

VIII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

Validación de un método analítico para la extracción y determinación de enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina en plasma y tejidos de truchas (*Oncorhynchus mykiss*)

Urzúa N¹, Messina MJ¹, Prieto G¹, Lüders C², Errecalde C¹

¹Farmacología, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina

²Departamento de Ciencias Veterinarias, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco. Chile

* Correspondencia: Errecalde C, E-mail: cerrecalde@ayv.unrc.edu.ar

Editado por: R. Sobrero, C. Baravalle y V. Matiller

RESUMEN

Se aplicó un nuevo pre-tratamiento y validación de una técnica analítica para determinar enrofloxacin y ciprofloxacina en plasma y tejidos de truchas. El pre-tratamiento consistió en agregar 300 µL o mg de plasma o tejido blanco a 300 µL de tricloroacético al 50% y homogenizar por 5 minutos, manteniendo luego las muestras por 12 horas a 4°C, centrifugado 30 minutos a 13.500 rpm. Independientemente de la matriz analizada se recuperaron 150 µL del sobrenadante y agregaron 150 µL de concentraciones conocidas de enrofloxacin o ciprofloxacina, marbofloxacina como estándar interno y 600 µL de metanol. Finalmente, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 13.500 rpm, y 100 µL del sobrenadante se inyectaron en un cromatógrafo con detector de fluorescencia establecido a emisión de 218 nm y excitación de 477 nm. La elución isocrática se realizó a temperatura ambiente en fase reversa empleando fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y trietilamina. La validación de la técnica incluyó ensayos de linealidad, límites de detección y cuantificación y precisión intradía e interdía, recuperabilidad y selectividad. El método requiere mínimo pretratamiento de muestras para la extracción y determinación de ambos analitos, con elevada precisión, proporciona recuperaciones aceptables y límites de detección inferiores a los LMR establecidos.

Palabras clave: enrofloxacin, ciprofloxacina, HPLC, truchas

NEW METHOD FOR THE EXTRACTION AND DETERMINATION BY HPLC OF ENROFLOXACIN AND CIPROFLOXACIN IN PLASMA AND TROUT TISSUES.

SUMMARY.

A new pre-treatment and validation of an analytical technique was applied to determine enrofloxacin and ciprofloxacina in plasma and trout tissues. Pre-treatment consisted in adding 300 µL or mg of plasma or target tissue to 300 µL of 50% trichloroacetic acid and homogenizing for 5 minutes, then keeping the samples for 12 hours at 4 °C, centrifuged 30 minutes at 13,500 rpm. Regardless of the matrix analyzed, 150 µL of the supernatant were recovered and 150 µL of known concentrations of enrofloxacin or ciprofloxacina, marbofloxacina as internal standard and 600 µL of methanol were added. Finally, the samples were centrifuged for 15 minutes at 13,500 rpm, and 100 µL of the supernatant was injected into a chromatograph with a fluorescence detector set at 218 nm emission and 477 nm excitation. The isocratic elution was carried out at room temperature in reverse phase using mobile phase composed of water, acetonitrile and triethylamine. Validation of the technique included linearity tests, detection and quantification limits, intraday and interday precision, recoverability and selectivity. The method requires minimal sample pretreatment for the extraction and determination of both analytes, high precision, providing acceptable recoveries and detection limits lower than the established MRL.

Keywords: enrofloxacin, ciprofloxacina, HPLC, trout.

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos comúnmente utilizados en acuicultura debido que proporcionan una buena distribución sistémica y por su eficacia frente diversos patógenos de los peces incluso en concentraciones muy reducidas (Samuelsen, 2006; Quesada et al., 2013). Enrofloxacin es una fluoroquinolona de segunda generación utilizada a nivel mundial en acuicultura inclusive en la producción de trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Aufartová et al., 2017; Guidi et al., 2018). Este antimicrobiano puede ser biotransformado in vivo a su metabolito ciprofloxacina, a una tasa específica de especie.

La presencia de residuos farmacológicos en tejidos comestibles y su vinculación con la expresión de cepas bacterianas resistentes que pueden afectar negativamente tanto al humano como al ecosistema (Barani y Fallah, 2015; Kyuchukova et al., 2016; Guidi et al., 2018), motivó que entidades internacionales de control establezcan un límite máximo de residuos (LMR) de 0.1 µg/g para la suma de enrofloxacin y su metabolito activo, ciprofloxacina (Guidi et al., 2018). En este contexto, contemplando la necesidad de disponer técnicas analíticas suficientemente sensibles para cuantificar estas sustancias en el plasma y en diferentes tejidos de truchas Arco iris, se desarrolló este estudio con los objetivos de evaluar un nuevo pre-tratamiento y validar una técnica analítica para determinar enrofloxacin y ciprofloxacina en plasma y tejidos (hígado, músculo, piel e intestino anterior).

El pre-tratamiento de las muestras consistió en agregar a 300 µL o mg de plasma o tejido blanco, respectivamente, 300 µL de tricloroacético al 50% (1:1 v/v). En los tejidos el conjunto fue homogenizado mecánicamente durante 5 minutos, mientras todas las muestras se sometieron a vórtex durante 2 minutos, se conservaron a 4°C por 12 horas y luego se centrifugaron a 13,500 rpm por 30 minutos. Independientemente de la matriz analizada, del sobrenadante se recuperaron 150 µL, se agregaron 150 µL de concentraciones conocidas de enrofloxacin y ciprofloxacina (0.001 a 10 µg/mL), 50 µL de marbofloxacina como estándar interno y 600 µL de metanol. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13,500 rpm a - 4°C, y del sobrenadante se inyectaron 100 µL en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1050, equipado con bomba cuaternaria, desgasificador de fase móvil en línea e inyector manual, columna Agilent octadecilsilano modelo Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) y detector de fluorescencia Hewlett-Packard 1046-A Serie establecido a longitud de onda de emisión de 218 nm y excitación de 477 nm. La elución se realizó a temperatura ambiente mediante elución isocrática en fase reversa empleando fase móvil compuesta por agua de ionizada, acetonitrilo y trietilamina (790:200:10) a pH 3.0 (Bottcher et al., 2001) y flujo de 0.8 mL/minuto. Para la validación de la técnica analítica se determinaron linealidad, límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) y se realizaron los ensayos de precisión intradía (por

sextuplicado) e interdía (por 6 días diferentes), recuperabilidad y selectividad.

La tabla 1 registra la linealidad de los analitos estudiados en cada matriz ($r^2= 0.999$), mientras la tabla 2 indica los coeficientes de variación (CV) de los ensayos de precisión (ensayos intradía e interdía), porcentajes de recuperabilidad y los límites de LD y LQ establecidos, inferiores al LMR establecido. En las matrices analizadas los tiempos de retención fueron de 9.13 ± 0.21 ; 7.55 ± 0.15 y 6.69 ± 0.11 minutos para enrofloxacin, ciprofloxacina y el estándar interno, respectivamente, que revelan la selectividad del método analítico implementado debido que no se registran interferencias en los tiempos de retención de los analitos en estudio.

Los resultados obtenidos revelan que la técnica utilizada es sensible y eficiente para la extracción y determinación de ambos analitos en plasma y los tejidos estudiados, y en relación a otros autores posee mayor precisión con $CV \leq 4\%$, mientras que otros registran $\leq 14\%$ (Kyuchukova et al., 2016; Aufartová et al., 2017). Finalmente, no existen datos reportados para validación de técnicas analíticas por HPLC utilizadas para cuantificar enrofloxacin y ciprofloxacina en intestino de trucha Arco iris, este es el primer trabajo que abarca este tejido, el cual es importante para el desarrollo de estudios de disposición, de modelos PK/PD o la determinación de residuos. En conclusión, el método analítico implementado es sencillo, requiere un pretratamiento mínimo de la muestra y económico, proporciona recuperaciones aceptables y eficiencia de limpieza junto con límites de detección, por debajo de los LMR establecidos. La principal fortaleza es que permite el análisis de muestras de tejido y plasma de truchas Arco iris tratadas con enrofloxacin y ciprofloxacina, determinando ambos analitos. Esta es una contribución sustancial para demostrar el potencial del método propuesto para su uso en estudios farmacocinéticos o el monitoreo de residuos de enrofloxacin o ciprofloxacina en esta especie.

Tabla 1. Linealidad de enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) en las diferentes matrices estudiadas.

Matriz	EFX				CFX			
	Rangos*	A	B	r ²	Rangos*	A	B	r ²
Plasma	0.004-10	-0.018	1.501	0.9995	0.004-1.25	-0.308	7.372	0.9991
Músculo	0.004-10	-0.018	1.498	0.9993	0.004-1.25	-0.091	4.710	0.9991
Piel	0.002-1.25	-0.027	2.065	0.9998				
Hígado	0.004-10	0.006	1.701	0.9999	0.004-1.25	-0.063	4.540	0.9999
Intestino	0.004-10	0.004	1.458	0.9997	0.004-1.25	-0.023	6.719	0.9995

Rangos de concentración *(µg/mL o µg/g). A: intercepto B: pendiente r²: coeficiente de ajuste.

Tabla 2. Precisión, recuperabilidad y límites de detección y cuantificación de enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) en diferentes matrices de trucha Arco iris.

Fármaco	Matriz	Concentración (µg/mL o g)	Precisión (%)		Recuperabilidad (%)	LD (µg/mL o g)	LQ (µg/mL o g)
			Intradía/interdía				
EFX	Plasma	0.001-1.25	0.52	1.52	94.0 ± 6.7	0.002	0.004
	Músculo	0.001-1.25	1.63	2.05	94.2 ± 4.1	0.002	0.004
	Hígado	0.001-1.25	1.35	1.41	95.8 ± 1.0	0.003	0.007
	Intestino	0.001-1.25	1.28	1.49	97.2 ± 2.2	0.003	0.004
	Piel	-				0.002	0.004
CFX	Plasma	0.001-1.25	1.45	1.68	93.5 ± 6.6	0.002	0.004
	Músculo	0.001-1.25	1.24	3.23	94.8 ± 7.6	0.002	0.005
	Piel	-	-	-	-	-	-
	Hígado	0.001-1.25	1.38	1.69	92.9 ± 5.8	0.002	0.007
	Intestino	0.001-1.25	0.88	1.04	96.6 ± 1.8	0.002	0.005

Bibliografía

Aufartová J, Brabcová I, Torres-Padrón M, Solich P, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez J, 2017. Determination of fluoroquinolones in fishes using microwave-assisted extraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J Food Compos Anal, 56: 140-146

Barani A, Fallah A, 2015. HPLC analysis of some allowable-antibiotic multiresidues in farmed rainbow trout in Iran. *Toxin Reviews*, 34 (4): 206-209.

Bottcher S, Baum H, Hoppe-Tychy T, Benz C & Sonntag H, 2001. An HPLC assay and a microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue, bone, bile and serum. *J Pharm Biomed Anal* 25: 197-203.

Guidi L, Santos F, Ribeiro A, Fernández C, Silva L, Gloria M, 2018. Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chem* (245): 1232-1238.

Kyuchukova R, Milanova A, Daskalova A, Stratev D, Lashev L, Pavlov A, 2016. Effect of storage on residue levels of enrofloxacin in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Mac Vet Rev* 39 (1): 97-102.

Quesada S, Paschoal J, Reyes F, 2013. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones - a review. *J. Food Sci* 78: R1321-R1333.

Samuelsen O, 2006. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. *Aquaculture* 255: 55-75.