticas llevados a los LMR y MRPL exigidos en alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero M, Deluca K, Timmis F, Cabello F. A plasmad-encoded outer membrane protein Tra T, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. Rev Infect: Immune 46: 740-746. 1984.
2. Araujo J, Mediavilla A Tetraciclinas y Cloranfenicol. Farmacología Humana (2da ed) Ediciones Científicas Salvat, España. Tomo II 1029-1036 pp. 1984.
3. Barnes A.C., Hasting T.S. Fish Diseases. Journal of Fish Diseases 17: 357-363. 1994.
4. Bravo S., Dolz H., Silva M., Lagos C., Urbina M. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Universidad Austral, Instituto de Acuicultura Chile 28: 13-17. 2005.
5. Buschmann A., Riquelme V., Hernández-González M., Varela D., Jiménez J., Henríquez L. A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. ICES J. Marine Sci 63: 1338-1345. 2006.
6. Buschmann A., Cabello F., Young K. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. Ocean and Coastal management. 1-7. 2009.
7. Cabello F. Antibióticos y acuicultura. Un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente, salud humana y animal en Chile. Análisis de Políticas Públicas, Serie APP 17:16 pp. 2003.
8. Cabello F. Antibióticos y acuicultura en Chile: Consecuencias para la salud humana y animal. Rev Méd Chile 132:1001-1006. 2004.
9. Cabello F. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbial 8:1137-1144. 2006.

10. Consejo Unión Europea, Directiva 96/23/CE. Diario Oficial Comunidad Europea. 1996.
11. Consejo Unión Europea, Directiva 2002/657/CE. Diario Oficial Comunidad Europea. 2002.
12. Consejo Unión Europea, Límites mínimos de funcionamiento exigidos. Diario Oficial Comunidad Europea. 2003.
13. Dalsgaard I., Nielsen B., Larsen J. Characterization of *Aeromonas salmonicida*: Comparative Study of Strains of Different Geographic Origin. Journal Appl. Bacteriology 77:21-30. 1994.
14. De Brabander H., Noppe H., Verheyden K. Residue analysis: future trends from a historical perspective. Journal of Chromatography A. 1216: 7964-7976. 2009.
15. EMEA, Florfenicol. Committee for veterinary medicinal products. 2000.
16. Forti A.F., Simonella A., Multari M., Scortichini G. Determination of chloramphenicol in Money by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Chimica Acta, 529: 257-263. 2004.
17. Fortt A., Cabello F. Y., Buschmann A. Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. Rev Chilena Infectología 24 (1):14-18. 2007.
18. Florez, J., Farmacología Humana. Cloranfenicol. 4ta Edición. Ed. Masson. 2003.
19. Garrido A., González F., Arrejola F., Martínez J. Potentiality of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables. Anal Chem. 77:4640-4648. 2007.
20. Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena Edición. Ed. Mc Graw Hill. 1193 - 1224. 2003.

21. Grave K., Lingass E., Bangen M., Ronning M. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:243-252. 1999.
22. Hektoen H., Berge J., Hormazabal V., Yndestad M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133:175-184. 1995.
23. Hoffmann E., Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. Second Edition. Ed. Wiley. 2002.
24. ISO 17025. General requirement for the competence calibration and testing laboratories. 1999.
25. Jansson C., Pihlstrom T., Marquides K. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr* 1023:93-104. 2004.
26. Jianzhong Shen, Haiyang Jianga, Cun Li., Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 877: p. 1523 - 1529. 2009.
27. Ley 18892. Ley General de Pesca y Acuicultura. *Diario Oficial*. 1991.
28. Niessen W. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr* 1000:313-436. 2003.
29. Núñez O., Moyano E., Galcerán M. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Anal. Chem.* 24:683-703. 2005.

30. Oka H., Nakazawa H., Harada H. Chemical analysis of antibiotics used in agriculture. *J Agric Food Chem* 204:31-46. 1995.
31. Pascal Mottier, V.P., Eric Gremaud., Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 994: p. 75 - 84. 2003.
32. Pharmacists, A.S.o.H.-S., *Monograph - Chloramphenicol, Chloramphenicol Sodium Succinate* Medscape Drug Reference, 1959 - 2009.
33. Pezza L. Ríos A. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínica micelar. *Quim. Nova*. 29: 926-931. 2006.
34. Rios A. Biodisponibilidad y metabolismo de un derivado fluorado del tianfenicol en pollos broiler. Universidad Complutense de Madrid. 2004.
35. Sorum H., L'abee-Lund T. Antibiotic resistance in food related bacteria, a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol* 78:43-56. 2002.
36. Sorum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Aarestrup ed. Washington 13:213-238. 2006.
37. Soto D., Norambuena F. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a largescale mensurative experiment. *J Appl Ichthyol* 20:493-501. 2004.
38. Suxia Zhang, Z.L., Xia Guo, Linli Cheng, ZhanhuiWang, Jianzhong Shen. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2008. 875: p. 399 - 404. 2008.

39. Tekel J, Reig M (2006) Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods; clean-up procedures and selective detectors. *Journal Chromatography A* 754:397-410.
40. Wolff M. Uso y abuso de antibióticos. Momento de su evaluación, más allá del ser humano. *Rev Méd Chile* 132:909-911. 2004.
41. Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1143:48-64. 2007.

ANEXO I

1. Espectrometría de primer orden, segundo orden y patrones de fraccionamiento.

Para obtener los espectros de primer y segundo orden, incluidos los patrones de fraccionamiento del ión molecular, debe activarse el perfil Mass Spec Only, en dicha condición sólo se trabaja con el espectrómetro. Los analitos son ingresados individual y directamente al espectrómetro a través de una infusión realizada desde una jeringa acoplada a la bomba de infusión. Los analitos ingresaron con una caudal de 25.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm) en acetonitrilo/agua 50/50, se usó como aditivo de ionización formiato de amonio 10 mM.

Los espectros de primer y segundo orden son representaciones gráficas entre la intensidad y la distribución de masas en un intervalo expresadas como relación masa/carga (m/z). En el primer caso se representa al ión molecular ($[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) y en segundo caso los fragmentos obtenidos desde el ión molecular ($[\text{M}-\text{X}-\text{H}]^-$, $[\text{M}-\text{X}+\text{H}]^+$).

1.1 Espectros de primer orden (MS).

La búsqueda de los iones padres o precursores de florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol se realizó en modo electrospray negativo (ESI⁻), ya que estos analitos poseen halógenos y grupos hidroxilos que tienen alta electronegatividad y la sensibilidad por ellos aumenta en este modo, en cambio el florfenicol amina se realizó en modo electrospray positivo (ESI⁺) puesto que posee un grupo amino que es más sensible en este modo. En el modo ESI⁻ el ión molecular se desprende de un protón dando una señal con relación masa/carga (m/z) igual al peso molecular menos la pérdida de una unidad de masa del protón $[\text{M}-\text{H}]^-$. En el modo electrospray positivo el ión molecular capta un protón, aumentando la relación masa/carga en una unidad de masa más que su peso molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Como primera aproximación fueron infundidos cada uno de los analitos en forma individual para observar la presencia del ión molecular ($[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) en el modo Q1 MS para cada uno de los analitos estudiados. Los valores de los parámetros Dp (Declustering potential), Ep

(Entrance potential) y Cep (Collision cell entrance potential) utilizados fueron por defecto. Tales parámetros son dependientes del ión molecular y son explicados a continuación y representados en la Figura 1:

- Dp es un parámetro que controla la diferencia de potencial entre el exterior (usualmente el skimmer) y el orifice plate. Este es usado para minimizar los iones que producidos por los solventes puedan interferir a los analitos. Si el voltaje es elevado, la fragmentación se ve favorecida, inclusive el mismo ión del analito podría llegar a fragmentarse.
- Ep corresponde a la diferencia de potencial entre el Q0 y el exterior. El potencial de entrada guía y focaliza los iones a través de alto vacío en la región Q0.
- Cep es la diferencia de potencial entre Q0 e IQ2. Donde q2 corresponde a la celda de colisión.

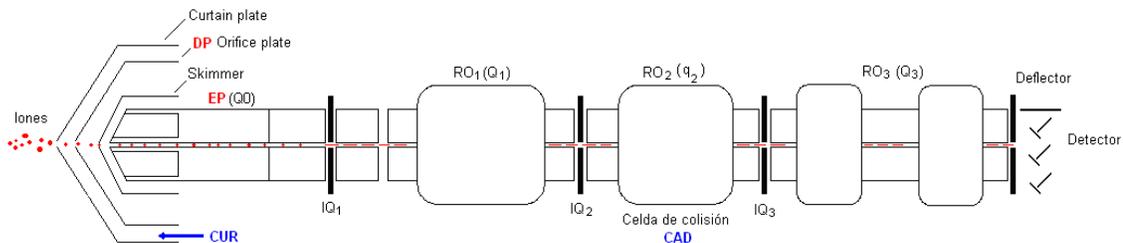


Figura 1: Espectrómetro de masas.

En la figura se observa ejemplificado el espectrómetro de masas, el cual está dotado de tres barreras físicas: Curtain plate, Orifice plate y Skimmer. El Curtain plate corresponde a la barrera más externa de acero inoxidable, con un orificio central, luego se observa el Orifice plate correspondiente a una barrera de porcelana, que también posee un orificio central de menor diámetro y finalmente el Skimmer también de acero inoxidable. Se observa los tres cuádrupolos: Q1, q2 y Q3, dónde Q1 actúa como el primer filtro de masas, es allí dónde se observa el espectro de primer orden, q2 corresponde a la celda de colisión, lugar donde ocurre la fragmentación del ión molecular y Q3 es el tercer filtro de masas, dónde se obtienen los fragmentos producidos por la celda de colisión.

Se realiza un scan entre 100–600 Da para cada uno de los analitos con 1 segundo de tiempo de barrido. Una vez observado el ión molecular y definido su relación m/z exacta, se procedió a optimizar en el modo Q1 MI, a través de rampas los parámetros Dp, Ep y Cep. Los intervalos de trabajo para la rampa de cada parámetro se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1: Intervalo de trabajo de cada parámetro.

Analito	Dp (Volts)	Step Dp	Ep (Volts)	Step Ep	Cep (Volts)	Step Cep
FF	-400 a 0	10	-12 a 0	1	-190 a -10	10
TAP	-400 a 0	10	-12 a 0	1	-190 a -10	10
CAP	-400 a 0	10	-12 a 0	1	-190 a -10	10
CAP - d5	-400 a 0	10	-12 a 0	1	-190 a -10	10
FFA	0 a +400	10	0 a +12	1	+10 a +190	10

Una vez optimizados los valores de Dp, Ep y Cep de cada analito, se realizó un nuevo scan entre 100 y 600 Da en el modo Q1MS, pero esta vez en un modo MCA con 10 ciclos, los espectros resultantes de cada ciclo se sobrepone sobre el ciclo anterior, resultando una sumatoria de 10 ciclos.

1.2 Espectros de segundo orden (MS₂).

Conocidas las relaciones m/z exacta del ión molecular de cada uno de los analitos y los valores óptimos de Dp, Ep y Cep, se obtuvieron diferentes fragmentos o iones hijos en el modo MS₂, a través de rampas de CE (Collision Energy). Este parámetro sólo es usado en el modo MS₂ que produce el fraccionamiento del ión molecular. La energía de colisión entonces es la cantidad de energía que los iones precursores reciben mientras son acelerados dentro de la celda de colisión, donde los analitos colisionan con moléculas de gas N₂ y se fragmentan.

Los patrones de fraccionamiento se obtuvieron realizando rampas de CE para cada ión molecular, que de acuerdo a la Decisión de la Comisión Europea, considera 2 fragmentos representativos: uno con fines de cuantificación (ión mayoritario) y otro con fines de

confirmación (ión minoritario), mientras que los analitos utilizados como estándares internos, se considera tan solo un fragmento representativo.

Una vez seleccionados dos transiciones por cada analito se optimizó en el modo MRM los parámetros dependientes de los fragmentos (iones hijos), CE y CXP (Collision cell exit potential), donde CXP corresponde al parámetro que controla la diferencia de potencial entre RO2 e IQ3. Donde estos transmiten los iones fuera de Q3. La optimización de estos parámetros considera los iones moleculares y las transiciones representativas de cada analito. Con ambos parámetros óptimos se busca obtener una mayor respuesta instrumental en cada una de las transiciones. El intervalo de trabajo utilizado en la búsqueda de CE y de CXP queda detallado en la Tabla 2.

Tabla 2: Intervalo de trabajo de los parámetros CE y Cxp.

Analito	CE (Volts)	Step CE	CXP (Volts)	Step CXP
FF	-130 a -5	10	-20 a 0	1
TAP	-130 a -5	10	-20 a 0	1
CAP	-130 a -5	10	-20 a 0	1
CAP - d5	-130 a -5	10	-20 a 0	1
FFA	+130 a +5	10	+200 a +0	1

1.3 Realización y optimización de la fuente de iones.

Luego de obtener 2 transiciones para cada analito en el modo MRM, fueron optimizados los parámetros dependientes de la fuente de iones, lugar donde se produce la transmisión desde el estado líquido de la fase móvil al estado gaseoso, que corresponden en orden de optimización a CAD, IS (ionspray voltage), GS1 (Gas 1), GS2 (Gas 2) y TEM (Temperatura), parámetros que serán explicados a continuación:

- CAD gas: Controla la presión del gas de colisión en la celda de colisión para scans del tipo MS/MS. El gas de colisión actúa como un blanco para fragmentar los iones precursores.

Cuando los iones padres colisionan con el gas de colisión, ellos pueden disociarse a fragmentos.

- IS: Controla el voltaje aplicado sobre el capilar que ioniza la muestra en la fuente de iones. Este es dependiente de la polaridad y estructura química del analito y afecta la estabilidad del spray y la sensibilidad.
- GS1: Controla el gas de nebulización. Este gas ayuda a generar pequeñas gotas de muestras que fluyen y afectan la estabilidad del spray y la sensibilidad.
- GS2: Controla el gas auxiliar o turbo, usado para ayudar a evaporar las gotas de spray y prevenir la entrada de solvente al equipo.
- TEM: Controla la temperatura de GS2 en el TurboIonSpray. Es usado para ayudar a evaporar el solvente para producir los iones de la muestra en fase gaseosa.

Los intervalos de trabajo para la optimización de cada uno de los parámetros están detallados en la Tabla 3.

Tabla 3: Intervalo de trabajo para la optimización de los parámetros.

Parámetro	Intervalo
CAD	1 – 10
IS ⁵	±3000 – ±4500
GS1	10 – 50
GS2	10 – 50
TEM	100 – 600° C

Para fines de la optimización de estos parámetros, el espectrómetro trabajó en el modo Mass Spec Only, con la participación independiente del HPLC, desde este último se inyecta en forma

⁵ El modo de ionización depende de la estructura química de los analitos, siendo positivo para aquel analito que se protona (FFA) o negativo para aquél que dona un protón (FF, TAP y CAP).

sucesiva la solución que contiene los analitos, 60 veces desde el autosampler, a través de la bomba de flujo ingresará la fase móvil. La unión del HPLC con el espectrómetro de masas se realiza a través de una unión doble hembra. Las condiciones de trabajo del HPLC fueron:

Flujo	: 0,25 ml/min.
Tiempo de análisis	: 0,25 min.
Fase móvil	: 10% acetonitrilo, 90% agua para Florfenicol amina. 50% acetonitrilo y 50% agua para la mezcla de fenicoles.
Inyección	: 10 uL.
Draw Speed	: 250 uL/min.
Eject Speed	: 250 uL/min.
Temperatura del horno	: 40° C (izquierda y derecha).

La optimización del FIA puede darse en forma positiva (ESI⁺) o en forma negativa (ESI⁻) pero no de forma simultánea, por lo que su optimización se realizará primero para los analitos que ionizan en forma negativa (florfenicol, cloranfenicol y tianfenicol) luego el analito que ioniza en forma positiva (florfenicol amina).

Ambas soluciones para realizar la infusión tienen una concentración de 10 ng/mL en la misma composición de fase móvil dependiendo de su forma de ionización.

Para que el valor de un parámetro sea óptimo debe alcanzar la máxima intensidad de detección del o los analitos. Una vez optimizado un parámetro, el valor reemplaza al valor asignado por defecto y se continúa con el siguiente parámetro a optimizar. Finalmente el último parámetro optimizado fue la temperatura, la cual posee una gran influencia en la intensidad, tal influencia no dejaría observar cambios en la intensidad provocados por los otros parámetros.

ANEXO II

1. Validación de metodología para la determinación de impurezas de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos que contienen florfenicol.

La validación de un método analítico es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Además asegura la calidad de los resultados, ya que los hace reproducibles y comparables, estableciendo características de funcionamiento y las limitaciones del método, así como la identificación de influencias que puedan cambiar dichas características. Los métodos se pueden validar según diferentes directrices, como la Decisión de la Comisión N° 2002/657/CE.

La Decisión de la Comisión, declara criterios de funcionamiento de métodos analíticos: linealidad (curva de calibración), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, veracidad, incertidumbre, sensibilidad, límites de detección y límite de cuantificación. En especial para la cuantificación y confirmación de residuos de medicamentos de uso veterinario. Para cada analito fueron monitoreadas dos transiciones, una con fines de cuantificación y otra con fines de confirmación, cumpliendo con los cuatro puntos de identificación exigidos con este propósito. Los criterios de confirmación para las metodologías analíticas realizadas por LC-MS/MS son: tiempo de retención, tiempo de retención relativo, ratios (cuociente de intensidad entre transición minoritaria y transición mayoritaria) y señal/ruido.

Para cumplir con dichos parámetros se diseñó un plan de validación, considerando una impureza de cloranfenicol en materias primas y productos farmacéuticos de florfenicol como principio activo a un nivel de $1 \times 10^{-4}\%$, de un valor positivo de cloranfenicol en el límite mínimo de funcionamiento exigido ($MRPL = 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Los ensayos fueron realizados en tres set de muestras tanto en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad, consideró el estudio en cada set de 6 replicados de una muestra de una solución de cloranfenicol de concentración 1 ng/mL y florfenicol de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, completando un total de 18 muestras. Para la obtención de estas soluciones fue necesaria la preparación previa de una solución de concentración 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de florfenicol y 10 ng/mL

de cloranfenicol, además de contener como estándar interno cloranfenicol-d₅ en una concentración de 10 ng/mL. Se pesaron 10 mg de florfenicol en cada set, cada muestra fue disuelta con una pequeña cantidad de acetonitrilo/agua 30/70 y traspasados cuantitativamente a un matraz de aforo de 10 mL, posteriormente se agregó una alícuota de 1000 µL de una solución de cloranfenicol 1000 ng/mL y una alícuota de 1000 µL de una solución de cloranfenicol-d₅ 1000 ng/mL y aforados en el mismo vehículo. Las muestras se homogenizaron por agitación y además se les aplicó energía de ultrasonido por 5 minutos. Luego se tomó una alícuota de 100 µL de cada una de las soluciones de florfenicol en sextuplicado y llevadas a un matraz de aforo de 10 mL, cada muestra fue también aforada en el mismo vehículo utilizado anteriormente, luego cada una de las soluciones obtenidas tiene una concentración de 1 ng/mL de cloranfenicol, 1 ng/mL de cloranfenicol-d₅ y 10 µg/mL de florfenicol. Con esto se trata de simular las condiciones teóricas planteadas de concentración de impurezas de cloranfenicol y concentración de florfenicol en materias primas y productos farmacéuticos. Finalmente las muestras obtenidas fueron filtradas en membrana de 0.22 µm y depositadas en viales para realizar el análisis instrumental por LC-MS/MS.

Además se incluyó en cada set, la realización de una curva de calibrado externa de cloranfenicol en concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 3 ng/mL, siendo utilizado cloranfenicol-d₅ como estándar interno en concentración 1 ng/mL para cada uno de los puntos estudiados. La realización de las soluciones utilizadas en la curva de calibrado están detalladas en la Tabla 1. Estas curvas de calibrado fueron utilizadas en la medición de la concentración de cada muestra, obtención de la linealidad y sensibilidad analítica.

Tabla 1: Curvas de calibración externas de cloranfenicol y cloranfenicol-d₅.

Solución de trabajo cloranfenicol ng/mL	Alícuota a tomar μL de cloranfenicol	Cantidad de solución (mL)	Concentración cloranfenicol ng/mL	Alícuota a tomar μL de cloranfenicol-d ₅ (100 ng/mL)	Concentración cloranfenicol-d ₅ ng/mL
10	125	5	0.25	500	1
10	250	5	0.5	500	1
10	375	5	0.75	500	1
10	500	5	1	500	1
10	1000	5	2	500	1
10	1500	5	3	500	1

Una vez finalizados los ensayos se determinaron los siguientes parámetros:

- Linealidad:

Es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Se obtiene el intervalo lineal mediante la generación de un gráfico de concentración del analito/concentración del estándar interno versus área cromatográfica del analito/área cromatográfica del estándar interno. La linealidad fue estudiada en cada set de validación. En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación (r) mayor a 0,99.

Para determinar si el coeficiente de correlación es realmente significativo, es decir si existe correlación lineal, se puede realizar una prueba estadística t, usando la siguiente ecuación:

$$t \text{ cal} = \frac{(|r| \sqrt{(n-2)})}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (1)$$

Donde:

r: coeficiente de correlación del ajuste lineal.

n: número de puntos experimentales

Luego el valor de t calculado se compara con el valor al nivel de significación deseable, utilizando un contraste t de dos colas y (n-2) grados de libertad. La hipótesis nula (H_0) en este caso es que no existe correlación entre X e Y. Si el valor calculado de t es mayor que el tabulado, se rechaza la hipótesis nula y se concluye en tal caso que existe una correlación significativa.

- Sensibilidad:

Es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración. Se calcula como:

$$m = b = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / n)} \quad (2)$$

Donde:

X_i : corresponde a los valores obtenidos en el eje X.

Y_i : corresponde a los valores obtenidos en el eje Y.

n: corresponde al número de ensayos realizados.

La sensibilidad fue estudiada los tres días, mediante la obtención de la ecuación de la recta de cada día, para finalmente obtener un valor promediado de sensibilidad.

- Exactitud:

Grado de conformidad entre el resultado de una prueba y el valor de referencia aceptado, dando cuenta de la proximidad entre el resultado obtenido por el método y el valor real, obtenido de patrones o estándares (CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003). Este parámetro es el error sistemático, el cuál se compone de veracidad y precisión, es decir, la exactitud será máxima cuando el sesgo es nulo y la dispersión aleatoria es mínima. La evaluación de exactitud se realizará a través de la recuperación.

La recuperación (R) es la fracción de la sustancia agregada a la muestra blanco (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar (blanco). Ésta se obtuvo mediante la integración en la curva de calibración de la relación de áreas de cloranfenicol/cloranfenicol-d₅ de los replicados de las muestras contra los valores obtenidos por la curva de calibración, obteniéndose el valor de concentración de cloranfenicol de la muestra, así entonces con un factor de dilución de 100, se determinó la recuperación del cloranfenicol presente en la muestra.

La recuperación se obtuvo en cada muestra en condiciones de repetibilidad para cada set. Luego el resultado de la recuperación fue considerado para la prueba t con n-1 grados de libertad y se comparó con el valor de t_{tabla} para un 95 % de nivel de confianza. El t_{obs} fue calculado con la siguiente fórmula:

$$t_{\text{obs}} = \frac{|100 - R|}{DE \times \sqrt{n}} \quad (3)$$

Donde:

- t_{obs} : t observado o calculado
- R : Recuperación media
- DE : Desviación estándar
- n : N° de lecturas o valores observados

Existe otro criterio de aceptación en base al valor obtenido para el porcentaje de recuperación, este criterio es cualitativo, correspondiente al criterio AOAC. En caso de utilizar el criterio de AOAC, se debe buscar en la Tabla 2 de acuerdo a la concentración esperada del analito y si el %R obtenido de la experiencia analítica, se encuentra dentro del rango de %R teóricos esperados.

Tabla 2: Tabla AOAC para % de Recuperación.

Analito	Unidad	Recuperación estimada (%)
100	100 %	98 – 102
10	10 %	98 – 102
1	1 %	97 – 103
0,1	0,10 %	95 – 105
0,01	100 ppm	90 – 107
0,001	10 ppm	80 – 110
0,0001	1 ppm	80 – 110
0,00001	100 ppb	80 – 110
0,000001	10 ppb	60 – 115
0,0000001	1 ppb	40 – 120

- Veracidad:

Se determinó mediante la evaluación de la recuperación; en este caso fue una evaluación bajo condiciones de reproducibilidad, luego el resultado de la recuperación fue considerado para la prueba t con n-1 grados de libertad (18-1) y se comparó con el valor t_{tabla} para un 95 % de nivel de confianza. Luego también se utilizó el criterio de aceptación de AOAC.

- Precisión:

Grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas. La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación estándar (DE) de los resultados de los ensayos. Se midió a través de estudios de repetibilidad y reproducibilidad. El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz:

$$CV_h \% = 2^{(1-0,5)\log C}$$

(4)

- Repetibilidad:

Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones, efectuadas bajo las mismas condiciones de medición, realizadas por el mismo operador, idénticas muestras, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo en un corto periodo de tiempo. Se determinó la media (\bar{X}) y la desviación estándar (DE) de 6 replicados por día y la evaluación de repetibilidad se expresó mediante el coeficiente de variación (CV).

$$CV\% = \left(\frac{DE}{\bar{X}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

El valor obtenido de CV se comparó con el generado por la ecuación de Horwitz dividido por dos, correspondiente al valor de aceptación de Horwitz para la repetibilidad intralaboratorio.

- Reproducibilidad:

Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones, efectuadas bajo distintas condiciones de medición. Se calcula a partir de los resultados obtenidos de cada repetición en diferentes días. La reproducibilidad se expresa como coeficiente de variación. Al igual que en la repetibilidad, este valor de CV de reproducibilidad intralaboratorio se compara con el valor de aceptación de Horwitz, esta vez, ese valor corresponde a 2/3 el obtenido por la ecuación (3). Consideró los 18 replicados en total, con la obtención del valor promedio de éstos, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

- Incertidumbre:

Es un “parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando” (Nch 2631/1.of. 2002). La incertidumbre es una expresión cuantitativa compuesta tanto de los errores sistemáticos y aleatorios asociados al proceso de una determinación analítica. Luego el proceso analítico aporta con una serie de incertidumbres que son conocidos como incertidumbres estándares que se expresan como desviación estándar, en este caso serán de dos tipos, la precisión de repetibilidad para el coeficiente de variación más desfavorable de los tres set, es decir, el valor más alto de coeficiente de variación (u_{prec}) y el sesgo por recuperación (u_{rec}). Luego cada incertidumbre estándar debe expresarse como incertidumbre relativa esto a través de las siguientes ecuaciones:

$$\mu \text{ relativa} = \frac{\text{DE repetibilidad}}{\text{precisión}} \times 100$$

$$\mu \text{ relativa} = \frac{\text{DE recuperación}}{\text{recuperación}} \times 100$$

(6)

Para obtener la incertidumbre combinada (μ_c), se deben sumar los cuadrados de ambas incertidumbres relativas, como indica la siguiente fórmula:

$$\mu \text{ combinada} = \sqrt{[(\mu \text{ relativa precisión})^2 + ((\mu \text{ relativa recuperación})^2 / \sqrt{n})]} \quad (7)$$

Finalmente para obtener incertidumbre expandida (U), se debe multiplicar por un factor de cobertura la incertidumbre combinada, generalmente se utiliza un $k=2$, que corresponde a un nivel de confianza $(1-\alpha)$ del 95 %.

$$U = 2 \times \mu \text{ combinada}$$

(8)

En la Figura 1 se presenta un esquema resumen para la obtención de la incertidumbre expandida (U).

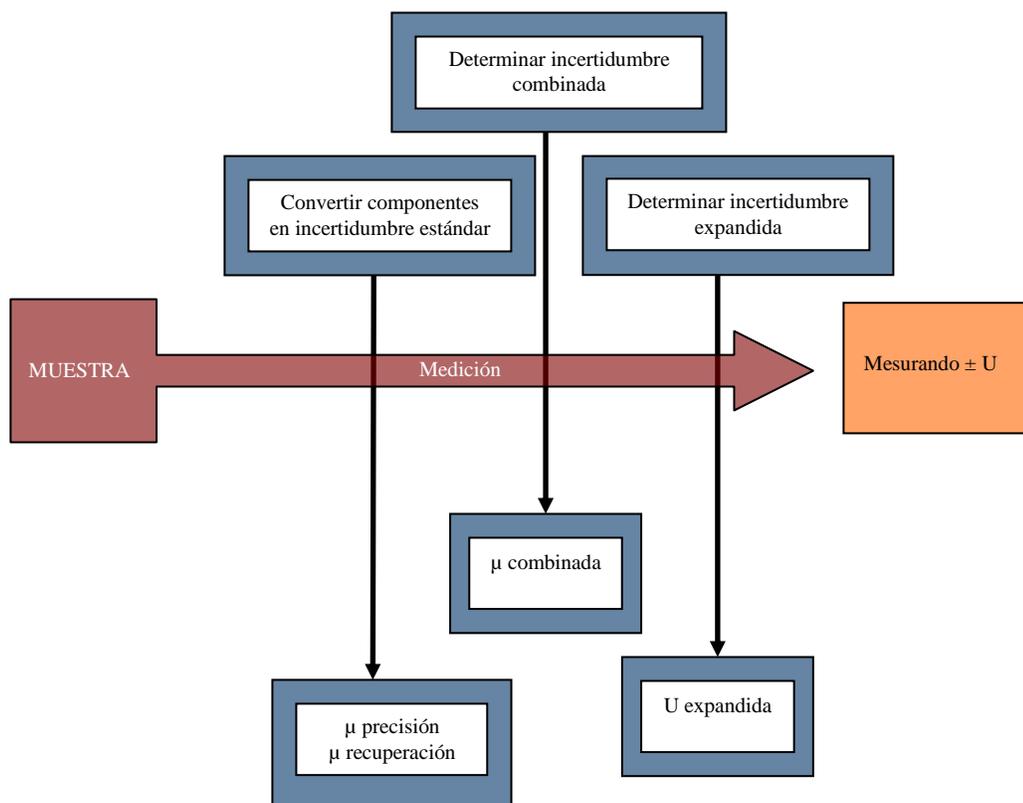


Figura 1: Esquema resumen para la obtención de la incertidumbre expandida (U).

- Límite de detección (LOD):

Se define como la mínima concentración o masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco (Skoog et. al, 2001). De forma teórica se puede obtener el límite de detección de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$C_{LOD} = [(S_{bl} + K s_{bl}) - S_{bl}] / m \quad (9)$$

En donde S_{bl} corresponde a la media de la señal instrumental del blanco, s_{bl} a su desviación estándar, m a la pendiente y K es una constante cuyo valor más aceptado es 3, con un nivel de confianza del 95% (Skoog, et al, 2001).

La ISO introduce el término general “concentración neta mínima detectable” (equivalente al límite de detección), como la concentración neta verdadera de analito en el material sujeto a análisis que conducirá, con una probabilidad $(1-\beta)$, a la conclusión de que la concentración de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco. La IUPAC anteriormente proporcionó una definición similar que adoptó el término “valor mínimo detectable”. Para tal caso el límite de detección se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{LOD}_{\text{IUPAC}} = (3.3 \times \text{ruido instrumental}) / m \quad (10)$$

El límite de detección teórico en LC-MS/MS muchas veces no coincide con lo realmente observado en la práctica. En este sentido, deben ser evaluados otros criterios de aceptación para la obtención de este límite, tales como señal/ruido, tiempo de retención y razón o ratios (intensidad relativa).

- Señal/Ruido:

De acuerdo a los criterios de funcionamiento y otros requisitos de la espectrometría de masas de la decisión 657/CE, la detección por espectrometría de masas mediante el control de iones específicos (SIM) declara que la relación señal/ruido para cada ión diagnóstico debe ser $\geq 3:1$, siendo éste uno de los criterios luego usados para la confirmación de los residuos de medicamentos veterinarios.

La señal analítica otorga la información relativa a cada analito, mientras que el ruido corresponde a información ajena e indeseada, que establece un límite inferior en la cantidad de analito que se puede detectar. El efecto del ruido en el error relativo de una medida aumenta cuando disminuye el valor de la cantidad medida. Por esta razón, la relación señal/ruido es un parámetro que describe la calidad de un método analítico o el funcionamiento de un instrumento. Siendo de manera general, la detección de un analito imposible cuando la relación señal/ruido es menor de 2 ó 3.

- Tiempo de retención del analito y tiempo de retención relativo:

De acuerdo a la Decisión de la Comisión 657/CE, “el tiempo de retención mínimo aceptable para el analito es el doble del tiempo de retención correspondiente al volumen vacío de la

columna. El tiempo de retención (o el tiempo relativo de retención) del analito en la porción de ensayo corresponderá al del patrón de calibración, dentro de una banda especificada de tiempo de retención. Esta banda de tiempo de retención será acorde con el poder de resolución del sistema cromatográfico. La relación entre el tiempo de retención cromatográfica del analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, corresponderá al de la solución de calibración, con un margen de tolerancia de $\pm 2,5 \%$ para la Cromatografía Líquida”.

- Ratios:

Se conoce como ratio al cociente entre la transición minoritaria (transición confirmatoria) y la mayoritaria (transición cuantificadora), una vez establecido el ratio característico para un analito bajo condiciones cromatográficas específicas, se calcula la intensidad relativa al multiplicar el ratio por 100 (%), luego a cada valor de intensidad relativa se le asigna una tolerancia, dicha tolerancia luego se aplica al valor del ratio y se obtiene un límite inferior y superior, en dicho intervalo ocurre la confirmación inequívoca de la identidad del analito, la intensidad relativa y su tolerancia se observan en la Tabla 3.

Tabla 3: Tolerancias máximas permitidas de intensidades para LC – MSⁿ.

IR % del pico de base	LC-MS ⁿ
> 50%	$\pm 20\%$
> 20 - 50%	$\pm 25\%$
> 10 - 20%	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$

En cada nivel de concentración se estudiaron las relaciones señal/ruido para la transición minoritaria del cloranfenicol, el tiempo de retención del analito, el tiempo de retención relativo y el ratio.