
TREBALL DE FI DE GRAU

DETERMINACIÓ DE QUINOLONES EN MOSTRES DE LLET COMERCIAL

GRAU DE QUÍMICA

DEPT. DE QUÍMICA ANALÍTICA I QUÍMICA ORGÀNICA
ÀREA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Curs Acadèmic: 2022/2023

Autora

Jèssica Solanes Matarín

Tutores:

Rosa Ma Marcé Recasens

Núria Fontanals Torroja



DEPT. DE QUÍMICA ANALÍTICA
i QUÍMICA ORGÀNICA
Universitat Rovira i Virgili



AGRAÏMENTS

Agrair als meus pares, Ramon i Elisabeth, per donar-me la oportunitat de estudiar allò que m'agrada i acompanyar-me en tot el camí. Als meus germans per aguantar-me i animar-me en tot el que fes falta per tal de no rendir-me i seguir endavant.

També agrair als meus amics de Montblanc, per recolzar-me i treure'm de casa en els moments més difícils, i alabar-me quan em sentia desanimada per alguna raó.

Als meus amics de la universitat: gràcies per permetre'm compartir aquests anys amb tots vosaltres. Vull destacar especialment l'Alba i la Fàtima, per formar part de la meva vida des del primer moment que ens vam conèixer, i compartir tants moments inoblidables amb elles. També mencionar a totes les persones que he conegut durant les pràctiques del meu treball de fi de grau, gent meravellosa que m'emportaré per tota la vida: L'Alba, la Laura, el Marcos, la Lourdes, el Javi, l'Adrià, l'Oriol, el Christian, la Sílvia, la Reyes, la Laura, l'Óscar, el Pol i l'Adrian; unes persones que han fet que aquesta estància hagi sigut més divertida i entretinguda.

Finalment, vull fer una especial menció a les meves tutores, la Rosa i la Núria, per fer possible aquest treball. Gràcies per haver confiat en mi a l'hora de realitzar aquesta investigació i per ajudar-me i guiar-me en tot el procés.

Gràcies a totes i tots.

ÍNDEX

RESUM	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUCCIÓ.....	4
1.1 Les quinolones	6
1.1.1 Fluoroquinolones.....	7
1.2 Determinació de fluoroquinolones.....	9
2 OBJECTIUS	10
3 PART EXPERIMENTAL	11
3.1 Preparació de reactius i patrons	11
3.1.1 Preparació patrons individuals	11
3.1.2 Preparació patró mescla.....	12
3.1.3 Preparació patrons individuals	13
3.1.4 Fase mòbil de la cromatografia de líquids.....	13
3.2 Separació cromatogràfica	13
3.3 Extracció en fase sòlida.....	14
4 DISCUSSIÓ DE RESULTATS	16
4.1 Cromatografia de líquids.....	16
4.1.1 Optimització de la separació cromatogràfica.....	16
4.1.2 Validació instrumental.....	20
4.2 Extracció en fase sòlida.....	24
4.2.1 Optimització amb solucions patró.....	24
4.2.2 Optimització amb mostres de llet	29
4.2.3 Validació del mètode analític	32
4.3 Anàlisi de les mostres problema	33
4.3.1 Llet semidesnatada.....	34
4.3.2 Llet sencera.....	35
4.3.3 Llet sense lactosa.....	36
5 CONCLUSIONS	38
6 BIBLIOGRAFIA	41
ANNEXOS	43
6.1 Annex I. Dades referents als reactius i patrons utilitzats	44

RESUM

Les fluoroquinolones són antibiòtics utilitzats en animals contra les infeccions bacterianes, i és important assegurar que els productes destinats al consum humà compleixen amb les regulacions de seguretat establertes i no continguin residus de fàrmacs a concentracions superiors a les permeses.

En aquest treball, s'ha desenvolupat un mètode senzill i eficient per a la determinació de fluoroquinolones en mostres de llet comercial. El mètode es basa en la cromatografia de líquids i detecció ultraviolada (LC/UV) juntament amb l'extracció en fase sòlida (SPE) com a tècnica de tractament de les mostres.

A partir dels resultats obtinguts en l'anàlisi de les mostres de llet per mitjà del mètode òptim, s'ha pogut demostrar que aquestes compleixen amb la normativa vigent, ja que s'han obtingut unes concentracions de les fluoroquinolones per sota dels límits màxims de residus establerts (MRL).

ABSTRACT

Fluoroquinolones are antibiotics administered to animals to fight bacterial infections. It is important to ensure that all animal products for human consumption comply with established safety regulations and do not contain traces of pharmaceutical waste at higher concentrations than the established ones.

In this work, an easier and more efficient method has been developed for the determination of fluoroquinolones in commercial milk samples. This method consists of a separation with liquid chromatography and ultraviolet (UV) detection after a previous sample treatment based on solid-phase extraction.

Based on the results obtained from the analysis of milk samples using optimized conditions, it has been possible to demonstrate that these samples comply with the current regulations because the concentrations of fluoroquinolones were below the established maximum residue limit (MRL).

1 INTRODUCCIÓ

Els aliments, en general, tenen un paper crucial en la vida dels éssers vius, ja que aporten minerals, proteïnes, vitamines entre altres. L'alimentació és essencial per al bon funcionament del cos humà i imprescindible per a mantenir una bona qualitat de vida. Per això, és important garantir una bona producció i seguretat d'aquests aliments per a evitar problemes de la salut.¹

Quant als aliments d'origen animal, és essencial garantir la seva producció segura per protegir la salut dels consumidors. Hi ha normatives i mesures específiques per prevenir la propagació de malalties i controlar els residus de medicaments veterinaris, així com per assegurar la qualitat dels productes. A més, s'estableixen unes bones pràctiques de manipulació per garantir el benestar dels animals i prevenir malalties, es realitzen controls veterinaris i s'administren vacunes regularment per mantenir-los sans.²

L'administració de medicaments i vacunes en animals destinats a la producció d'aliments és un desafiament, especialment en el camp de la farmacologia veterinària. És fonamental assegurar la seguretat alimentària, evitant la presència de residus de medicaments que superin els límits establerts. Per això, cal tenir en compte els temps d'espera que corresponen al temps que passa entre la última dosis administrada del medicament a un animal i el seu sacrifici o la recollida d'aliments destinats al consum humà, com poden ser els ous o la llet. Aquests temps són importants per permetre que els residus farmacològics disminueixin a nivells segurs abans de l'ús dels animals per a la producció d'aliments. D'altra banda, cal tenir en compte les necessitats específiques de cada espècie animal i ajustar els medicaments a les necessitats de cada un.³

Els residus de medicaments veterinaris corresponen a les substàncies farmacològiques actives o als seus productes de degradació que poden quedar en els productes alimentaris d'origen animal a causa de l'administració del medicament a aquests animals. S'estableixen límits màxims de residus (de l'anglès Maximum Residue Levels, MRL) per garantir la seguretat del consum humà. Aquests límits corresponen a les concentracions màximes de residus de medicaments o substàncies actives que es

permeten en aquests aliments per garantir la seva seguretat per al consum humà. Es basen en estudis científics i tenen en compte factors com la toxicitat del medicament, l'ús en animals, l'acumulació i eliminació en els teixits animals, i els efectes sobre la salut humana. Es fixen a escala nacional i internacional per les autoritats reguladores competents i es defineixen en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pes de l'aliment.

Els productors d'aliments d'origen animal han de complir amb aquests MRL i es realitzen controls i monitoratges per assegurar el seu compliment. És important utilitzar adequadament aquests medicaments, seguint les indicacions dels veterinaris i respectant els períodes de retirada, per evitar que els aliments continguin residus que superin els límits establerts. Els òrgans com el ronyó, el fetge, els músculs, o aliments com els ous o la llet, poden emmagatzemar aquests residus, que després són ingerits pels éssers humans en consumir aquests aliments. Per tant, és essencial garantir que els residus de medicaments estiguin per sota dels MRL per protegir la salut dels consumidors.⁴

Un dels medicaments que es poden subministrar a aquests animals són les quinolones, un grup d'antibiòtics amplament usats en medicina veterinària per al tractament de les infeccions bacterianes en animals. Dins d'aquest grup d'antibiòtics es troben les fluoroquinolones, les quals poden estar presents, com s'ha comentat anteriorment, en aliments d'origen animal com la llet.

La determinació de fluoroquinolones en mostres de llet es realitza mitjançant cromatografia de líquids, una de les tècniques analítiques més comunes per a la determinació d'aquests tipus de compostos. Aquesta tècnica permet la separació i quantificació dels compostos dins de mostres de llet comercial. Els anàlisis són separats en una columna cromatogràfica i detectats mitjançant un detector adequat, com el detector d'absorbància ultraviolada/visible (UV-vis).

Abans de la determinació cromatogràfica, és necessari fer servir tècniques d'extracció i purificació, com l'extracció en fase sòlida (SPE), per concentrar els compostos d'interès i simplificar la matriu abans de l'anàlisi. Això s'efectua per gestionar la complexitat de la mostra de llet, que conté diverses substàncies que no són rellevants per a l'anàlisi de les quinolones.⁵

1.1 LES QUINOLONES

Les quinolones són una classe d'antibiòtics d'ampli espectre que s'utilitzen per al tractament de diverses infeccions bacterianes. Dins de la indústria farmacèutica veterinària, les quinolones són un tipus de fàrmac indicat per al tractament de les infeccions bacterianes locals i sistemàtiques dels animals. També són recomanades tant per al tractament d'infeccions greus com les infeccions causades per patògens intramoleculars. Aquest tipus de fàrmac és capaç de tractar malalties del tipus respiratòries, intestinals, urinàries, cutànies, neuronals, articulars, etc.

S'ha observat que les quinolones són eficaces contra els bacteris gramnegatius i grampositius, ja que s'encarreguen de bloquejar la duplicació de l'ADN bacterià. Tot i que existeixen diferents generacions de quinolones, on s'inclouen les fluoroquinolones, totes aconseguen tenir un efecte positiu post antibiòtic, és a dir, realitzen una inhibició efectiva del creixement bacterià.

Aquesta classe d'antibiòtics actua inhibint l'enzim DNA girasa, responsable de la separació les dues cadenes d'ADN durant la replicació bacteriana. En interferir amb aquest procés, les quinolones impedeixen la síntesi de l'ADN bacterià i la seva reproducció. A més, causen danys a l'ADN existent del bacteri, debilitant-lo i, finalment, matant-lo. D'aquesta manera, ajuden a combatre les infeccions bacterianes esmentades anteriorment.

Genèricament, les quinolones es poden classificar en 3 generacions diferents. La primera es caracteritza per una biodisponibilitat oral pobra, una capacitat de distribució en els teixits limitada i un espectre d'acció restringit, que es limita principalment a l'*Escherichia coli* i altres bacteris gramnegatius. Alguns exemples de quinolones d'aquesta generació són l'àcid oxolínic, la cinoxacina o la flumequina, un tipus de fluoroquinolona. Quant a la segona generació, presenta una activitat superior en comparació amb les anteriors, ja que té un augment de l'activitat sobre els bacteris gramnegatius i també mostra certa activitat sobre els grampositius. En aquest grup es troben part de les fluoroquinolones com la ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, etc. En relació amb la tercera generació manté una activitat similar a les de la segona, tot i mostrar un increment de l'activitat sobre els bacteris grampositius, els anaeròbics

i els micobacterians. Dins d'aquest grup s'inclouen l'orbifloxacina, levofloxacina, entre altres. Finalment, l'última generació, la quarta, és la que presenta una major activitat enfront dels bacteris grampositius i una bona acció contra els organismes anaerobis. Dins d'aquest grup s'hi poden trobar altres tipus de fluoroquinolones com clinofloxacina, moxifloxacina, etc.⁶

1.1.1 Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones són una subclasse de les quinolones que contenen un àtom de fluor a la seva estructura química, concretament en la posició 6, tal i com es mostra en la Figura 1. El que diferencia unes fluoroquinolones de les altres són els substituents R, ja que, en funció d'aquest, presentarà unes propietats o característiques determinades.⁷

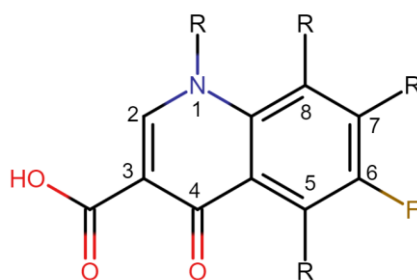
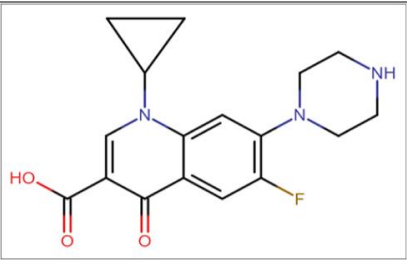
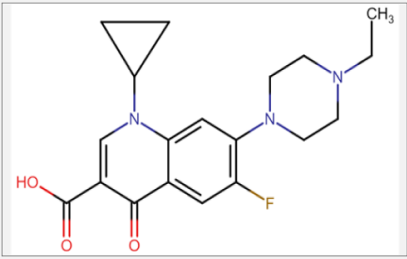
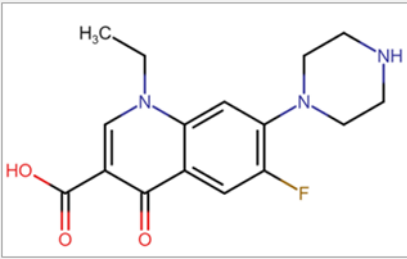
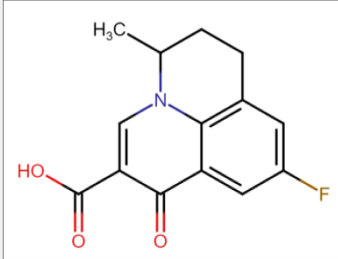


Figura 1. Estructura química genèrica de les fluoroquinolones

Per tant, es pot dir que existeix una relació entre l'estructura química de les quinolones, o 4-quinolones, i els substituents diferents que posseeixen els diversos tipus de quinolones amb la seva activitat i propietats microbiològiques, farmacocinètiques i tòxiques.

Entre els diferents tipus de fluoroquinolones que existeixen, hi ha: ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina i flumequina, les propietats de les quals estan recollides a la Taula 1.⁶

Taula 1. Tipus de Fluoroquinolones determinades ⁶

	CIPROFLOXACINA	ENROFLOXACINA	NORFLOXACINA	FLUMEQUINA
ESTRUCTURA QUÍMICA				
NOM QUÍMIC	Àcid 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-il quinolina-3-carboxílic	àcid 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolinecarboxílico.	Àcid 1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.	Àcid 9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo-1H,5H-benzo[ij]quinolizina-2-carboxílico.
SOLUBILITAT	56 g/L a pH=1	25 g/L a pH=1-10	220 g/L a pH=10	1000 g/L a pH=10
pKa	Àcid carboxílic= 6,0 ⁸ Amina alifàtica= 9 ⁸	Àcid carboxílic= 6,17 ⁹ Amina alifàtica= 7,72 ⁹	Àcid carboxílic= 6,22 ¹⁰ Amina alifàtica= 8,51 ¹⁰	Àcid carboxílic= 6,42 ¹¹
PES MOLECULAR	331 g/mol	359 g/mol	319 g/mol	261 g/mol
MRL	100 µg/kg		-	-

1.2 DETERMINACIÓ DE FLUOROQUINOLONES

Les quinolones són substàncies orgàniques que es poden determinar fàcilment per cromatografia de líquids en fase invertida. Això és possible perquè les quinolones tenen unes característiques químiques específiques que els permeten interactuar amb aquesta fase estacionària de la columna, fent que es puguin separar pels diferents tipus de compostos presents.⁵

Donada la bibliografia cercada ^{5,6,12}, les quinolones es poden separar mitjançant una tècnica de cromatografia de líquids. Una opció per a la cromatografia és utilitzar una columna de fase invertida de sílice funcionalitzada amb cadenes de 18 carbonis unides entre si (C₁₈), on els anàlits estableixen un equilibri entre els grups de la columna i la fase mòbil polar que permet realitzar una separació òptima⁶. Una altra opció trobada és portar a cap la separació mitjançant una columna de sílice funcionalitzada amb grups octils (C₈). Aquesta columna en presentar una polaritat major, farà que l'equilibri entre els compostos, la fase estacionària i la fase mòbil, sigui menor. D'aquesta manera, els anàlits es detectaran a uns temps de retenció més baixos.¹³

La detecció dels compostos es pot dur a terme usant un detector UV, ja que les quinolones mostren una absorció característica en una longitud d'ona específica. D'altra banda, la fluorescència molecular és una altra tècnica emprada en la detecció de fluoroquinolones. Aquesta tècnica es basa en les propietats intrínseques de fluorescència que presenten aquestes substàncies. Quan les fluoroquinolones són irradiades amb una longitud d'ona específica, es produeix una emissió de llum fluorescent, la qual pot ser detectada i mesurada per identificar i quantificar les fluoroquinolones en una mostra.¹⁴

La llet és un tipus de mostra que conté moltes substàncies, la majoria de les quals no interessin per a aquesta anàlisi i, per tant, han de ser eliminades o separades dels anàlits d'interès, ja que poden interferir en l'anàlisi. A més a més, els anàlits d'interès (les fluoroquinolones) es troben a nivells de concentració baixos. Per això, l'extracció en fase sòlida (SPE) és una tècnica útil per a la concentració dels anàlits en mostres complexes, com la llet, abans de l'anàlisi cromatogràfica. Amb l'SPE, és possible

eliminar o separar substàncies indesitjables de la mostra, simplificant així la matriu a analitzar.

Segons la bibliografia de referència ^{6,12}, hi ha diferents opcions per al tractament de mostres utilitzant cartutxos basats en sorbents polimèrics, com ara MIP, Strata X, ENV+ Isolute, Oasis MA o el mètode QuEChERS. S'ha descartat el mètode QuEChERS i el tractament per MIP, ja que són processos complexos i específics, i es busca un mètode més senzill per a la determinació dels compostos. Pel que fa als sorbents ENV+ Isolute i Oasis MA, es va observar que amb aquests, s'obtenien interferències en els mateixos temps de retenció que altres fluoroquinolones. Per això, s'ha optat per fer ús el cartutx d'SPE d'Strata-X, que conté una fase estacionària polimèrica que mitjançant interaccions polars entre els anàlits i els grups silanol de la fase estacionària, permet retenir els anàlits d'interès.^{15,16}

Amb aquest procés combinat d'extracció en fase sòlida, cromatografia de líquids i detecció ultraviolada, es pot determinar la presència de quinolones en mostres de llet, millorant la sensibilitat de l'anàlisi elaborada posteriorment. Això és fonamental per assegurar la detecció i quantificació precisa d'aquests compostos en mostres complexes com la llet.¹²

2 OBJECTIUS

L'objectiu principal consisteix a desenvolupar un mètode analític basat cromatografia de líquids i detecció ultraviolada (LC/UV) juntament amb l'extracció en fase sòlida (SPE) com a tècnica de tractament de les mostres, per a determinar fluoroquinolones en mostres de llet i per poder controlar que aquestes es trobin per sota dels límits màxims de residus establerts (MRL) i, per tant, establir si la llet és apta per al consum humà.

3 PART EXPERIMENTAL

3.1 PREPARACIÓ DE REACTIUS I PATRONS

3.1.1 Preparació patrons individuals

Per a aquest estudi s'han seleccionat quatre fluoroquinolones diferents: ciprofloxacina (CIPRO), enrofloxacina (ENRO), norfloxacina (NOR) i flumequina (FLUME). La dissolució dels anàlits ENRO, CIPRO i NOR s'efectua utilitzant una solució d'àcid acètic 50 mM, mentre que la FLUME, a causa de les seves dificultats de dissolució, s'ha dissolt en acetonitril, ja que s'ha verificat en l'estudi de referència¹² que el reactiu té una major solubilitat en aquest dissolvent orgànic que en una solució àcida. Les dades relacionades amb els reactius i els patrons usats, es troben a l'apartat d'Annexos (Annex I. Dades referents als reactius i patrons utilitzats).

És essencial assegurar-se que els compostos estiguin adequadament dissolts per garantir l'obtenció de resultats precisos i fiables durant totes les anàlisis.

En primer lloc, per tal de preparar les mostres desitjades, és necessari realitzar patrons de concentracions més elevades que facilitin el procés de preparació. Per això, es preparen 25 mL d'una solució mare de 500 mg/L de cadascun dels compostos a partir del patró sòlid.

$$25 \text{ mL de patró} \cdot \frac{500 \text{ mg d'anàlit}}{1000 \text{ mL de patró}} \cdot \frac{1 \text{ g d'anàlit}}{1000 \text{ mg d'anàlit}} = 0,0125 \text{ g d'anàlit}$$

Segons els càlculs realitzats, es pesa la quantitat indicada del patró sòlid per a cadascun dels compostos. A la Taula 2 es poden observar els pesos experimentals de cada patró.

Es dilueixen, per separat, els 0.0125 g de cada reactiu en un vas de precipitats, amb el seu respectiu dissolvent en un vas de precipitats i, posteriorment, s'introdueix en matrassos de 25 mL i s'enrasa amb els solvents adequats.

Taula 2. Pesos experimentals de cada patró sòlid

PESOS EXPERIMENTALS	
<i>CIPRO</i>	0.0124 g
<i>ENRO</i>	0.0125 g
<i>NOR</i>	0.0126 g
<i>FLUME</i>	0.0125 g

Aquests pesos mostrats a la Taula 2, seran necessaris per a efectuar els càlculs de les diferents solucions i obtenir així les concentracions exactes de cada patró preparat.

3.1.2 Preparació patró mescla

A partir dels patrons individuals de 500 mg/L que s'han preparat anteriorment, es realitza un patró mescla de 100 mg/L. En aquest cas, el patró mescla s'assegura que tots els compostos estiguin presents, evitant així la necessitat de prendre alíquotes dels diferents patrons individuals i evitar oblidar algun d'ells. A més, el patró mescla, en tenir una concentració més baixa, permet agafar un volum més gran per a la preparació d'altres patrons usats per a l'optimització de les condicions cromatogràfiques i per a les rectes de calibratge. Això ajuda a reduir significativament les incerteses experimentals.

$$25 \text{ mL de patró} \cdot \frac{100 \text{ mg d'anàlit}}{1000 \text{ mL de patró}} \cdot \frac{1000 \text{ mL de patró}}{500 \text{ mg d'anàlit}} \\ = 2,5 \text{ mL de patró (500 mg/L)}$$

Aquest patró es dilueix en una solució de MeOH:H₂O (50:50 v/v) per garantir una dissolució adequada dels compostos.

Posteriorment, es procedeix a preparar patrons mescla a diferents concentracions. Aquests patrons s'utilitzen per a optimitzar les condicions cromatogràfiques i establir una recta de calibratge per a cada compost. Per a això, es dilueix el patró de 100 mg/L en solucions adequades per a la cromatografia. És important destacar que cada patró preparat s'enrasa amb aigua ultrapura per evitar possibles problemes en els cromatogrames a causa del solvent.

3.1.3 Preparació patrons individuals

Per a la identificació precisa dels pics cromatogràfics, es preparen els patrons individuals per a cada anàlit, amb una concentració adequada per a la seva visualització en el cromatograma. Això permetrà determinar els temps de retenció i identificar els patrons amb precisió.

$$10 \text{ mL de solució} \cdot \frac{5 \text{ mg de patró}}{1000 \text{ mL de solució}} \cdot \frac{1000 \text{ mL de solució}}{100 \text{ mg de patró}} \\ = 0,5 \text{ mL de solució (100 mg/mL)}$$

Cada patró individual s'ha enrasat amb aigua ultrapura.

3.1.4 Fase mòbil de la cromatografia de líquids

Per a la separació dels compostos, s'usa una fase mòbil composta de dos solvents. Les dades referents a aquests dos dissolvents es troben a l'apartat d'Annexos (Annex I. Dades referents als reactius i patrons utilitzats):

- Metanol de puresa HPLC (MeOH): Aquest solvent orgànic es fa servir com a component de la fase mòbil per a afavorir la interacció amb els anàlits i promoure la seva elució a través de la columna cromatogràfica.
- Aigua ultrapura acidificada a pH = 3: L'aigua ultrapura és utilitzada com a dissolvent polar en la fase mòbil, la qual prové d'un sistema de generació Millipore. Aquesta aigua s'ha acidificat per a ajustar el seu pH a 3, afegint àcid fòrmic. L'objectiu d'aquesta acidificació és intentar reduir la ionització dels grups silanol, així com minimitzar possibles interaccions indesitjades amb les quinolones.

3.1.5 Separació cromatogràfica

Les condicions finals utilitzades en la separació cromatogràfica són les que es mostren a la Taula 3.

Taula 3. Condicions cromatogràfiques finals

COLUMNA HPLC	Teknokroma, TRACEL EXCEL 120 Columna C ₈ 5 µm 15 × 0.46 cm
VOLUM D'INJECCIÓ	20 µL
FASE MÒBIL	A: H ₂ O (pH=3) B: MeOH
TEMPERATURA	30 °C
DETECTOR	UV
LONGITUD D'ONA DE DETECCIÓ	280 nm i 324 nm

A partir de diferents proves d'optimització de condicions, les quals es comenten en la "DISCUSSIÓ DE RESULTATS", s'han obtingut el gradient òptim (Taula 4) amb un temps d'anàlisi acceptable i una bona resolució dels pics.

Taula 4. Gradient optimitzat

TEMPS (min)	% FASE ORGÀNICA (B)
0	20
3	20
10	34
12	100
16	100
17	20
20	20

3.2 EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

En l'extracció en fase sòlida (SPE) s'utilitza el cartutx Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase, que té una fase sòlida polimèrica funcionaritzada amb grups polars. Concretament, es tracta del polímer poli-[1-(4vinilbenzil)piperidin-2-ona], l'estructura del qual es mostra a la Figura 2.

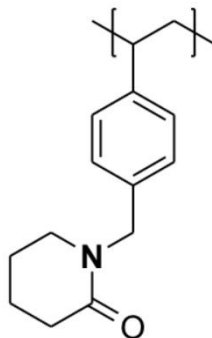


Figura 2. Estructura química de la fase polimèrica

Les etapes de la SPE són:

1. Condicionament del cartutx: Es prepara el cartutx amb metanol i aigua ultrapura per a la retenció dels anàlits.
2. Càrrega de la mostra: La mostra de llet tractada es passa a través del cartutx, retenint així les fluoroquinolones.
3. Rentat: Es realitza un rentat amb aigua ultrapura per a eliminar interferències i altres compostos indesitjats amb solvents adequats.
4. Elució dels compostos: Es fa servir com a solvent d'elució el metanol, i serveix per a recuperar les fluoroquinolones, que són eluïdes de la columna i recollides en una fracció.
5. Preconcentració: S'evapora el solvent de la fracció recollida, fins a sequedat.
6. Redissolució en solvent adequat: La fracció concentrada es fortifica amb un dissolvent a base d'aigua i metanol (80:20, v/v), adequat per a l'anàlisi cromatogràfica posterior.

Seguint els passos esmentats, es garanteix dur a terme una extracció dels anàlits d'interès, així com preparar-los per a l'anàlisi cromatogràfica posterior. Això facilita la detecció i quantificació precisa d'aquests compostos en mostres de llet.

Considerant les diverses proves explicades en la “DISCUSSIÓ DE RESULTATS”, les condicions finals usades en el tractament de mostra són els observats en la Taula 5.

Taula 5. Condicions òptimes per a la extracció en fase sòlida

CONDICIONAMENT	2mL de MeOH
	2 mL d'H ₂ O ultrapura
CÀRREGA	10 mL de mostra
RENTAT	2 mL d'H ₂ O ultrapura
ELUCIÓ	5 mL de MeOH
EVAPORACIÓ I REDISSOLUCIÓ	1 mL de H ₂ O:MeOH (80:20, v/v)

4 DISCUSSIÓ DE RESULTATS

4.1 CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS

4.1.1 Optimització de la separació cromatogràfica

Després de la recerca bibliogràfica^{5,6,12,17,18}, es va considerar utilitzar com a components de la fase mòbil B el MeOH i, com a fase mòbil A, aigua acidificada a pH 3 per a evitar la ionització dels grups silanol de la columna.

Primerament, s'ha injectat una solució de MeOH:H₂O (10:90, v/v). Aquest pas és essencial per verificar el bon funcionament de la columna cromatogràfica i assegurar que el solvent usat no produeixi pics no identificables en les longituds d'ona seleccionades, garantint així una resolució adequada del cromatograma.

Posteriorment, s'ha injectat un patró de treball de 5 mg/L per a avaluar les condicions cromatogràfiques inicials i prosseguir amb l'optimització d'aquestes. Les condicions emprades són les que es mostren a la Taula 6¹².

Taula 6. Condicions inicials a optimitzar de la separació cromatogràfica

COLUMNA HPLC	Teknokroma, Mediterranea Sea18 Columna C ₁₈ 5 µm 15 × 0.46 cm
VOLUM D'INJECCIÓ	20 µL
FLUX	0.6 mL/min

FASE MÒBIL	A: H ₂ O (pH=3) B: MeOH
TEMPERATURA	30 °C
DETECTOR	UV
LONGITUD D'ONA DE DETECCIÓ	280 nm i 324 nm

Quant al gradient inicial fet servir per a començar l'optimització¹², és el mostrat a la Taula 7.

Taula 7. Gradient inicial a optimitzar

TEMPS (min)	% FASE ORGÀNICA (B)
0	9
5	10
12	11.5
22	27
28	34
30	34
31	9

Una vegada realitzada la separació cromatogràfica utilitzant el gradient inicial, s'obté el cromatograma de la Figura 3. En primer lloc, la detecció s'ha realitzat a dues longituds d'ona diferents per tal d'observar en quina de les dues s'aconsegueix la màxima resposta dels anàlits. A més, es veu que només s'han detectat 3 dels 4 compostos presents en el patró introduït. En aquest cas, es podria dir que el temps d'anàlisi establert no ha estat suficient per a detectar tots els anàlits. A més, també es pot notar que els temps de retenció de cada compost són molt elevats.

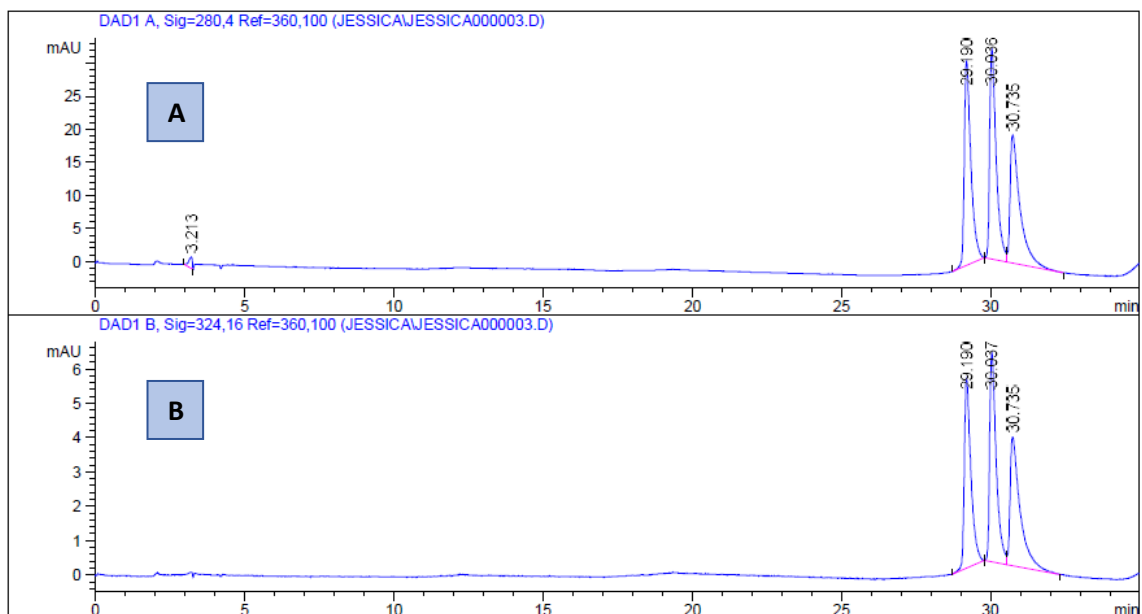


Figura 3. Separació cromatogràfica obtinguda amb el gradient inicial a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

Vists els resultats (Figura 3), és necessari portar a cap diferents proves, modificant tant el flux com el gradient, per a assolir una separació més eficient. Quant al gradient, es van dur a terme diferents ajustos del gradient de fase mòbil per tal d'obtenir una separació òptima dels anàlits amb una resolució adequada. El gradient optimitzat és el mostrat a la Taula 4 (pàgina 14).

Inicialment, es va utilitzar una columna C_{18} per a fer les separacions cromatogràfiques dels compostos. No obstant això, es va observar un problema: els compostos eren difícils de separar per les característiques similars que posseeixen. Això requeriria l'ús d'una fase mòbil amb baixa força d'elució, la qual cosa comportaria temps d'anàlisi llargs. Per solucionar això, es va substituir per una columna C_8 que, al ser més polar, permet disminuir els temps de retenció millorant així la separació cromatogràfica.

Quant al flux, s'ha de tenir precaució de no usar un flux massa alt, ja que això podria afectar negativament la separació dels compostos. En funció de les mides de la columna cromatogràfica, el flux recomanat varia entre 0.6 i 0.8 mL/min. Aquest interval de fluxos permet mantenir una bona resolució dels pics sense comprometre la integritat de la columna ni els resultats de l'anàlisi. Finalment, es va observar que amb un flux de 0.8 mL/min la resolució resultant era bona.

Mitjançant aquests ajustos del gradient de fase mòbil i el seu flux, s'obtenen uns cromatogrames amb una bona resolució dels pics (Figura 4), que permeten una identificació precisa, una quantificació fiable dels anàlits en mostres d'interès i, finalment, garanteixen una anàlisi cromatogràfica precisa i confiable.

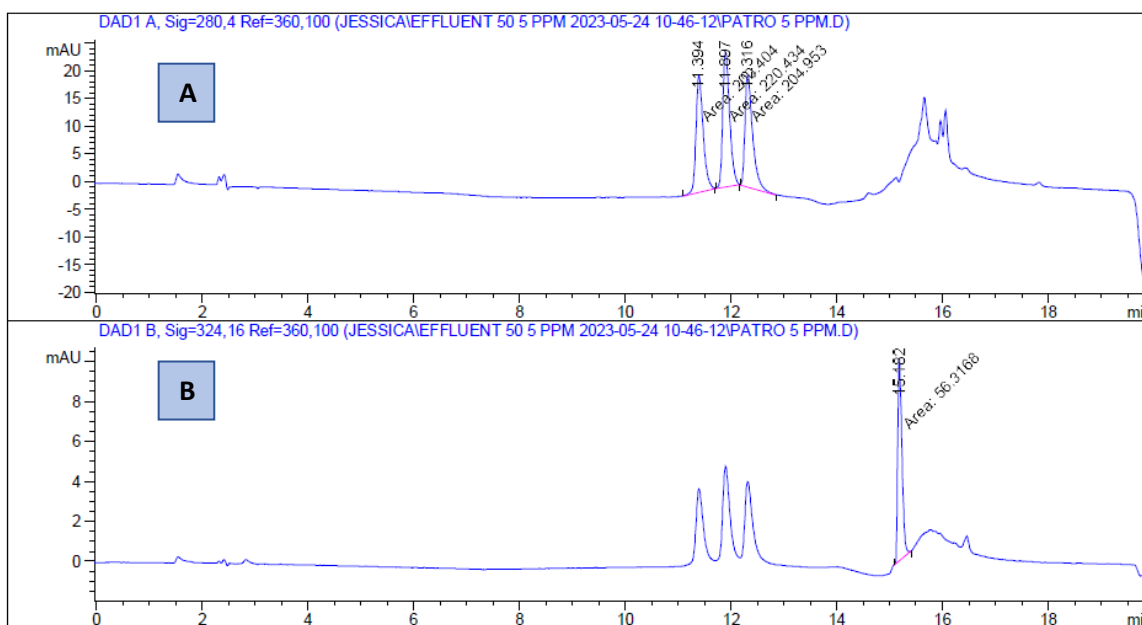


Figura 4. Separació cromatogràfica obtinguda amb el gradient òptim a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

En el cromatograma obtingut (Figura 4), s'observa la presència d'alguns pics no identificables associats a la fase mòbil usada. Per aquest motiu, tot i que en 17 minuts ja s'han detectat tots els anàlits, s'ha optat per mantenir un temps d'anàlisi de 20 minuts per netejar la columna i assegurar que les anàlisis posteriors no es vegin afectades per la seva presència.

Optimitzades les condicions, es procedeix a injectar els patrons individuals preparats amb l'objectiu d'identificar els pics corresponents a cada compost a analitzar. Aquests patrons individuals tenen una concentració coneguda de 5 mg/L, la qual s'ha seleccionat per garantir una identificació precisa dels pics i facilitar la seva detecció durant l'anàlisi.

Els temps de retenció finals de cada anàlit corresponen als mostrats en la Taula 8.

Taula 8. Temps de retenció per cada anàlit

<u>ANÀLITS</u>	<i>t_R</i> (min.)
NOR	11,12
CIPRO	11,66
ENRO	12,22
FLUME	15,14

Per tal d'obtenir la màxima resposta dels pics en el cromatograma, s'ha seleccionat una longitud d'ona de detecció de 280 nm per als anàlits CIPRO, ENRO i NOR, i una longitud d'ona de 324 nm per a l'anàlit FLUME. Cada compost conté unes propietats d'absorció diferents, fent que es puguin detectar i quantificar en una longitud d'ona determinada. D'aquesta manera, es garanteix l'obtenció d'una resposta òptima dels pics, millorant així la sensibilitat de l'anàlisi i disminuir els límits de detecció.

4.1.2 Validació instrumental

4.1.2.1 Linealitat

Després d'identificar els pics corresponents a cada anàlit en l'anàlisi cromatogràfica, es van realitzar les rectes de calibratge per a cada anàlit. Considerant que les mostres de llet solen contenir concentracions petites de les fluoroquinolones, es preparen patrons en un interval de linealitat de 0,25 a 10 mg/L.

Per a construir les rectes de calibratge, se sotmeten els patrons preparats a una separació cromatogràfica utilitzant les mateixes condicions cromatogràfiques òptimes (Taula 4, pàgina 14), obtenint l'àrea corresponent a cada compost.

Usant les àrees obtingudes i les concentracions conegudes dels patrons, s'ajusten a una recta de calibratge per mètode dels quadrats mínims (R^2).

$$\text{Àrea} = mx + n$$

On m és el pendent de la recta i, n , l'ordenada de l'origen. Les rectes de calibratge proporcionen una relació matemàtica entre l'àrea dels pics i les concentracions dels anàlits en les mostres. Aquestes rectes seran útils per a quantificar les concentracions dels anàlits en mostres desconegudes, fent ús de les àrees dels corresponents pics en

el cromatograma. A més, el coeficient de determinació (R^2) és un paràmetre que indica com s'ajusten els valors de la recta. Com més gran sigui el valor d'aquest coeficient, més petita serà la variabilitat segons el model de la regressió lineal. És a dir, menys error es cometrà a l'hora de fer les prediccions. Les rectes de calibratge obtingudes dels quatre anàlisis a estudiar es mostren a la Figura 5.

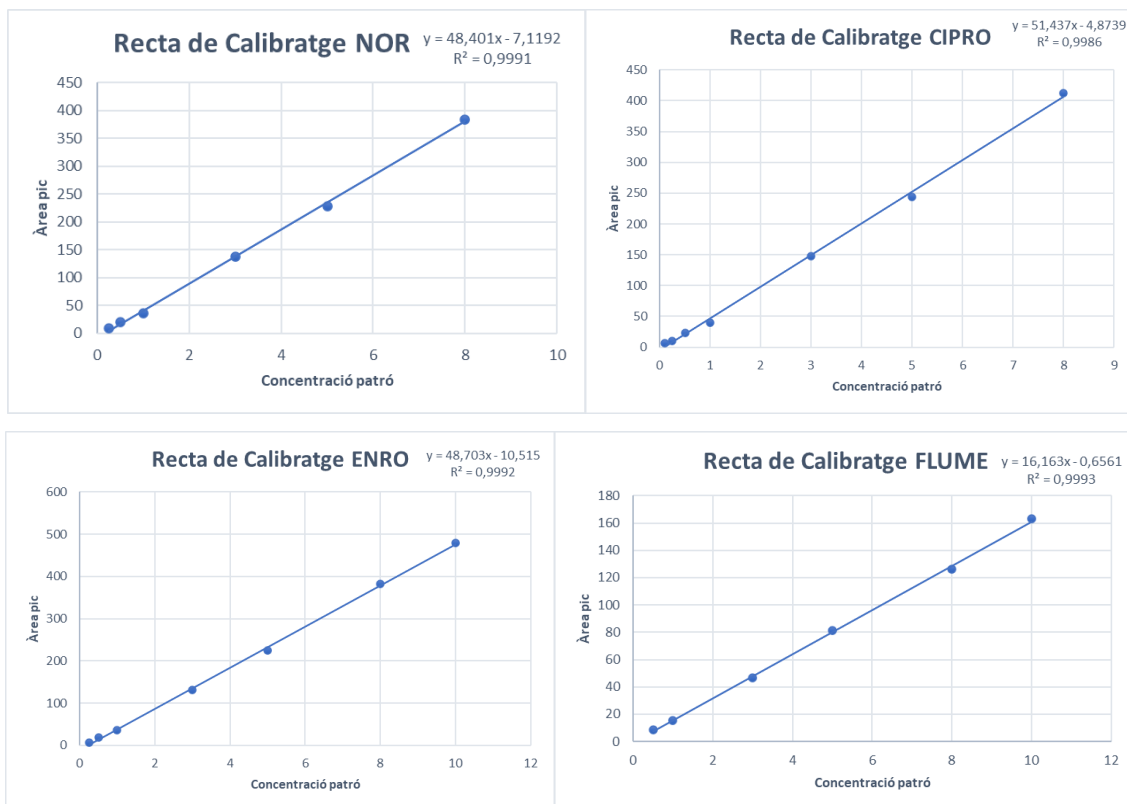


Figura 5. Rectes de calibratge pels compostos estudiats

Considerant una bona linealitat de la recta, així com un valor de R^2 acceptable, les rectes de calibratge obtingudes per a cada compost són les mostrades a la Figura 5. En primer lloc, es va observar que fent l'anàlisi del patró de 0.1 mg/L, el coeficient de determinació disminuïa lleugerament. Per aquest motiu i, juntament amb l'anàlisi de les rectes assolides, es podria dir que aquest valor marxava de la linealitat de la recta assolida. De manera que no es va tenir en compte aquesta concentració per a la realització de les rectes. Pel que fa al compost FLUME, tampoc es va considerar el patró de 0.25 mg/L per als mateixos motius que s'han comentat.

D'igual manera, amb el patró de 10 mg/L dels anàlits NOR i CIPRO s'afirmaven els mateixos problemes anteriors. Per la qual cosa, en aquests dos compostos tampoc es va tenir en compte aquesta concentració per a realitzar les rectes de calibratge.

Per la qual cosa els intervals de linealitat per als diferents compostos són els vistos a les mateixes rectes de la Figura 5.

4.1.2.2 Límits de detecció i quantificació

Cal tenir en compte els límits de detecció i quantificació del nostre mètode. El límit de detecció es va establir amb la concentració d'anàlit que donava una relació senyal/soroll superior a 3. Així doncs, es va establir com a aquest límit la concentració de 0.1 mg/L. La Figura 6 mostra els cromatogrames obtinguts a aquesta concentració.

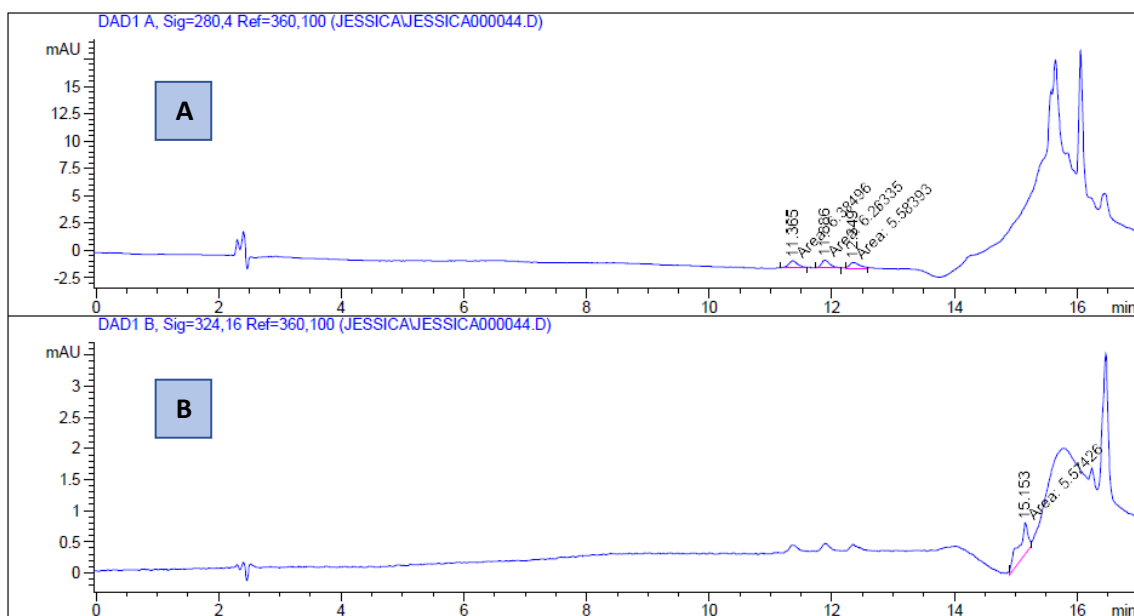


Figura 6. Cromatògraf dels patrons de 0,1 mg/L, a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

Observant els cromatogrames de la Figura 6, es pot demostrar que el mètode optimitzat és capaç de detectar els anàlits a aquesta concentració.

Referent al límit de quantificació, aquest s'estima com el valor més baix de la recta de calibratge i indica el punt on el senyal analític és prou precís per a poder fer la quantificació dels anàlits.

4.1.2.3 Precisió

A partir de l'estudi de la precisió, es van determinar la repetibilitat i la reproductibilitat entre dies.

Pel que fa a la repetibilitat del mètode, consisteix en el grau de concordança entre mesures independents dutes a terme amb el mateix mètode, el mateix material i en idèntiques condicions.

Quant a la reproductibilitat del mètode, consisteix en el grau de concordança entre mesuraments independents duts a terme amb el mateix mètode i el mateix material, però en condicions diferents. En aquest cas, quan s'avalua la reproductibilitat, algunes de les variables que poden variar entre les diverses mesures fetes són la temperatura, la pressió, la humitat, el temps, l'operador, etc.¹⁹

Per dur a terme aquests estudis, és necessari fer mesures per triplicat d'un patró de concentració adequada durant diversos dies que, en aquest cas, han estat 3 dies diferents. Mitjançant l'anàlisi i la interpretació d'aquestes dades, és possible realitzar un estudi de la repetibilitat i la reproductibilitat entre dies del mètode optimitzat, per a cada compost analitzat. Aquest procés permet avaluar la capacitat de reproduir els resultats del procés a diferents moments, proporcionant una validació del nostre mètode analític.

4.1.2.3.1 Repetibilitat

Representa quina és la disparitat del mètode d'injecció en un mateix dia, considerant que s'ha injectat per triplicat patrons de 5 mg/L. A la Taula 9 es mostren els resultants obtinguts.

Taula 9. Desviació estàndard relativa del mètode d'injecció en un mateix dia

<u>ANÀLITS</u>	<u>RSD (%)</u>
NOR	3,41
CIPRO	1,75
ENRO	2,50
FLUME	3,73

En observar la Taula 9, es pot notar que les desviacions assolides tenen valors petits, la qual cosa indica que les dades estan poc disperses. Per tant, es pot afirmar que el mètode d'injecció mostra una bona repetibilitat.

4.1.2.3.2 Reproductibilitat

Amb aquest cas, es comprovarà quina és la dispersió del mètode en elaborar les anàlisis per triplicat en diferents dies. A la Taula 10 es mostren els resultats finals.

Taula 10. Desviació estàndard relativa del mètode d'injecció en diferents dies

<i>ANÀLITS</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>NOR</i>	1,15
<i>CIPRO</i>	1,07
<i>ENRO</i>	1,41
<i>FLUME</i>	22,24

En analitzar els resultats obtinguts de la Taula 10, es pot afirmar que els valors de desviació són baixos, el que indica que els resultats són reproduïbles entre si. No obstant això, es pot veure que l'anàlit FLUME té una desviació més alta, indicant certa dispersió en les anàlisis realitzades en diferents dies per aquest anàlit.

Cal comentar que, tot i que els valors de reproductibilitat son més baixos que els de repetibilitat, en ambdós casos indiquen que hi ha bona precisió.

4.2 EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

4.2.1 Optimització amb solucions patró

Per a optimitzar la separació en fase sòlida en l'anàlisi de les fluoroquinolones, és convenient realitzar diverses proves amb les condicions usades.

Per començar, es fan servir les condicions inicials utilitzades segons l'article de referència¹², les quals es mostren a la Taula 11.

Taula 11. Condicions inicials de l'SPE

CARTUTX	Strata-X 33 u Polymeric Reversed Phase
CONDICIONAMENT	2 mL de MeOH
	2 mL d'H ₂ O ultrapura
CÀRREGA	5 mL de mostra
RENTAT	2 mL d'H ₂ O ultrapura
ELUCIÓ	2mL 1% TFA:ACN (25:75, v/v)
REDISSOLUCIÓ	200 µL d'àcid cítric:ACN (91:9, v/v), a pH 2.7

En primer lloc, és important l'ús dels patrons de concentracions conegudes per tal d'observar en tot moment la capacitat de retenció de les fluoroquinolones en el cartutx. Per a determinar tal cosa, s'analitza la fracció recollida de mostra una vegada aquesta ha passat pel cartutx. El cromatograma obtingut es mostra a la Figura 7.

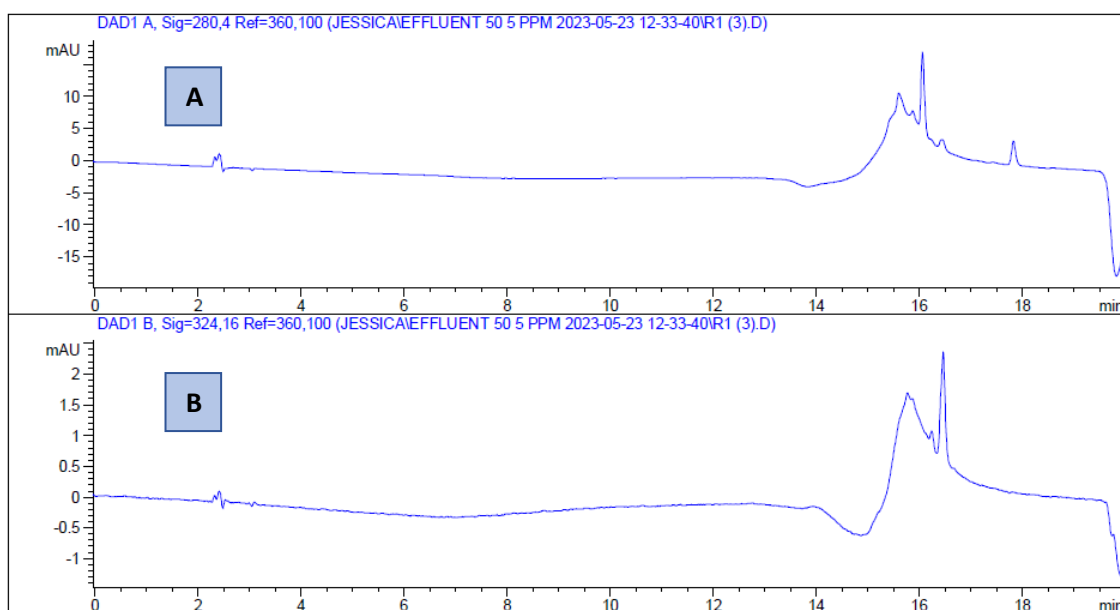


Figura 7. Cromatograma obtingut per a la fracció recollida de mostra després de passar pel cartutx, a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

S'afirma que els compostos queden ben retinguts, ja que, com s'observa en la Figura 7, no s'observa cap pic significatiu al mateix temps de retenció que els nostres compostos.

En segon lloc, s'avalua l'efecte del pH en la recuperació dels anàlits, buscant el pH òptim que maximitzi la recuperació. En aquest sentit, es fan proves ajustant l'aigua

ultrapura a pH 3 i 7. La Taula 12 mostra els resultats d'aquests experiments realitzats als diferents pH.

Taula 12. Recuperacions obtingudes amb patrons preparats a pH=3 i pH=7

<u>ANÀLITS</u>	Recuperació (%) pH=3	Recuperació (%) pH=7
NOR	94.1	77.5
CIPRO	91.8	74.1
ENRO	91.1	79.6
FLUME	93.8	86.6

Després d'avaluar els resultats obtinguts (Taula 12), s'ha arribat a la conclusió que és més favorable utilitzar un medi àcid per a retenir els compostos al cartutx, a causa de les millors recuperacions assolides.

En relació amb el solvent d'elució, s'han dut a terme diverses proves augmentant el volum de 2 mL en 2 mL per comprovar si el metanol té prou força per a arrossegar tots o la majoria dels compostos retinguts. Es va comprovar que amb volums de solvent de 2 mL no n'hi havia prou per a eluir la majoria dels compostos, tal com es pot veure en els resultats de la Taula 13.

Taula 13. Recuperacions obtingudes per a cada elució i en total

<u>ANÀLITS</u>	Recuperació (%)	Recuperació (%)	Recuperació (%)	Recuperació (%) TOTAL
	1a fracció d'elució	2a fracció d'elució	3a fracció d'elució	
NOR	67.8	23.5	0.0	91.3
CIPRO	65.3	22.5	0.0	87.8
ENRO	39.3	45.4	15.3	100.0
FLUME	20.2	55.6	22.6	98.3

Seguidament, vist que amb gairebé 6 mL de metanol s'elueixen la major part dels anàlits (Taula 13), es va fer una prova eluint directament amb 5 mL de MeOH, els resultats dels quals es mostren a la Taula 14.

Taula 14. Recuperacions obtingudes amb 5 mL de MeOH per a fer l'elució dels anàlits

<u>ANÀLITS</u>	<i>Recuperació (%)</i>
<i>NOR</i>	94.1
<i>CIPRO</i>	91.8
<i>ENRO</i>	91.1
<i>FLUME</i>	93.8

Considerant les recuperacions de la Taula 13 i 14, es conclou que, utilitzant un volum de 5 mL de MeOH per a eluir els compostos, n'és suficient per a garantir una recuperació acceptable dels compostos.

Una vegada seleccionat el pH i el volum de solvent d'elució, s'ha augmentat el volum de solució patró que es carrega. Les recuperacions obtingudes fent servir com a volum de càrrega 5 mL i 10 mL, es mostren a la Taula 15.

Taula 15. Recuperacions obtingudes amb un volum de càrrega de 5 i de 10 mL.

<u>ANÀLITS</u>	<i>Recuperació 5 mL (%)</i>	<i>Recuperació 10 mL (%)</i>
<i>NOR</i>	94.1	83.3
<i>CIPRO</i>	91.8	81.4
<i>ENRO</i>	91.1	81.9
<i>FLUME</i>	93.8	86.0

En la Taula 15, s'observa que usant un volum de càrrega de 10 mL encara s'obtenen bons resultats de recuperació. Per tant, es conclou que el volum de càrrega de la mostra problema pot ser de 10 mL.

Una altra consideració important és l'etapa de rentat, on es busca verificar si aquesta etapa afecta negativament a les recuperacions dels compostos d'interès. Segons l'article de referència¹², s'empren 2 mL d'aigua ultrapura per al rentat, i en realitzar aquest pas de forma experimental s'observa que els compostos d'interès no s'elueixen. A la Taula 16 es mostren les recuperacions obtingudes quan s'inclou o no l'etapa de rentat en el protocol de l'SPE.

Taula 16. Recuperacions obtingudes sense realitzar l'etapa de rentat

<u>ANÀLITS</u>	Recuperació (%) sense l'etapa de rentat	Recuperació (%) amb l'etapa de rentat
NOR	83.3	74.7
CIPRO	81.4	72.4
ENRO	81.9	83.9
FLUME	86.0	83.4

Atès que les mostres de llet tenen una matriu complexa i que les recuperacions amb i sense rentat no presenten diferències significatives (Taula 16), es pot afirmar que és possible incloure aquesta etapa en el tractament de la mostra.

Finalment, és considerable tenir en compte l'etapa d'evaporació. S'ha constatat que les fluoroquinolones es troben presents a la llet en concentracions molt baixes. Per la qual cosa, s'avalua la realització d'una etapa d'evaporació i redissolució dels anàlits per a preconcentrar la mostra i arribar als límits de detecció i quantificació establerts pel nostre mètode.

Amb aquest propòsit, per determinar si durant aquesta fase alguns anàlits s'evaporen i es perden, es prepara un patró de concentració adequada en metanol (MeOH), que és el solvent utilitzat en l'elució dels compostos. A continuació, aquest es sotmet a un procés d'evaporació fins a sequedat i, posteriorment, és redissol amb 1 mL d'una solució d'aigua i metanol (H₂O:MeOH, 80:20, v/v).

És important assegurar-se de redissoldre bé els anàlits després de l'evaporació per a evitar errors significatius en les concentracions mesurades. Les recuperacions obtingudes en aquest cas es mostren a la Taula 17.

Taula 17. Recuperacions obtingudes amb l'evaporació

<u>ANÀLITS</u>	Recuperació (%)
NOR	62.5
CIPRO	65.0
ENRO	71.3
FLUME	97.8

A partir dels resultats de recuperació obtinguts (Taula 17), comparant-los amb els anteriors (Taula 16, Recuperació (%) amb l'etapa de rentat), es pot concloure que tot i que una part dels anàlits es perden en aquest pas, és necessari realitzar-lo per tal de poder arribar als límits establerts.

Per validar el mètode optimitzat fins aleshores, es va fer un estudi de validació amb quatre repeticions utilitzant solucions patró. Aquest, va permetre determinar la recuperació assolida per a cada anàlit, així com calcular la desviació per a cada un d'ells. Els resultats d'aquest estudi es mostren a la Taula 18.

Taula 18. Càlcul de la recuperació del mètode per triplicat i càlcul de la desviació estàndard

<u>ANÀLITS</u>	Recuperació (%)	% RSD (n=4)
<i>NOR</i>	62.5	5.4
<i>CIPRO</i>	67.7	4.8
<i>ENRO</i>	74.5	7.7
<i>FLUME</i>	88.2	13.9

És important fer aquesta validació per tal d'avaluar la precisió del mètode, i per a assegurar-se que els resultats obtinguts són fiables i concordants.

4.2.2 Optimització amb mostres de llet

Optimitzades les condicions en solucions patró, s'han de comparar les condicions òptimes amb mostres de llet per a avaluar l'efectivitat del mètode seleccionat. Aquestes proves s'han de realitzar utilitzant les condicions optimitzades i mostres de llet fortificades, de manera que es pugui observar clarament un bon pic en el cromatograma resultant.

La raó de dur a terme diverses proves experimentals amb les mostres de llet és que aquestes contenen una matriu molt complexa i, a causa de possibles interferències, el mètode pot no ser vàlid en aquest tipus de mostres alimentàries.

En primer lloc, es mesura la recuperació en mostres de llet usant el procediment establert i s'analitza un problema: en acidificar la mostra de llet fins a un pH de 3, la llet es tallava i precipitava. Per tant, es conclou que tot i obtenir millors recuperacions

amb un pH àcid, s'opta per utilitzar el pH de la llet (aproximadament, pH=6.7) per evitar la precipitació d'aquesta.

Per avaluar la fiabilitat del mètode, s'han realitzat estudis amb mostres fortificades de llet per observar la recuperació dels compostos. Així doncs, s'han preparat mostres de llet fortificades amb la quantitat adequada del patró mescla de 100 mg/L.

En primer lloc, es va realitzar un estudi per investigar si l'etapa de rentat té algun impacte en les recuperacions dels anàlits en aquest tipus de mostres complexes.

Posteriorment, es van portar a cap estudis variant el volum de càrrega de la mostra de llet. Es va veure que usant un patró de 5 mL de volum de càrrega, les recuperacions eren lleugerament millors en comparació amb un volum de 10 mL (Taula 15, pàgina 27). Per aquesta raó, tot i que s'havia determinat un volum de càrrega de 10 mL fent servir el patró, es va avaluar si aquest volum afectava significativament a les recuperacions en mostres de llet.

Finalment, es va tenir en compte l'etapa d'evaporació com a part del procediment per a preconcentrar els compostos, per tal de comprovar si aquesta etapa de concentració afectava negativament a les recuperacions dels anàlits en aquest tipus de mostres complexes.

Tots els resultats obtinguts dels estudis realitzats es mostren a la Taula 19.

Taula 19. Recuperacions obtingudes realitzant els diversos estudis amb les mostres de llet fortificades

<u>ANÀLITS</u>	<i>Recuperació (%) 5 mL sense rentat</i>	<i>Recuperació (%) 5 mL amb rentat</i>	<i>Recuperació (%) 10 mL amb rentat</i>	<i>Recuperació (%) 10 mL amb rentat i etapa d'evaporació</i>
<i>NOR</i>	79.0	83.2	76.4	71.9
<i>CIPRO</i>	74.4	79.3	73.7	72.3
<i>ENRO</i>	89.7	96.3	94.2	97.4
<i>FLUME</i>	71.4	59.7	73.0	78.3

Vists els resultats aconseguits (Taula 19) amb aquest tipus de mostres fortificades, es conclouen les condicions finals òptimes de l'extracció en fase sòlida:

- En primer lloc, les recuperacions observades entre els dos volums de càrrega no difereixen significativament, per la qual cosa es determina que el volum final de càrrega és de 10 mL.
- D'altra banda, es veu que l'etapa de rentat no afecta les recuperacions. Tenint en compte que la llet és una mostra complexa, és important considerar aquesta etapa de rentat per evitar la presència de substàncies que puguin interactuar amb els anàlits i afectar els resultats finals.
- Finalment, es conclou que considerar l'etapa d'evaporació i la posterior redissolució dels anàlits no tenen un impacte significatiu en els resultats finals.

En resum, el mètode optimitzat consta de dues etapes. En primer lloc, una separació en fase sòlida que consta dels següents passos:

1. Condicionament del cartutx amb 2 mL de MeOH i 2 mL d'H₂O ultrapura.
2. Càrrega de 10 mL de mostra de llet.
3. Etapa de rentat amb 2 mL d'H₂O ultrapura.
4. Elució dels compostos amb 5 mL de MeOH.
5. Evaporació de la fracció eluïda fins a sequedat.
6. Redissolució dels anàlits amb 1 mL de solució de H₂O:MeOH (80:20, v/v).

Posteriorment, es procedeix amb la separació cromatogràfica, amb les condicions detallades a la Taula 4 (pàgina 14).

Optimitzat per complet tot el procediment, es va elaborar una anàlisi per triplicat amb mostres de llet fortificades per tal d'obtenir les recuperacions dels anàlits en mostres de llet comercial. Els resultats obtinguts són els mostrats a la Taula 20.

Taula 20. Recuperacions i desviacions obtingudes amb l'anàlisi per triplicat de les mostres fortificades

<u>ANÀLITS</u>	Recuperació (%)	% RSD (n=3)
<i>NOR</i>	75.6	6.1
<i>CIPRO</i>	68.0	4.7
<i>ENRO</i>	87.9	3.0
<i>FLUME</i>	76.9	5.4

4.2.3 Validació del mètode analític

Un cop optimitzat el mètode, cal determinar els límits de detecció i quantificació del mètode òptim per a comprovar si aquests arriben a les concentracions establertes pels MRL.

Pel que fa al límit de detecció (LOD), s'ha establert una concentració límit de 0.1 mg/L, ja que aquesta és la concentració que donava una relació senyal/soroll inferior a 3. Tenint en compte els factors de dilució utilitzats durant el procés òptim i les recuperacions de cada compost (Taula 20), es pot fer una estimació dels valors de detecció de cada anàlit. A més, cal considerar la densitat de la llet* per a donar els resultats finals del LOD. Aquests valors són aproximats ja que no s'han pogut comprovar experimentalment, i són els mostrats a la Taula 21.

*La densitat de la llet oscil·la entre 1.028 i 1.035 g/mL o kg/L. Per això, considerem com a densitat de la llet la mitjana dels valors esmentats, és a dir, 1.0315 kg/L.²⁰

Taula 21. Estimació aproximada dels límits de detecció dels compostos analitzats

<u>ANÀLITS</u>	Concentració mínima que es pot detectar ($\mu\text{g/Kg}$)
<i>NOR</i>	13.04
<i>CIPRO</i>	15.35
<i>ENRO</i>	10.15
<i>FLUME</i>	12.60

Per tant, considerant els valors de la Taula 21, es pot dir que, aquelles mostres de llet que continguin unes concentracions inferiors, no seran detectables pel nostre mètode. En aquest cas, seria necessari fer ús de tècniques més selectives que continguin uns LODs més baixos.

Quant als límits de quantificació, s'ha de tenir en compte els límits de quantificació de cada anàlit segons les rectes de calibratge obtingudes. Suposant que aquestes concentracions són les que es troben en una mostra de llet analitzada després de realitzar tot el procés optimitzat, i tenint en compte les recuperacions de cada anàlit (Taula 20), s'assoleixen les concentracions mostrades a la Taula 22.

Taula 22. Concentracions mínimes dels analits a quantificar amb el nostre mètode optimitzat

<u>ANÀLITS</u>	Concentració mínima que es pot quantificar ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
<i>NOR</i>	43.35
<i>CIPRO</i>	33.28
<i>ENRO</i>	36.15
<i>FLUME</i>	70.02

Els valors obtinguts a la Taula 22, són valors aproximats ja que no s'han comprovat de manera experimental.

A més, tenint en compte els límits màxims de residus (MRLs) establerts, concretament el límit de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ per a NOR i CIRPO, s'observa que els dos tenen valors més baixos a aquests, permetent així la determinació d'aquests compostos per sota del MRL. També, aquests valors signifiquen que el nostre mètode no seria capaç de quantificar concentracions dels analits superiors a les observades en la Taula 22.

4.3 ANÀLISIS DE LES MOSTRES PROBLEMA

Finalment, es van analitzar mostres de llet de diferents característiques, tal com llet semidesnatada, sencera, sense lactosa, o inclús llets semidesnatades de diferents marques comercials.

L'objectiu d'elaborar aquestes anàlisis amb el mètode òptim és per comprovar si es troba la presència de fluoroquinolones en aquestes mostres problema i, a més, determinar si la quantitat trobada conté uns valors de concentració per sota dels límits màxims establerts (MRL).

Per dur a terme tal cosa, es prenen mostres de diferents tipus de llet i se sotmeten a tot el procés optimitzat d'extracció en fase sòlida i d'anàlisi cromatogràfica. A partir dels cromatogrames obtinguts i considerant els temps de retenció aproximats de cada un dels compostos estudiats, es determina la presència d'alguns dels compostos d'interès.

4.3.1 Llet semidesnatada

En aquest cas, es va analitzar llet semidesnatada de dues marques comercials diferents. En primer lloc, es va determinar la presència dels compostos en llet de la marca *Llet Nostra*. Analitzant per triplicat mostres d'aquesta llet, amb el procés òptim, es van obtenir els resultats, com els que es mostren a la Figura 8.

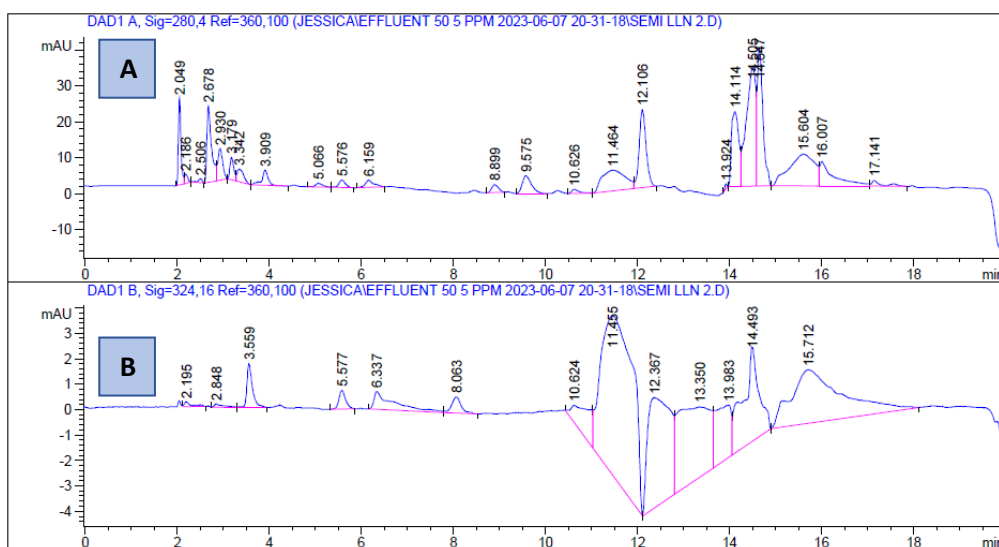


Figura 8. Cromatògraf obtingut en l'anàlisi de la mostra de llet semidesnatada (*Llet Nostra*), a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

En observar el cromatograma de la Figura 8, es detecten diversos pics, però la seva forma i els temps de retenció indicats, poden correspondre a altres compostos que puguin haver-hi en la mostra de llet. Per tant, això permet concloure que el nostre mètode no detecta cap fluoroquinolona a concentracions per sobre del límit de detecció. Aquest fet pot ser degut al compliment dels procediments i temps d'espera adequats durant el processament i adquisició de la llet per part d'aquesta marca comercial.

Per altra banda, també es va dur a terme l'anàlisi de mostres de llet semidesnatada de la marca comercial *Bolmilk*. Sotmetent per triplicat mostres d'aquesta llet al mateix procediment, es van interpretar els cromatògrafs obtinguts, tal com es mostra en l'exemple de la Figura 9.

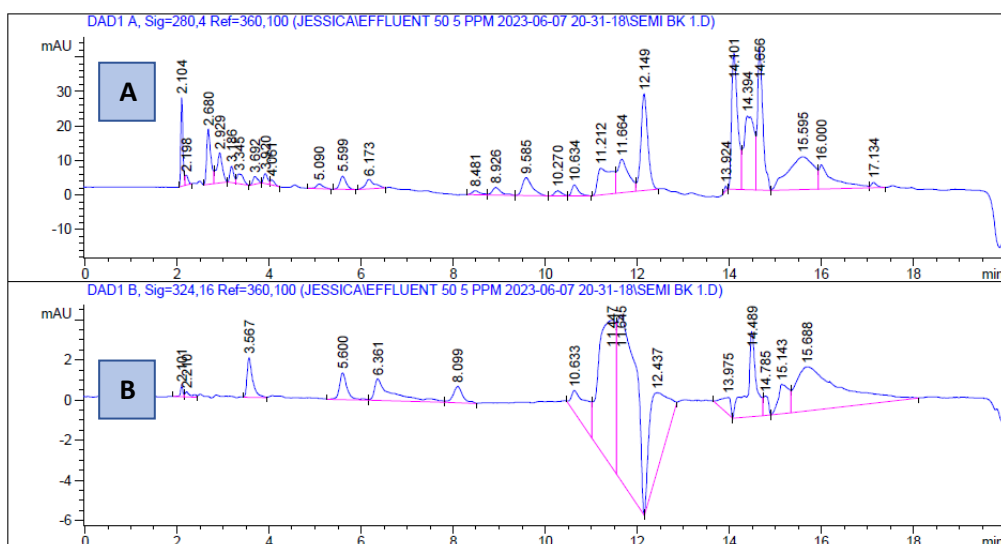


Figura 9. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la mostra de llet semidesnatada (Bomilk), a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

Analitzant la Figura 9, es podrien extreure les mateixes conclusions anteriors, és a dir, ja que no es pot apreciar la presència d'alguns dels anàlits estudiats a concentracions per sobre del límit de detecció, basant-se en la forma dels pics i els temps de retenció de les fluoroquinolones. No obstant això, s'observa un pic a un temps de retenció d'11.664 minuts, el qual podria correspondre a l'anàlit CIPRO. El problema és que aquest pic es troba superposat amb algun altre compost i, per tant, no es pot quantificar. Per la qual cosa, es pot afirmar que en aquestes mostres de llet comercial és possible detectar algun anàlit estudiat, tot i que no es pot determinar amb certesa si aquest pic en particular correspon a un anàlit o a un altre compost aleatori.

En cas de voler identificar i quantificar el possible pic trobat, seria necessari utilitzar mètodes d'anàlisi més complets, com ara la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses (LC-MS), obtenint així una proporció una separació i detecció més selectiva i sensible.

4.3.2 Llet sencera

Un altre tipus de llet analitzada és la llet sencera, la qual és més densa i no ha estat sotmesa a processos de tractament per a extreure part dels greixos. Es va fer l'anàlisi per triplicat d'una mostra d'aquesta llet i, després de sotmetre-les al mateix procés d'anàlisi que en els casos anteriors i de l'anàlisi cromatogràfica, es van interpretar els cromatogrames obtinguts. A la Figura 10 s'hi mostra un exemple.

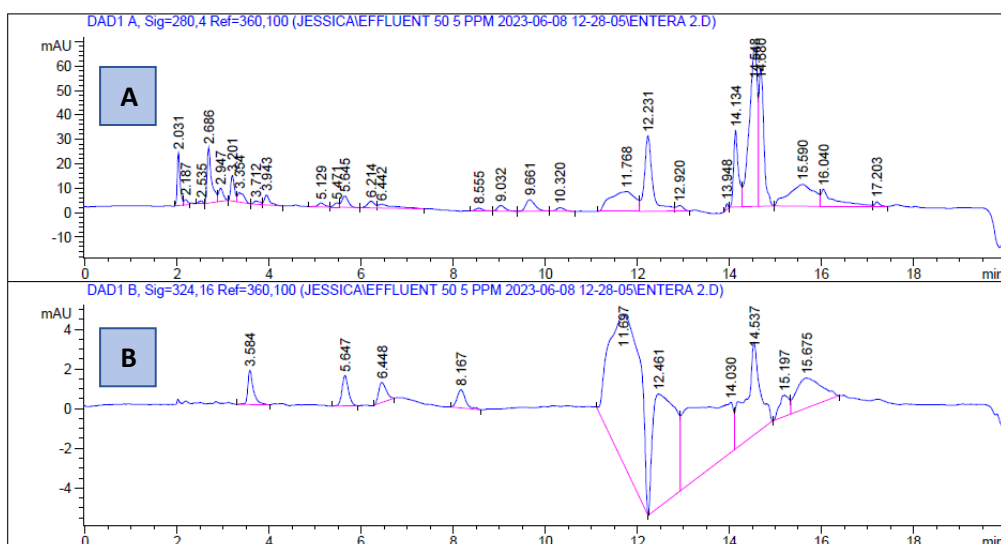


Figura 10. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de mostres de llet sencera (Pascual), a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

En aquest cas (Figura 10), es repeteix la situació observada en les mostres anteriors. Els pics en els cromatogrames no revelen la presència de cap dels compostos estudiats a concentracions per sobre del límit de detecció. Malgrat això, es pot sospitar la presència del compost CIPRO en el temps de retenció 11.76 minuts, però com que el pic és ample, és possible que estigui superposat amb altres anàlits no estudiats o que no correspongui a aquest compost en concret. A més, també es pot sospitar que, en el temps de retenció de 12.231 minuts, on apareix un pic intens, correspongui al compost ENRO. Però, en analitzar els cromatogrames a diferents longituds d'ona, es detecta un senyal negatiu a $\lambda=324$ nm. Comparant-ho amb els cromatogrames dels patrons (Figura 4, pàgina 19), es pot concloure que aquest pic no correspon a cap dels anàlits estudiats, ja que els nostres anàlits mostren senyals positius a ambdues longituds d'ona.

4.3.3 Llet sense lactosa

Finalment, es va realitzar l'anàlisi per triplicat d'una mostra de llet sense lactosa, la qual ha estat sotmesa a múltiples tractaments per a eliminar la lactosa que i fer-la apta per a les persones intolerants o al·lèrgiques a aquesta substància. Posteriorment a l'anàlisi, es van analitzar els cromatogrames obtinguts, dels quals es mostra un exemple a la Figura 11.

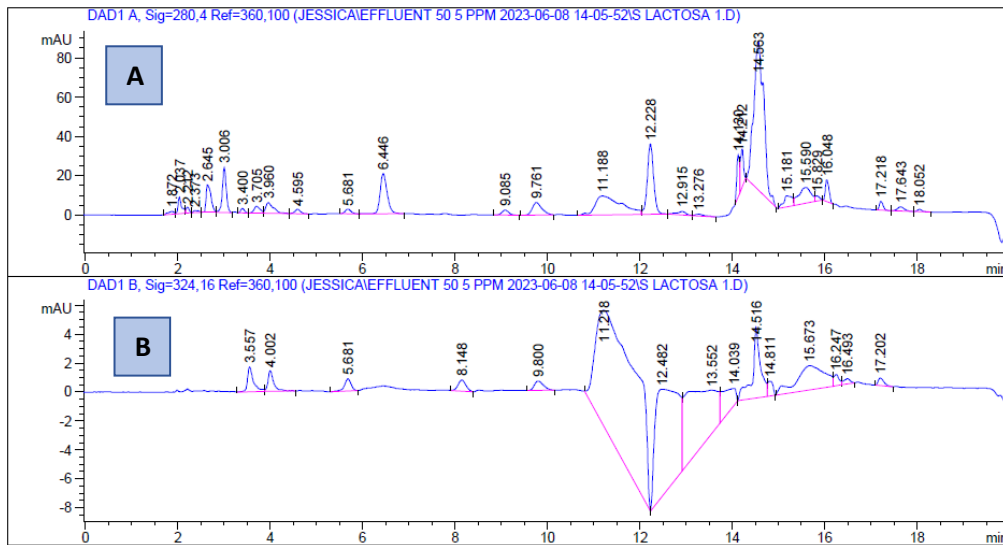


Figura 11. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de mostres de llet sense lactosa, a les dos longituds d'ona de detecció (A: 280 nm, B: 324 nm).

Basant-se en els resultats obtinguts (Figura 11), és possible obtenir les mateixes conclusions anteriorment ja extretes. És a dir, per la forma dels pics i la interpretació dels cromatogrames en ambdues longituds d'ona, no s'observa la presència de cap pic que correspongui als anàlits d'interès. Això suggereix que potser cap dels compostos estudiats està present en concentracions per sobre del límit de detecció o, si ho estan, es troben en concentracions no detectables pel nostre mètode.

5 CONCLUSIONS

Mitjançant el desenvolupament del mètode d'anàlisi, s'ha aconseguit un procediment senzill i adequat per a la detecció i determinació de fluoroquinolones en mostres de llet comercial, a partir de l'extracció en fase sòlida dels anàlits i la posterior determinació i quantificació amb cromatografia de líquids i un detector UV.

S'han realitzat diverses proves optimitzant el gradient i el flux de la separació cromatogràfica per obtenir unes condicions cromatogràfiques adequades amb temps de retenció i temps d'anàlisi adients. Per a reduir els temps de retenció i millorar l'eficiència i resolució cromatogràfica, s'ha utilitzat una columna C₈ en lloc de la columna C₁₈ tradicional. Això ha permès aconseguir uns cromatogrames més eficaços.

La llet és una mostra amb una matriu complexa, per la qual cosa s'ha optat per usar l'extracció en fase sòlida com a tècnica d'extracció. S'han dut a terme diversos estudis per determinar les condicions òptimes d'extracció, assegurant que els anàlits es retenguin adequadament en el cartutx d'extracció seleccionat i s'elueixin en major part pel solvent d'elució, evitant pèrdues significatives durant aquest procés.

Amb les condicions òptimes establertes, s'han fet les rectes de calibratge emprant patrons a diferents concentracions. Amb aquestes, s'han pogut realitzar els diversos càlculs de recuperació dels nostres anàlits i, així, s'han pogut observar quines són les millors condicions a usar per a poder obtenir unes recuperacions acceptables dels nostres compostos.

Finalment, s'ha demostrat que el mètode desenvolupat és capaç de detectar i quantificar les fluoroquinolones en mostres de llet. Tot i això, cal considerar que, totes aquelles mostres que presentin una concentració inferior al límit de quantificació, no es podran quantificar. De la mateixa manera, el mètode serà capaç de detectar la presència de fluoroquinolones sempre i quan tinguin unes concentracions iguals o superiors al límit de detecció establert. Cal destacar que, en cas de voler quantificar i/o detectar concentració inferiors als valors determinats, serà necessari l'ús d'altres metodologies més selectives, com ara la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses (LC-MS).

Centrant-se en les mostres de llet analitzades, no s'ha observat la presència de cap dels anàlits estudiats. Això indica que les marques comercials analitzades compleixen les regulacions de seguretat establertes, com ara respectar els temps d'espera indicats. A més, aquests resultats també garanteixen que tots els productes làctics analitzats no contenen residus de fàrmacs o, si ho fan, les concentracions es troben per sota del límit màxim de residus establert (MRL).

Through the development of the analysis method, a simple and adequate procedure has been achieved for the detection and determination of fluoroquinolones in commercial milk samples, starting with solid-phase extraction by the analysts and subsequent determination and quantification with chromatography of liquids and a UV detector.

Several tests have been performed to optimize the gradient and flux of chromatographic separation to obtain suitable chromatographic conditions with appropriate retention times and analysis times. To reduce retention times and improve chromatographic efficiency and resolution, a C8 column has been used instead of the traditional C18 column. This has enabled more effective chromatograms to be achieved.

Milk is a complex sample with a complex matrix, so it has been chosen to use solid-phase extraction as an extraction technique. Several studies have been carried out to determine optimal extraction conditions, ensuring that the analysts are properly retained in the selected extraction cartridge and eluded mostly by the elution solvent, avoiding significant losses during this process.

With the optimal conditions set, calibration lines have been made using patterns at different concentrations. With these, we have been able to carry out the various calculations for the recovery of our analysts, and we have thus been able to see what the best conditions are to be used to obtain acceptable recoveries from our compounds.

Finally, the method developed has been shown to be capable of detecting and quantifying fluoroquinolones in milk samples. However, all samples that exhibit a

concentration lower than the quantification limit cannot be quantified. Similarly, the method will be able to detect the presence of fluoroquinolones if they have concentrations equal to or greater than the established detection limit. It should be noted that, in the event of wanting to quantify and/or detect concentrations below the given values, it will be necessary to use other more selective methodologies, such as liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS).

Focusing on the analysed milk samples, the presence of the analysts studied has not been observed. This indicates that the trademarks analysed comply with established safety regulations, such as respecting the indicated waiting times. In addition, these results also ensure that all tested dairy products do not contain drug residues or, if they do, concentrations are below the established maximum residue limit (MRL).

6 BIBLIOGRAFIA

- (1) Cavaller, N. *La Importància de l'alimentació per a l'aprenentatge*; 2019.
- (2) Agència de Salut Pública de Barcelona. *LA VIGILÀNCIA I EL CONTROL DE MEDICAMENTS VETERINARIS I ELS SEUS RESIDUS EN ANIMALS*; Catalunya, 2012. <http://www.gencat.cat/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1312/index.html>.
- (3) *¿Afectan los medicamentos veterinarios a los alimentos? | Comunidad de Madrid.* <https://www.comunidad.madrid/servicios/salud/afectan-medicamentos-veterinarios-alimentos> (accessed 2023-06-06).
- (4) *LA VIGILÀNCIA I EL CONTROL DE MEDICAMENTS VETERINARIS I ELS SEUS RESIDUS EN ANIMALS I ALIMENTS D'ORIGEN ANIMAL A CATALUNYA*; 2007.
- (5) Hassouan, M. Karim. *Desarrollo de Nueva Metodología Analítica Para La Determinación de Quinolonas En Alimentos de Origen Animal*; Editorial de la Universidad de Granada, 2006.
- (6) Lombardo Agüí, M. *Nuevas Metodologías Analíticas Para La Determinación de Quinolonas y Otros Residuos En Muestras Alimentarias y Ambientales*; Editorial de la Universidad de Granada, 2013.
- (7) *Quinolonas y fluoroquinolonas de administración sistémica: nuevas restricciones de uso | Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.* https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohuma-no-3/seguridad-1/2018/ni_muh_fv-14-2018-quinolonas-fluoroquinolonas/?lang=ca (accessed 2023-06-10).
- (8) Valdés, L.; Pérez, I.; De Ménorval, L. C.; Altshuler, E.; Fossum, J. O.; Rivera, A. A Simple Way for Targeted Delivery of an Antibiotic: In Vitro Evaluation of a Nanoclay-Based Composite. *PLoS One* **2017**, *12* (11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0187879>.
- (9) Graouer-Bacart, M.; Sayen, S.; Guillon, E. Adsorption of Enrofloxacin in Presence of Zn(II) on a Calcareous Soil. *Ecotoxicol Environ Saf* **2015**, *122*, 470–476. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2015.09.019>.
- (10) Yang, W.; Lu, Y.; Zheng, F.; Xue, X.; Li, N.; Liu, D. Adsorption Behavior and Mechanisms of Norfloxacin onto Porous Resins and Carbon Nanotube. *Chemical Engineering Journal* **2012**, *179*, 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2011.10.068>.

- (11) *Flumequine* / 42835-25-6.
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1264632.htm
(accessed 2023-06-13).
- (12) Hermo, M. P.; Nemutlu, E.; Kir, S.; Barrón, D.; Barbosa, J. Improved Determination of Quinolones in Milk at Their MRL Levels Using LC-UV, LC-FD, LC-MS and LC-MS/MS and Validation in Line with Regulation 2002/657/EC. *Anal Chim Acta* **2008**, *613* (1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.045>.
- (13) *Análisis de cromatografía de líquidos C8 Columnas de HPLC de pH bajo - Hawach.* <https://es.hawach.com/hplc-columns/c8-low-ph-hplc-columns.html>
(accessed 2023-06-11).
- (14) Soldevila Serrano, S.; Boscá Mayans, F.; Ángel Miranda Alonso, M. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESTUDIO DE LA FOTOREACTIVIDAD DE LAS FLUOROQUINOLONAS CON SUS BIOMOLÉCULAS DIANA TESIS DOCTORAL Presentada Por.
- (15) *Reversed-Phase SPE Methodology.*
<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/solid-phase-extraction/reversedphase-methodology> (accessed 2023-06-11).
- (16) *Extracción en Fase Sólida EFS-SPE.* http://www.cromlab.es/efs_principal.htm
(accessed 2023-06-15).
- (17) Desarrollo de Métodos de Determinación e Identificación de Antibióticos y Sus Metabolitos En Alimentos de Origen Animal Por LC-MS y LC-MS_MS.
- (18) Rossi, R.; Saluti, G.; Moretti, S.; Diamanti, I.; Giusepponi, D.; Galarini, R. Multiclass Methods for the Analysis of Antibiotic Residues in Milk by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: A Review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. Taylor and Francis Ltd. February 1, 2018, pp 241–257. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1393107>.
- (19) CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.
- (20) *Composición fisico-química - Unidad de Innovación.*
<https://www.um.es/web/innovacion/plataformas/ocw/listado-de-cursos/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas/composicion-fisico-quimica> (accessed 2023-06-12).

ANNEXOS

6.1 ANNEX I. DADES REFERENTS ALS REACTIUS I PATRONS UTILITZATS

Taula 23. Dades referents als reactius i patrons utilitzats en tot el procediment

	PROVEÏDOR	TOXICITAT	ALTRES
<i>Metanol (MeOH)</i>	Carlo Erba	Inflamable Tòxic Pot causar problemes de salut	-
<i>Àcid fòrmic (HCOOH)</i>	Sigma Aldrich	Inflamable Tòxic Corrosiu	Puresa del 98 %
<i>Àcid acètic (CH₃COOH)</i>	Sigma Aldrich	Inflamable Corrosiu	Densitat: 1.0490 g/mL Puresa: 99.5%
<i>Aigua ultrapura (H₂O)</i>	Milli-Q		L'aigua s'obté d'un sistema de generació Millipore
<i>Norfloxacina (NOR)</i>	Sigma Chemical	-	-
<i>Ciprofloxacina (CIPRO)</i>	Sigma Chemical	-	-
<i>Enrofloxacina (ENRO)</i>	Sigma Chemical	-	-
<i>Flumequina (FLUME)</i>	Sigma Chemical	-	-

