

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



**ESTUDIO COMPARATIVO Y EVALUACIÓN DE
DIFERENTES TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS EN EL
ANÁLISIS DE RESIDUOS DE CORTICOSTEROIDES EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Olga Huetos Hidalgo

Bajo la dirección de los doctores
Manuel Ignacio de San Andrés Larrea
José Juan Sánchez Sáez

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2682-8



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DPTO. DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
CATEDRA DE FARMACOLOGIA

AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD
ALIMENTARIA
CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACION

**ESTUDIO COMPARATIVO Y EVALUACION DE
DIFERENTES TECNICAS CROMATOGRAFICAS
EN EL ANALISIS DE RESIDUOS DE
CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS
BIOLOGICAS.**

OLGA HUETOS HIDALGO

Madrid, 2004.

Trabajo que presenta la Licenciada en Veterinaria
Dña. Olga Huetos Hidalgo
para aspirar al título de Doctor.

Fdo.: Olga Huetos Hidalgo

Madrid, Mayo de 2004

D. Manuel Ignacio de San Andrés Larrea, Profesor Titular de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y

D. José Juan Sánchez Sáez, Subdirector del Centro Nacional de Alimentación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria

CERTIFICAN

Que la memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. Olga Huetos Hidalgo, con el título "***Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas***", ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios de

Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Departamento de Residuos Zoonosológicos del Centro Nacional de Alimentación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Majadahonda.

Madrid, Mayo de 2004

Fdo.: José Juan Sánchez

Fdo.: Manuel San Andrés

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ACTH	Hormona adenocorticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AESA	Agencia Española de Seguridad Alimentaria
AMPc	Adenosín monofosfato
Anon.	Anónimo
ARNm	Acido ribonucleico
BCL	Beclometasona
BET	Betametasona
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
C(n)	Carbono (número de carbono)
CEE	Comunidad Económica Europea
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CRF	Hormona corticotropa
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector Diodo-Array
DEX	Dexametasona
dl.	Decilitro
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FLU	Flumetasona
g.	Gramo
GC	Glucocorticoides

GC-MS	Cromatografía de gases con detector de masas
GC-ECD	Cromatografía de gases con detector de captura de electrones
GC-EI	Cromatografía de gases con detector de masas e impacto electrónico
GC-MS-NCI	Cromatografía de gases con detector de masas e ionización química negativa
H ₂ O	Agua
HP	Hewlett Packard
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPTLC	Cromatografía en Capa Fina de Alto Rendimiento
IS	Standard Interno o Patrón Interno
kg.	Kilogramo
l	litro
LC-MS	Cromatografía Líquida con Detector de Masas
LLE	Extracción Líquido-Líquido con disolventes
LMR	Límite Máximo de Residuos
m	Milímetro
M	Molar
m/z	Masa/Carga
MC	Mineralocorticoides
MeOH	Metanol
Mg	Miligramo
min.	Minuto
ml.	Mililitro

mm	Milimetro
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTP	Metilprednisolona
N	Normal
n	Nanómetro
NaOH	Hidróxido Sódico
NCI	Ionización Química Negativa
ng.	Nanogramo
NH ₂	Amino
nm.	Nanómetro
°C	Grado Centígrado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFBO	Pentafluorobencilhidroxilamida
PNIR	Plan Nacional de Investigación de Residuos
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PRD	Prednisolona
r ²	Coefficiente de Correlación
Rec.	Recuperación
Rf	Del inglés "Relate to from"
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación Standard
SPE	Extracción en Fase Sólida
T ^o	Temperatura

THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsililderivados
Tr.	Tiempo de Retención
TRI	Triamcinolona
Trr.	Tiempo de Retención relativo
UE	Unión Europea
UNE	Una Norma Europea
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
\bar{X}	Media
μ .	Micra
μ l.	Microlitro
μ m.	Micrómetro
λ	Longitud de onda

TITULO	
INDICE	PAGINA
INTRODUCCION: DEFINICIONES	1
I.- OBJETIVOS O JUSTIFICACION	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:	
II.- ASPECTOS GENERALES DE LOS CORTICOSTEROIDES	17
II.1.- INTRODUCCIÓN	19
II.2.- HISTORIA DE LOS CORTICOSTEROIDES	20
II.3.- ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS	23
3.1.- ESTRUCTURA DE LOS CORTICOSTEROIDES NATURALES.....	23
3.2.- BIOSÍNTESIS DE LOS CORTICOSTEROIDES NATURALES.....	24
3.3.- GLUCOCORTICOIDES SINTETICOS	27
3.4.- RELACIÓN ESTRUCTURA Y ACCIÓN FARMACOLÓGICA.....	28
II.4.- FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA	31
4.A.- FARMACOCINÉTICA	31
4.A.1.- FASE DE ABSORCIÓN.....	31
4.A.2.- FASE DE DISTRIBUCIÓN.....	33
4.A.3.- FASE DE METABOLISMO.....	36
4.A.4.- FASE DE ELIMINACIÓN.....	40
4.B.- FARMACODINAMIA	42
4.B.1.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS CORTICOSTEROIDES SOBRE LOS	

RECEPTORES HORMONALES.....	42
4.B.2.- EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	46
4.B.2.1.- EFECTOS METABÓLICOS.....	46
4.B.2.2.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	49
4.B.2.3.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA GASTROINTESTINAL.....	49
4.B.2.4.- EFECTOS SOBRE LA SANGRE Y ÓRGANOS HEMATOPOYÉTICOS.....	49
4.B.2.5.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA ÓSEO Y PIEL.....	50
4.B.2.6.- ACCIÓN INMUNOLÓGICA.....	51
4.B.2.7.- EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS.....	52
4.B.2.8.- ACCIÓN ENDOCRINA.....	53
4.B.2.9.- EFECTOS NEUROLÓGICOS.....	54
III. - EMPLEO Y RIESGO DEL USO DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	57
III.1. - UTILIZACIÓN DE LOS CORTICOSTEROIDES COMO AGENTES TERAPÉUTICOS.....	59
III.2. - UTILIZACIÓN DE LOS CORTICOSTEROIDES COMO AGENTES DOPANTES.....	60
III.3. - ANÁLISIS DE RIESGOS DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL.....	61
3.1.- EVALUACION DEL RIESGO DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS.....	61

3.2.- GESTION DEL RIESGO DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS	
VETERINARIOS: MARCO LEGAL.....	63
3.2.1.- EVOLUCIÓN HISTÓRICA.....	64
3.2.2.- ESTABLECIMIENTO DE LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS.....	69
3.2.3.- REGULACIÓN DE LOS PLANES NACIONALES DE RESIDUOS.....	70
3.2.4.- SITUACIÓN EN OTROS PAÍSES.....	74
III.4. - CRITERIOS DE VALIDACIÓN PARA LOS MÉTODOS	
ANALÍTICOS.....	74
IV.- METODOS DE ANÁLISIS.....	77
IV.1. - PROTOCOLOS GENERALES PARA EL TRATAMIENTO	
DE MUESTRAS.....	79
IV.2. - METODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS	
GLUCOCORTICOIDES.....	81
2.1.- DECONJUGACIÓN.....	81
2.2.- EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (LLE).....	82
2.3.- EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA (SPE).....	84
2.3.1.- RELLENOS DE SPE.....	84
2.3.1.1.- Características químicas de los sorbentes.....	85
2.3.1.2.- Propiedades físicas de los sorbentes.....	87
2.3.1.3.- Pasos en el proceso de SPE.....	88
2.3.1.5.- Mecanismos de extracción.....	91
2.3.1.5.1.- Fase reversa.....	91
2.3.1.5.2.- Fase normal.....	93

2.3.1.5.3.- Intercambio de iones.....	95
2.3.1.5.4.- Fase mixta.....	96
2.3.1.6.- Elección del mecanismo de extracción.....	96
2.3.1.7.- Ventajas de la extracción en fase sólida (SPE) frente a la extracción líquido/líquido (LLE).....	98
IV.3.- METODOS DE DETECCIÓN.....	99
3.A- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCION: HPTLC.....	100
3.A.1.- INTRODUCCION.....	100
3.A.2.- DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE HPTLC.....	102
3.A.2.1.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y APLICACIÓN DE LA MISMA.....	102
3.A.2.2.- DESARROLLO DE LA PLACA.....	103
3.A.2.3.- DETECCION.....	104
3.A.2.4.- IDENTIFICACION.....	106
3.A.3.- CRITERIOS DE VALIDACIÓN.....	107
3.B.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA; HPLC.....	107
3.B.1.- INTRODUCCIÓN.....	107
3.B.2.- CLASIFICACION DE LOS PROCESOS CROMATOGRAFICOS EN HPLC.....	107
3.B.2.1.- PROCESOS DE FASE NORMAL.....	108
3.B.2.2.-PROCESOS DE FASE REVERSA.....	108

3.B.2.3.- PROCESOS DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	109
3.B.2.4.- PROCESOS DE PAR IÓNICO.....	109
3.B.3. - COMPONENTES DE UN EQUIPO DE HPLC.....	110
3.B.4. - DESARROLLO DE UNA TECNICA DE HPLC PARA LA DETECCION DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	111
3.C. - GC-MS.....	112
3.C.1. - INTRODUCCION.....	112
3.C.2. - CROMATOGRAFIA DE GASES.....	113
3.C.3. - INSTRUMENTACION.....	113
3.C.4. - GC-MS.....	115
3.C.4.1.- PROCESOS DE DERIVATIZACION.....	118
3.C.5. - APLICACION AL ANALISIS DE RESIDUOS DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	120
MATERIAL Y MÉTODOS.....	123
V. - MATERIAL.....	125
V.1. - REACTIVOS.....	125
V.2. - APARATOS Y EQUIPOS.....	128
2.1.- APARATOS.....	128
2.2.- EQUIPOS.....	129
2.3.- MATERIAL.....	129
V.3. - PATRONES Y MATERIAL DE REFERENCIA.....	130
3.1.- PATRONES.....	130

3.2.- SOLUCIONES PATRON.....	131
VI.- MÉTODOS.....	134
VI.1.- PROTOCOLOS PARA EL TRATAMIENTO DE DISTINTAS MATRICES PARA LA EXTRACCION DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	135
1.1.- DECONJUGACION DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	135
1.1.1.- ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PH, TEMPERATURA Y TIEMPO DE DECONJUGACIÓN.....	136
1.1.1.1.- pH.....	136
1.1.1.2.- Temperatura.....	136
1.1.1.3.- Tiempo.....	137
1.1.2.- INCUBACIÓN CON SUBTILISINA.....	137
1.2.- EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES.....	137
1.3.- EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA (SPE).....	139
1.3.1.- ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS SÍLICA PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	139
1.3.2.- ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS C18 PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	140
1.3.3.- ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS OASIS PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	143
1.3.4.- ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS BOND ELUT CERTITY® PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	144
VI.2.- PROTOCOLOS PARA LOS DISTINTOS METODOS DE DETECCIÓN DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	147

2.1.- HPTLC.....	147
2.1.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	147
2.1.1.1.- Cocktails.....	147
2.1.1.2.- Sitios de inyección.....	147
2.1.2.- APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	148
2.1.3.- DESARROLLO DE LA PLACA.....	148
2.1.4.- DETECCIÓN DE LOS CORTICOSTEROIDES POR HPLTC	150
2.1.5.- ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO.....	151
2.1.6.- APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HPTLC EN PIENSOS.....	152
2.2.- HPLC.....	154
2.2.1.- COLUMNAS SYMMETRY C ₁₈	155
2.2.2.- COLUMNAS SYMMETRY SHIELD C ₈	156
2.2.3.- COLUMNAS NOVAPAK C ₁₈	156
2.2.4.- COLUMNAS PHENOMENEX SYNERGI MAX.....	157
2.2.5.- COLUMNAS DIOL.....	157
2.2.6.- DETERMINACIÓN DE DEXAMETASONA EN PIENSOS POR HPLC.....	157
2.3.- GC-MS.....	158
2.3.1.- DETECCION DE CORTICOSTEROIDES EN ORINA, HIGADO, RIÑON Y PIENSOS POR GC-MS.....	167
VII. - RESULTADOS.....	169
VII.1. - RESULTADOS EN LA DECONJUGACION DE LOS	

CORTICOSTEROIDES	171
1.1.- RESULTADO DEL ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PH, TEMPERATURA Y TIEMPO DE DECONJUGACIÓN.....	171
1.1.1.- pH.....	171
1.1.2.- TEMPERATURA.....	172
1.1.3.- TIEMPO.....	172
VII.2. - RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES	175
VII.3. - RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA	178
3.1.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS SÍLICA PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	178
3.2.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS C18 PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	179
3.3.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS OASIS PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	179
3.4.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS BOND ELUT CERTITY ® PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES.....	183
VII.4. - RESULTADOS DE LA DETECCIÓN POR HPTLC	187
4.1.- RESULTADOS DE ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE HPTLC PARA LOS CORTICOSTEROIDES.....	190
4.2.-RESULTADOS DEL USO DE LA TECNICA DE HPTLC EN EL ANALISIS DE PIENSOS.....	191
4.3.- ESTUDIO DE LA APLICABILIDAD DEL METODO EN MUESTRAS REALES.....	192

VII.5. - RESULTADOS DE LA DETECCIÓN POR HPLC.....	194
5.1.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS SYMMETRY C ₁₈ EN UN SISTEMA HPLC.....	194
5.2.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS SYMMETRY SHIELD C ₈ EN UN SISTEMA HPLC.....	201
5.3.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS NOVAPAK C ₁₈ EN UN SISTEMA HPLC.....	202
5.4.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS PHENOMENEX SYNERGI MAX EN UN SISTEMA HPLC.....	205
5.5.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS DIOL EN UN SISTEMA HPLC.....	207
5.6.- RESULTADOS EN LA DETERMINACIÓN DE DEXAMETASONA EN PIENSOS POR HPLC.....	209
VII.6. -RESULTADOS DE LA DETECCION POR GC-MS.....	209
6.1.- RESULTADOS EN LA DETECCION DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS DE ORINA POR GC-MS.....	213
6.2.- RESULTADOS EN LA DETECCION DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS DE HIGADO, RIÑÓN Y PIENSOS POR GC-MS.....	218
6.3.- APLICABILIDAD DEL METODO DE DETECCION POR GC-MS EN MUESTRAS DE ORINA.....	223
VIII. - DISCUSIÓN.....	227
VIII.1. - DECONJUGACION DE LOS CORTICOSTEROIDES.....	227
VIII.2. - EXTRACCION CON DISOLENTES.....	229
VIII.3. - EXTRACCION POR FASE SOLIDA (SPE).....	230

VIII.4.- DETECCION POR HPTLC.....	234
VIII.5.- DETECCION POR HPLC.....	237
VIII.6.- DETECCION POR GC-MS.....	243
IX.- CONCLUSIONES.....	249
X.- RESUMEN.....	255
XI.- BIBLIOGRAFÍA.....	259
XII.- ANEXOS.....	292

TERMINOLOGIA Y DEFINICIONES

Antes de comenzar con el estudio realizado, se ha estimado conveniente, definir algunos términos y conceptos utilizados habitualmente en el campo del análisis de los alimentos.

Para los fines del Codex Alimentarius se entiende por;

ALIMENTO: Toda sustancia elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos, pero no incluye los cosméticos, el tabaco ni las sustancias utilizadas solamente como medicamentos.

ANIMAL: El Plan Nacional de Investigación de Residuos (Anon. 1998a) lo define como todo animal de las especies contempladas en la Dir.90/425/CEE.

CARNE: El Código Alimentario Español (Anon., 1991) define la carne como la parte comestible de los músculos de los animales destinados al consumo humano (mamíferos o aves) y otras porciones de piel, hueso, nervios, tendones y vasos que la acompañan normalmente. Distingue así el tejido muscular de los llamados despojos que incluyen riñones, hígado y otros órganos y tejidos. Por su parte, el volumen 3 del Codex Alimentarius, dedicado a los residuos de medicamentos veterinarios, define la carne como la parte comestible de cualquier mamífero (Codex 1996).

CONTAMINANTE: Cualquier sustancia no añadida intencionadamente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en la agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de

contaminación ambiental. Este término no abarca fragmentos de insectos, pelos de roedores y otras materias extrañas.

MEDICAMENTO VETERINARIO: Según el Codex Alimentario es cualquier sustancia aplicada o administrada a cualquier animal destinada a la producción de alimentos, como los que producen carne o leche, las aves de corral, peces o abejas, tanto con fines terapéuticos como profilácticos o de diagnóstico, o para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento.

RESIDUO: La Directiva 96/23/CEE (Anon. 1996a) lo define como el residuo de sustancias de acción farmacológica, de sus productos de transformación y de otras sustancias que se transmitan a los productos animales y puedan resultar nocivos para la salud humana. El Codex Alimentarius define los RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS como los productos originales y sus metabolitos en cualquier porción comestible del producto animal, así como los residuos de impurezas relacionadas con el medicamento veterinario correspondiente (Codex 1989).

SUSTANCIAS O PRODUCTOS NO AUTORIZADOS: El Plan Nacional de Investigación de Residuos (Anon. 1998a) lo define como las sustancias o productos cuya administración a un animal esté prohibida por la normativa comunitaria.

TRATAMIENTO ILEGAL: Según la Directiva 96/22/CEE se define como la utilización de sustancias o productos no autorizados o la utilización de sustancias o productos autorizados por la normativa comunitaria para fines o en condiciones distintas de las establecidas por la normativa comunitaria por las legislaciones nacionales.

MUESTRA OFICIAL: El Plan Nacional de Investigación de Residuos (Anon. 1998a) lo define como una muestra tomada por la actividad competente y que lleve, para el examen de los residuos o de las sustancias incluidas en el Anexo I, la

indicación de la especie, la naturaleza, la cantidad y el método de muestreo, así como la indicación del sexo del animal y del origen o del producto del animal.

LABORATORIO AUTORIZADO: Un laboratorio autorizado por la autoridad competente de un Estado miembro para proceder al examen de una muestra oficial con el fin de detectar la presencia de residuos.

LIMITE MÁXIMO CODEX PARA RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS (LMRMV): Es la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o µg/kg del peso del producto fresco) que la Comisión del Codex Alimentarius recomienda como legalmente permisible o reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo.

Se establece atendiendo a la clase y cantidad de residuos que se consideran carentes de peligro toxicológico para la salud humana, expresados en una ingestión diaria admisible (IDA).

Para establecer un LMR, también se presta consideración a los residuos presentes en los alimentos de origen vegetal y/o en el medio ambiente. Además, el LMR puede reducirse para ajustarse a las buenas prácticas en el uso de medicamentos veterinarios (uso oficialmente recomendado o autorizado), en la medida en que se disponga de métodos analíticos prácticos.

La Decisión de la Comisión de 14 de Abril de 1993 (Anón. 1993a) define los siguientes conceptos:

METODOS DE ANALISIS DE RUTINA: Métodos de análisis utilizados por los estados miembros para poner en práctica los planes nacionales de control de residuos en los animales de abasto y sus productos de conformidad con la Directiva 86/469/CEE del Consejo (DO. nº L 275 del 26.9.1986, p.36). Los métodos de rutina,

que deberán haber sido validados por laboratorios autorizados, podrán utilizarse tanto para fines de selección como de confirmación.

METODO CRIBA: Métodos empleados para detectar la presencia de una sustancia analizada o grupo de sustancias analizadas al nivel de interés. Estos métodos se caracterizan por su capacidad de analizar un elevado número de muestras en poco tiempo con el fin de detectar posibles positivos. Con ello se trata de evitar falsos resultados negativos.

METODO DE CONFIRMACION: Métodos empleados que proporcionan una información total o complementaria que permite la identificación inequívoca de la sustancia analizada al nivel de interés. Estos métodos tienen por objeto tanto evitar la obtención de resultados positivos falsos como lograr que la probabilidad de obtener resultados negativos erróneos sea baja.

SUSTANCIA ANALIZADA: Componente de una muestra de análisis que se debe detectar, identificar o cuantificar. Este término incluye los derivados que se formen a partir de la sustancia analizada durante el análisis.

MUESTRA DE LABORATORIO: Muestra preparada para su envío al laboratorio y destinada a inspección o prueba.

PATRON: Sustancia bien definida con un contenido en sustancia analizada determinado, de la mayor pureza posible, que se utilizará como referencia durante el análisis.

DETERMINACIONES EN BLANCO: Procedimiento analítico completo aplicado a una fracción problema procedente de una muestra que no contiene sustancia analizada.

LIMITE DE DETECCION: El menor contenido a partir del cual resulta posible deducir la presencia de la sustancia analizada con una seguridad estadística razonable.

LIMITE DE DETERMINACION: Contenido más pequeño de sustancia analizada respecto al cual el método ha sido validado con una exactitud y precisión determinadas.

SENSIBILIDAD: Medida de la capacidad de un método para detectar pequeñas diferencias en cuanto al contenido de sustancia analizada. Es la pendiente de la curva de calibración al nivel de interés.

Todas estas definiciones se han actualizado en la Decisión de la Comisión de 12 de Agosto de 2002 (Anón. 2002), y se han incorporado las siguientes, pero este documento aún no ha sido aprobado:

ANALITO O SUSTANCIA: Sustancia que debe ser detectada, identificada y/o cuantificada y los derivados de la misma que se formen durante el análisis. Materia de constitución química particular o confirmada y sus metabolitos.

CAPACIDAD DE DETECCIÓN ($CC\beta$): Contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error de β . En caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de $1-\beta$. En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de $1-\beta$.

LIMITE DE DECISIÓN ($CC\alpha$): Límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme.

LIMITE PERMITIDO: Límite máximo de residuo, nivel máximo u otra tolerancia máxima de sustancias establecidos en otro ámbito de la legislación comunitaria.

MATERIAL DE MUESTRA ENRIQUECIDO: Muestra enriquecida con una cantidad conocida del analito que debe detectarse.

PATRON INTERNO (IS): Sustancia no contenida en la muestra, de propiedades fisicoquímicas lo más próximas posibles a las del analito que ha de identificarse, que se añade a cada muestra y patrón de calibración.

VALIDACIÓN: Confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto.

Otros conceptos de interés:

CALIBRACION: Conjunto de operaciones que determinan, bajo unas condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por el instrumento o sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN O DE REPARTO: Es la relación de las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles.

CROMATOGRAMA: Es la representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo o del volumen del gas/líquido portador. En cromatografía de gases también se denomina TIC (Total Ion Current).

ESPECIFICIDAD: Es la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.

EXACTITUD: Es el parámetro que expresa el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. Se obtiene determinando la veracidad y la precisión.

LINEA BASE: Es la porción del cromatograma que se registra cuando por la columna únicamente está pasando el gas/líquido portador sin ningún componente. Teóricamente esta señal debería ser constante a lo largo del tiempo pero se altera o puede alterarse debido a fallos de la estabilidad del mismo.

LINEALIDAD: Es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener, dentro de un intervalo determinado, resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

PICO CROMATOGRÁFICO: Es la variación de la línea de base que registra el detector mientras un sólo componente sale de la columna. Si la separación de una mezcla es incompleta, dos o más componentes pueden aparecer como un sólo pico o solapados.

PRECISION: Es el parámetro que expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación standard de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación, menor es la precisión.

R_f (relate to from): Es el cociente entre la distancia entre el punto de partida y la mancha de la sustancia y la distancia entre el punto de partida y el frente del eluyente.

ROBUSTED: Susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las

condiciones ambientales o de preparación de la muestra en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores. Deberá incluirse cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica que puedan afectar a los resultados analíticos.

TIEMPO DE RETENCIÓN MUERTO: Es el tiempo de retención de un pico no retenido.

TIEMPO DE RETENCIÓN: Es el tiempo que pasa entre el momento de la inyección de la muestra y el máximo del pico.

VOLUMEN DE RETENCIÓN: Es el volumen de gas necesario para eluir un compuesto.

VOLUMEN MUERTO: Es el volumen de retención de una muestra no absorbida y a su vez es el volumen del gas portador requerido para transportar dicha muestra.

I.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y evaluación de métodos y técnicas analíticas que se puedan aplicar al control sanitario de residuos de corticosteroides en muestras biológicas.

En una primera fase, se desarrollan y se ponen a punto estos métodos y técnicas con un protocolo básico de trabajo, para lo cual se trabaja con patrones, para después, una vez determinadas las características de la técnica con patrones, éstas sean aplicadas a muestras biológicas reales para comprobar su funcionamiento en la práctica.

Para conseguir el objetivo principal mencionado, se establecen los siguientes objetivos concretos:

.- Evaluación del método de deconjugación de los corticosteroides más adecuado, tanto en lo referente a la temperatura como al tiempo, pH, enzimas, etc.

.- Estudio de distintos disolventes que puedan ser utilizados para la extracción de los corticosteroides de las muestras biológicas.

.- Estudio de diferentes cartuchos de extracción en fase sólida y diferentes condiciones de limpieza y purificación de la muestra.

.- Estudio de la influencia del tipo de columna cromatográfica con variaciones en el pH, temperatura, composición de la fase móvil, etc, evaluando los tiempos de retención en función del tiempo de la dexametasona, para una buena separación de los corticosteroides en un sistema isocrático.

.- Evaluación de una técnica de HPTLC como técnica criba para la determinación de los corticosteroides en productos para la alimentación del ganado, aditivos, piensos, sitios de inyección, implantes, productos zoonosanitarios, "cocktails" de medicamentos veterinarios, etc.

.- Evaluación de una técnica de HPLC para la detección de corticosteroides.

.- Evaluación de una técnica de GC-MS para la confirmación de la presencia de corticosteroides en las muestras biológicas.

La problemática de la investigación de residuos en animales, canales y despojos es uno de los temas más complejos que la administración sanitaria debe afrontar para asegurar la protección de la salud pública, pero también presenta connotaciones económicas que afectan principalmente a los productores, transformadores y comerciantes de canales y carnes.

En estos últimos años, se ha visto, que el uso de hormonas esteroideas, y en especial los glucocorticoides (dexametasona, betametasona, prednisolona, metilprednisolona, flumetasona, triamcinolona y beclometasona), o incluso la combinación con otros fármacos, ha sufrido un aumento en detrimento de otras sustancias utilizadas hasta el momento, como por ejemplo los β -agonistas, como promotores de crecimiento en el ganado.

Existen una serie de variaciones anatomopatológicas en las canales (glándula suprarrenal atrofiada, petequias en la superficie de la carne, etc) que pueden indicarnos que este tipo de sustancias han sido utilizadas en esos animales, pero ésto no es suficiente para confirmar la presencia de tales sustancias. Por ello, es necesario elaborar un buen método de detección utilizando una o varias técnicas instrumentales sensibles que consigan alcanzar los límites de detección exigidos, para la detección de estas sustancias prohibidas para tal uso.

Para elaborar un buen método, se debe conocer el carácter cromatográfico de estos compuestos, para poder ser analizados en muestras de orina, hígado, riñón, pienso, etc.

Algunos autores describen métodos desarrollados en sus laboratorios para la detección de los corticosteroides por distintas técnicas (GC-MS-MS, LC-MS, LC-MS-

MS), pero, desafortunadamente, algunas de estas técnicas instrumentales no están disponibles en muchos laboratorios de rutina. Por ello, se tendrán que ofrecer nuevos y rápidos métodos de extracción y purificación, así como otro tipo de técnicas, que permitan la detección de los corticosteroides en la mayoría de los laboratorios, y ese es el objetivo de este trabajo.

II.- ASPECTOS GENERALES DE LOS CORTICOSTEROIDES

II.1.- INTRODUCCIÓN

La determinación de los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal se ha convertido en un tema de creciente atención en los últimos años, tanto para las autoridades y profesionales sanitarios como para los consumidores, cuya preocupación común se dirige hacia una mayor calidad y seguridad alimentaria.

La problemática de la investigación de residuos en animales, canales y despojos, es uno de los temas más complejos que la administración sanitaria debe afrontar para asegurar la protección de la salud de los consumidores. En primer lugar es un problema de salud pública pero también presenta connotaciones económicas que afectan principalmente a los productores, transformadores y comerciantes de canales y carnes. (Fabregas., 1995).

Diversas razones comerciales apoyan el uso de sustancias no autorizadas como promotores de crecimiento en la producción animal. El problema de la existencia de residuos de medicamentos en los alimentos cobró gran importancia a raíz de las intoxicaciones que se produjeron en los años 90 por β -agonistas, y así, los consumidores, se han ido concienciando seriamente sobre los temas de salubridad-seguridad de los productos alimentarios.

Por lo dicho anteriormente y por la adhesión de nuestro país a la EU, se debe llevar a cabo un control de residuos en los alimentos y este control de residuos no se puede separar del marco comunitario y por lo tanto diferir en sus aspectos esenciales de los otros países miembros de la EU. (Martín. J, 1997)

II.2.- HISTORIA DE LOS CORTICOSTEROIDES

Desde el descubrimiento de la estructura del colesterol, precursor de todos los esteroides, hasta la aplicación del primer esteroide, en 1952, de forma eficaz en terapéutica, pasaron unos 20 años.

Chevreul, un joven químico de la Francia napoleónica, descubrió "grasas no saponificables" y en 1812 fue detectada una de estas grasas de los cálculos biliares. Esta grasa fue denominada colesterol. Cien años después, Adolf Windaus puso en evidencia la importancia biológica de los esteroides, ignorada previamente por los químicos. Tras 20 años, Windaus descubrió la fórmula estructural del colesterol, antes de que su trabajo acerca de la vitamina D le llevara a la obtención del premio Nobel (Gimenez Arnau., 1997).

No se puede hablar de los corticosteroides sin hacer referencia al descubrimiento del papel fisiológico de las hormonas suprarrenales. Las glándulas suprarrenales fueron descubiertas en el Renacimiento, pero el papel fisiológico de las hormonas suprarrenales no fue descubierto hasta 1849 cuando Thomas Addison (1795-1860) relacionó la patología de las glándulas suprarrenales con la piel bronceada y fue el primero en demostrar las consecuencias fisiopatológicas de una insuficiencia de hormonas suprarrenales, describiendo una enfermedad que hoy lleva su nombre, el síndrome de Addison (falta de acción de las hormonas de la corteza suprarrenal). Esta relación fue confirmada en 1856 por el francés Charles-Edouard Brown Séquard (1817-1894) al describir la muerte acarreada por una adrenalectomía.

En 1930 ya se aceptaba generalmente que la corteza y no la médula es la parte de la glándula que mantiene la vida. Pronto la literatura estuvo llena de descripciones de numerosas anomalías fisiológicas como consecuencia de una insuficiencia adrenocortical. Así, se demostró que la pérdida renal de sodio era consecuencia de

este tipo de insuficiencia (Harrot et al, 1933), que una depleción de reservas de hidratos de carbono podía corregirse con extractos adrenocorticales (Britton et al, 1931), que la glucosa y el glucógeno formados bajo la influencia de la corteza suprarrenal durante el ayuno parecieron derivar de la proteína tisular (Long et al, 1940). De estos estudios surgió el concepto de dos tipos de hormonas adrenocorticales; una actuando sobre la regulación de la homeostasia de electrolitos, denominada como *mineralocorticoides*, y otra con acción a nivel del metabolismo de los hidratos de carbono, denominada como *glucocorticoides*.

En 1932, el neurocirujano Cushing descubrió el síndrome de hipercorticismismo, debido a una hipersecreción de ACTH, cuyo síndrome lleva su nombre (Cushing, 1932).

En 1933 se observó que extractos de la hipófisis anterior estimulaba las suprarrenales. La existencia de extractos de tejido biológicamente activos representó un desafío para los químicos orgánicos. Taddeus Reichstein (1897-1996), profesor de la Facultad de Farmacia de Basilea, fue de los primeros en trabajar en esta materia, considerado como el especialista de las hormonas de las suprarrenales, y más tarde como el precursor de la química de los esteroides. A partir de unas 20000 glándulas de animales aisló más de 20 derivados hormonales biológicamente activos. En 1942 ya habían aislado, cristalizado y dilucidado la estructura de 28 tipos de esteroides de la corteza suprarrenal de los cuales sólo 5 demostraron tener actividad biológica - cortisol (o sustancia F), cortisona (E), corticosterona (B), 11-dehidrocorticosterona (A) y 11-desoxicorticosterona (C)-. A, B, C, E, y F es como se denominaron inicialmente estas sustancias en el momento de su descubrimiento. A él se debe la puesta en el mercado del primer corticosteroide de síntesis, la desoxicorticosterona.

Con estos antecedentes, los americanos Kendall (1886-1972) y Hench (1896-1965) anunciaron en 1949 los notables efectos de la cortisona y ACTH en enfermedades ajenas a la insuficiencia adrenocortical. Hench utilizó la cortisona en pacientes con artritis reumatoide y comprobó que experimentaban una remisión temporal espectacular. Posteriormente también se demostraron los efectos favorables de la ACTH (Hench et al. 1949). Se inició la producción de cortisona utilizando bilis como materia prima. Kendall, Hench y Reichstein recibieron, en 1950, el premio Nobel de medicina y fisiología por la hemisíntesis de la cortisona, que necesitaba entonces 36 etapas. Los trabajos de los dos célebres químicos Diles (1876-1954) y Alder (1902- 1958) permitieron la síntesis total en 1952.

Además del surgimiento de investigaciones clínicas, el éxito terapéutico de la cortisona estimuló una ola de investigaciones básicas en la década de los 50. El siguiente paso consistía en mejorar el efecto de los corticosteroides. Los esteroides mostraban poca actividad por vía oral y una actividad tópica muy limitada. El acetónido de triamcinolona fue el primer corticosteroide halogenado activo tópicamente. A finales de los 70 y en la década de los 80 se introdujeron corticosteroides de mayor potencia, por ejemplo el dipropionato de betametasona o el propionato de clobetasol.

Para el gran público, la familia de los corticosteroides se resume en el nombre de uno de sus representantes, la cortisona. Pero hoy en día, la familia de los corticosteroides cuenta con varias decenas de compuestos que han ido apareciendo en el mercado, sintetizados gracias al progreso de la química. La manipulación de la estructura de estas sustancias ha dado diversos análogos sintéticos, algunos de los cuales representan significativos progresos terapéuticos en términos de la relación entre potencia inflamatoria y efecto sobre el metabolismo de los electrolitos.

Después de más de medio siglo de estudio sobre su estructura, sus mecanismos de acción y sus vías de administración, se puede considerar como un útil terapéutico utilizado en prácticamente todas las disciplinas médicas. Sin embargo, no se han cumplido las grandes esperanzas de eliminar la toxicidad. Por esta razón es necesario poner muy claramente de relieve que los corticosteroides en dosis farmacológicas, son fármacos poderosos de efectos tóxicos lentamente acumulativos sobre muchos tejidos, que puede incluso pasar inadvertido hasta que "algo" los pone de manifiesto (Goodman et al. 1981).

II.3.- ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS

3.1.- ESTRUCTURA DE LOS CORTICOSTEROIDES NATURALES

Las hormonas esteroides tienen en común el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno con 17 átomos de carbono y 4 ciclos o anillos. Los corticosteroides poseen un núcleo pregnano con 21 átomos de carbono dispuestos en 4 anillos que deriva de la molécula del colesterol, que mediante una serie de reacciones químicas, como son la hidroxilación o la reducción, consiguen formar los distintos corticosteroides con distintas sustituciones en los diferentes carbonos que les confieren características diferentes. A la estructura precedente se le ha añadido dos grupos metilo en posición C10 y C13 y una cadena lateral etilo en C17.

Las hormonas corticosteroides se dividen en dos clases según sus principales efectos fisiológicos:

- *Mineralocorticoides*. Cuya acción es a nivel de los túbulos distales y de los canales colectores del riñón para incrementar la reabsorción de sodio, agua y aniones y aumentar la excreción urinaria de potasio y protones. Por tanto tiene un efecto sobre el equilibrio hidroelectrolítico.

- *Glucocorticoides*: Cuya acción principal se relaciona con el metabolismo glucídico, lipídico y proteico.

Esta manera de clasificarlos es más o menos arbitraria, ya que muchos corticosteroides tienen la propiedad de influir en el metabolismo de los hidratos de carbono y en el de los electrolitos, y en estos casos la clasificación se fundamenta en la actividad más importante que desarrollan. Por tanto, la selectividad entre gluco y mineralocorticoides no es sin embargo total. Numerosos glucocorticoides, y más particularmente compuestos naturales (como cortisol o cortisona,) poseen igualmente una actividad de tipo mineralocorticoide. De la misma manera, ciertos mineralocorticoides artificiales (como la fludrocortisona) poseen actividad glucocorticoide residual superior a ciertos glucocorticoides naturales.

Su conformación espacial es importante, el compuesto se denomina β -esteroide cuando el grupo hidroxilo del carbono 17 se proyecta por encima del plano del esteroide. Cuando este grupo hidroxilo se proyecta por debajo del plano de los anillos se denomina α -esteroide. La importancia de la conformación espacial se hace evidente en cuanto a las propiedades de cada compuesto.

Son los glucocorticoides los que poseen una acción como promotor de crecimiento, aunque existen algunos glucocorticoides que tienen también acción mineralocorticoide.

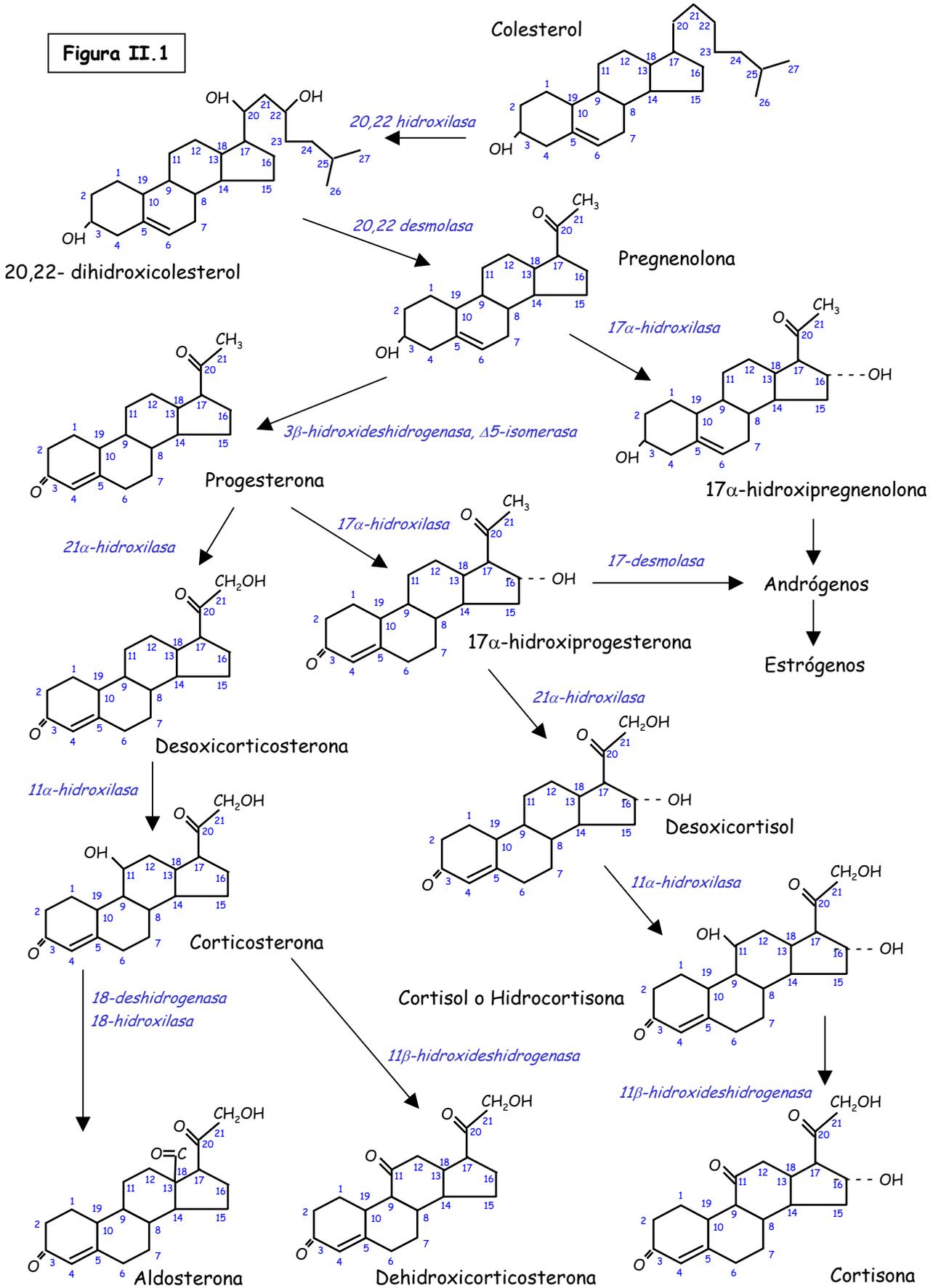
3.2.- BIOSÍNTESIS DE LOS CORTICOSTEROIDES NATURALES

La biosíntesis de las hormonas corticosteroides naturales tiene lugar en la región cortical de las glándulas suprarrenales. Este cortex presenta 3 zonas histológicamente y bioquímicamente distintas, en las que cada una está especializada en la síntesis y secreción de un tipo de hormona esteroide. Así, los glucocorticoides

se sintetizan en la zona fasciculada, mientras que los mineralocorticoides en la zona glomerular y los andrógenos en la zona reticular (Ishimura, 1998). Todos los corticosteroides derivan principalmente del colesterol que proviene del plasma. Inicialmente esterificado y almacenado en las gotículas citoplásmicas, el colesterol se libera por la acción de una esterasa y se transforma en la mitocondria por una desmolasa, reacción que conduce a un fragmento de 6 átomos de carbono (isocaproaldehído) y a la pregnenolona. Esta última es un esteroide de 21 átomos de carbono precursor de los tres tipos de esteroides (andrógenos, estrógenos y corticosteroides) gracias a la acción de varias enzimas del tipo hidroxideshidrogenasa, hidroxilasa, e isomerasa, que actúan a nivel del retículo endoplásmico liso (**Figura II.1**).

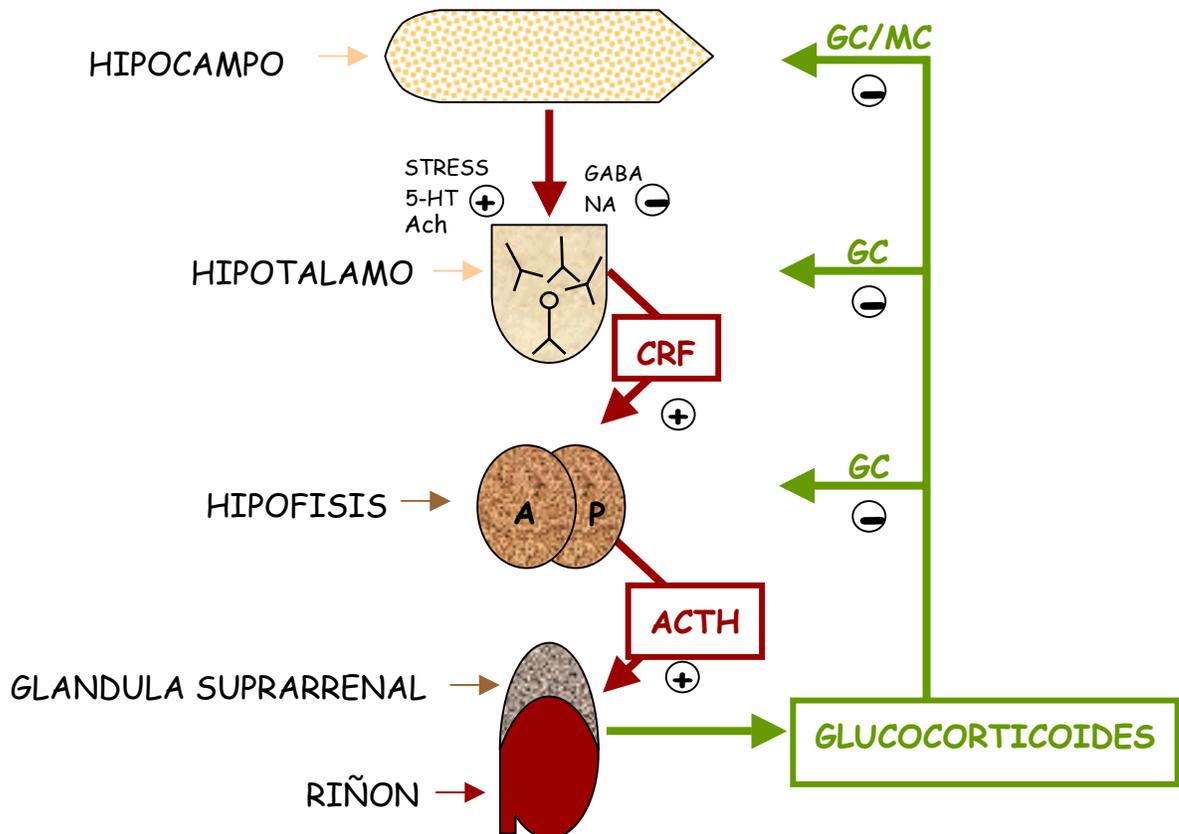
La regulación de la producción de hormonas corticosteroides se ejerce a la vez a nivel hipotalámico e hipofisario, ya que es principalmente bajo el control de la hormona hipofisaria adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez depende del factor hipotalámico de regulación de la hormona corticotropa (CRF). La ACTH actúa sobre un receptor específico de membrana acoplado a una proteína G originando la activación de la adenilciclase y causando un incremento de AMPc. intracelular, actuando éste como 2º mensajero que estimula la esteroidogénesis. Bajo la influencia de diferentes factores desencadenantes en particular el stress, la ACTH ejerce dos acciones sobre la suprarrenal, por una parte una acción rápida que da lugar a la liberación de hormonas en el plasma, por otra parte una acción diferida que se traduce en el crecimiento del tejido suprarrenal con síntesis proteica. Los corticosteroides libres plasmáticos ejercen un retrocontrol negativo de la secreción de CRF y por tanto de la ACTH (**Figura II.2**), así una administración exógena de corticosteroides da lugar a una disminución de la producción de los corticosteroides endógenos.

Figura II.1



La ACTH estimula principalmente la producción de glucocorticoides (el cortisol predomina en el hombre, cerdo y perro mientras que la cortisona predomina en rata, ratón y conejo), y sólo cuando los niveles de ACTH son elevados estimula la producción de mineralocorticoides, que son regulados fundamentalmente por la angiotensina II y por concentraciones de K^+ e/c.

Figura II.2



3.3.- GLUCOCORTICOIDES SINTETICOS

Ciertas modificaciones químicas en la estructura básica de los corticosteroides llevan a la síntesis de los corticosteroides artificiales. Las distintas modificaciones

aumentan o disminuyen la actividad glucocorticoide y mineralocorticoide, consiguiendo en algunos casos evitar los efectos indeseables, como la retención de agua y la hipopotasemia. Las principales modificaciones utilizadas para reforzar los efectos glucocorticoides consisten en la deshidrogenación en $\Delta^{1,2}$, y la hidroxilación o metilación en C16 y la halogenación en C6 y C9.

La halogenación con flúor o con cloro en 6α ó/y 9α refuerzan las propiedades glucocorticoides (en un factor 10), pero con un aumento neto de las propiedades mineralocorticoides (en un factor superior a 100). Por último, la sustitución en la posición 16 alarga la semivida plasmática y por tanto la duración de la acción de los glucocorticoides.

Por tanto, el término glucocorticoide se emplea para designar tanto a las hormonas naturales producidas por la suprarrenal con acción predominante sobre los metabolismos de los hidratos de carbono, lipídico y proteico, como a sus análogos sintéticos. Actualmente se prefiere utilizar el término antiinflamatorios corticoideos o esteroideos, en el que quedan englobados los glucocorticoides y los derivados sintéticos con acción antiinflamatoria.

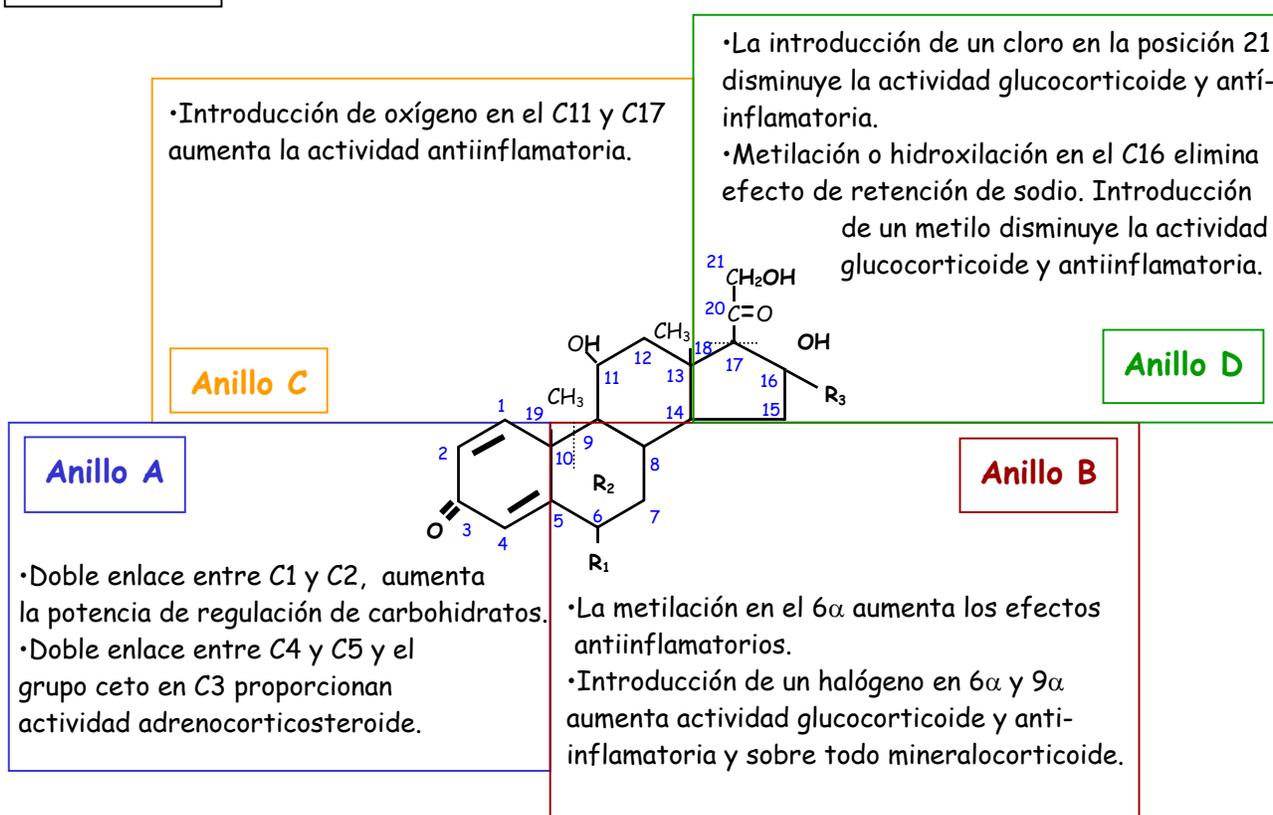
En el **Anexo I** aparecen las estructuras de los principales glucocorticoides así como sus características químicas.

3.4.- RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA Y ACTIVIDAD FARMACOLOGICA

La cortisona fue el primer corticosteroide usado por su efecto antiinflamatorio. Los cambios de estructura molecular pueden traer consigo cambios de potencia biológica como resultado de modificaciones farmacocinéticas (absorción, unión a proteínas, transformación metabólica y excreción) y modificaciones

farmacodinámicas (afinidad, capacidad para atravesar membranas y actividad intrínseca de la molécula en su sitio de acción). Por tanto, modificaciones de estructura pueden producir aumentos de la relación entre potencia antiinflamatoria y de retención de sodio, de tal modo que en muchos compuestos actuales los efectos electrolíticos no tienen consecuencias serias. (**Figura II.3**) (Goodman et al., 1982).

Figura II.3



Relación estructura-actividad de los adrenocorticoides: Las líneas y letras finas indican rasgos estructurales comunes a los compuestos que tienen acción antiinflamatoria. Las letras y líneas gruesas indican modificaciones que aumentan o suprimen las actividades características. (Goodman et al., 1982)

Modificaciones en el Anillo A: El doble enlace entre C4 y C5 y el grupo ceto en C3 son necesarias para la típica actividad adrenocorticoide. La introducción de

un doble enlace entre C1 y C2, como en la prednisona o en la prednisolona, aumenta la proporción entre potencia de regulación de carbohidratos y potencia de retención de sodio aumentando selectivamente la primera.

Modificaciones en el Anillo B: La sustitución en 6 α tiene efectos imprevisibles. La metilación en la posición 6 α aumenta los efectos antiinflamatorios, de pérdida de nitrógeno y de retención de sodio. La introducción de un halógeno, como el flúor o el cloro, en las posiciones 6 α y 9 α aumenta todas las actividades biológicas de los corticosteroides, aumenta la actividad glucocorticoide y antiinflamatoria (un factor 10) pero también y mucho más (un factor 100) la mineralocorticoide, aparentemente por su efecto supresor de electrones sobre el grupo 11- β -hidroxi. Cuando desaparece el flúor de la posición 6 y se reemplaza por cloro en la posición 21, disminuye la actividad glucocorticoide y antiinflamatoria.

Modificaciones en el Anillo C: La presencia de oxígeno en la posición 11 hace que el compuesto posea una acción preponderante sobre el metabolismo de las sustancias orgánicas y es indispensable para una actividad antiinflamatoria, lo que se refuerza al añadirse oxígeno en la posición 17, pero no es necesaria para que tenga una potencia elevada de retención de sodio.

Modificaciones en el Anillo D: La metilación o hidroxilación en el C16 elimina el efecto de retención de sodio pero sólo modifica ligeramente la potencia con respecto a los efectos sobre el metabolismo orgánico y la inflamación. La sustitución de un hidroxilo en posición 16 por un metilo disminuye la actividad glucocorticoide y antiinflamatoria. Por último, cualquier sustitución en la posición 16 alarga la semivida plasmática y por tanto la duración de la acción de los glucocorticoides.

Todos los esteroides antiinflamatorios usados actualmente en terapéutica veterinaria son compuestos 17- α -hidroxi. Todos los corticosteroides naturales y casi

todos sus análogos sintéticos activos tienen un grupo 21-hidroxi. Aunque algunas actividades glucogénicas y antiinflamatorias son posibles en su ausencia. Su presencia es necesaria para la actividad significativa de retención de sodio. La esterificación en el C21 aumenta la liposolubilidad del compuesto, si la cadena lateral del éster se alarga, su liposolubilidad aumenta cada vez más aún.

II.4. - FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

4.A. - FARMACOCINETICA

La farmacocinética estudia el tránsito de fármacos y medicamentos por el organismo. Este tránsito ocurre en diferentes fases o etapas secuenciales.

4.A.1.- FASE DE ABSORCIÓN

Se define como el paso del fármaco desde el lugar de administración al torrente circulatorio. Para que un fármaco actúe y ejerza efectos sistémicos se tiene que absorber y alcanzar una determinada concentración plasmática. Esta absorción está regulada por la vía de administración, forma medicamentosa en que se aplica, características físico-químicas del fármaco, etc.

La mayoría de los corticosteroides se presentan en las preparaciones terapéuticas de forma esterificada. Esto se debe a que la protección de los grupos hidroxilos de C21, C17 y en ocasiones C16 permite una liberación más lenta de la molécula libre biológicamente activa y por tanto un "efecto de retardo" (Antignac, 2001). Se pueden describir dos tipos de formas esterificadas según su carácter sea lipófilo o hidrófilo y este parámetro físico-químico influye en la absorción.

En general, la vía más común de administración es la vía oral, ya que los fármacos se suelen añadir al agua de bebida o al pienso tanto en algunos casos de uso

terapéutico como generalmente en los usos fraudulentos. La absorción se produce en todo el tracto digestivo pero principalmente en el intestino delgado gracias a una mucosa ricamente vascularizada con una gran superficie, lo que facilita los procesos de absorción a dicho nivel.

En los rumiantes, como los fármacos pueden permanecer en rumen hasta 72 horas antes de pasar al abomaso, ésto supone un retraso considerable de la absorción del fármaco.

En general, los corticosteroides se absorben bien y de forma rápida cuando se administran por vía oral.

Por vía inhalatoria la absorción se realiza a nivel alveolar pero son escasas las posibilidades de regular la dosis y existe la posibilidad de irritación de la mucosa del tracto respiratorio. Pero en general, esta vía no produce efectos secundarios sistémicos (Sorkness, 1998). Es muy adecuado en casos de asma o afecciones bronquiales.

La absorción de fármacos vía tópica es lenta. Se puede producir una retención transitoria del fármaco, más o menos larga, como ocurre con los glucocorticoides, en la zona de aplicación. Por lo tanto, la piel puede comportarse como un "reservorio" del fármaco. En general, los glucocorticoides liposolubles son bien absorbidos a través de la piel, de las mucosas mamarias, ya sea en su forma libre, ester o acetónido. En oftalmología se usan frecuentemente en los colirios.

Se recurre a la administración parenteral de un fármaco cuando se requieren niveles plasmáticos adecuados de manera mas rápida en el tiempo o cuando no se absorbe o lo hace en poca cantidad a través de la piel o de las mucosas o se inactiva en el tracto digestivo. Depende del éster utilizado. Los ésteres hidrosolubles son

rápidamente reabsorbidos mientras que los ésteres liposolubles, administrados únicamente por vía intramuscular, son reabsorbidos más lentamente.

El parénquima adiposo puede comportarse como un depósito primario para fármacos de alta liposolubilidad. A nivel del tejido muscular la velocidad de absorción es alta y nos permite la administración de fármacos irritantes que no se deben administrar por vía subcutánea.

4.A.2.- FASE DE DISTRIBUCION

Los fármacos se reparten por todo el organismo gracias a la circulación sanguínea y alcanzan los tejidos de cada órgano en una cantidad determinada. Los corticosteroides circulan por la sangre unidos a proteínas plasmáticas. Tanto los corticosteroides endógenos como los exógenos o sintéticos y probablemente otros análogos, se encuentran primero libres, pero pronto se unen a una proteína específica del plasma (α -globulina), llamada transcortina o CBG (Corticosteroid Binding Globulin). La unión es débil (sobre todo en los rumiantes) y reversible pero de gran afinidad, y su fuerza de unión es inversamente proporcional al número de grupos polares que tenga la molécula del esteroide.

La segunda fracción a la que se unen los glucocorticoides es a la albúmina plasmática, de forma no específica (cuando la transcortina está saturada) y con una baja afinidad. Normalmente, el 75% de los glucocorticoides del plasma se encuentran ligados a la transcortina, el 10-15% está unido a la albúmina, y el restante 10-15% está en forma libre.

Los glucocorticoides unidos a las proteínas no se metabolizan y son inactivos. Es la forma libre, la que entra en las células y manifiesta sus efectos, siendo la proporción ligada un futuro potencial de reserva. A medida que la forma libre es

metabolizada por las células sobre las que actúa o bien es conjugada en el hígado para su eliminación, se liberan moléculas de los glucocorticoides ligados a la transcortina para mantener el nivel necesario de la hormona libre en plasma.

El cortisol tiene una elevada afinidad por la CBG, la dexametasona una afinidad baja y la prednisolona ocupa una posición intermedia. De la misma manera, la triamcinolona es un corticoide más activo que el cortisol y por tanto presenta una capacidad de unión a las proteínas plasmáticas sensiblemente inferior que éste. En la **Tabla II.1** puede observarse la semivida plasmática (presencia en sangre) y biológica (permanencia de su efecto a nivel del eje hipotálamo-hipofisario y suprarrenal) de los principales glucocorticoides (tanto naturales como sintéticos). Cambios en la estructura de los corticosteroides pueden aumentar la rapidez de su efecto y disminuir la capacidad de unión a las proteínas plasmáticas porque se incrementa la velocidad de activación metabólica o la velocidad intrínseca de la molécula. Por regla general, los esteroides que poseen menor número de sustituciones en la molécula, como hidrocortisona, cortisona, prednisolona o metilprednisolona, parecen iniciar pronto sus efectos, pero éstos son de muy corta duración.

Se ha observado que la unión del cortisol a las proteínas permanece relativamente constante en un intervalo fisiológico pero cambia cuando son administrados corticosteroides exógenos. Sin embargo el grado de unión de corticosteroides exógenos a las proteínas depende de la concentración de cortisol. Al mismo tiempo, los corticosteroides exógenos suprimen la liberación de cortisol.

Los esteroides sintéticos poseen una vida plasmática mucho mayor que los naturales; sin embargo, los efectos de los corticosteroides sintéticos, continúan mucho tiempo después de que han sido excretados. Probablemente, la molécula alterada es menos atacada por los sistemas enzimáticos presentes en el organismo.

Tabla II.1

MOLECULA	SEMIVIDA PLASMATICA (Horas)	SEMIVIDA BIOLOGICA (Horas)
Corta duración en sangre CORTISOL	1.3-2	8-12
HIDROCORTISONA	0.5-1.5	
Duración intermedia en sangre PREDNISONA	1-3.5	
PREDNISOLONA	2-3.5	18-36
METILPREDNISOLONA	1.5-3	
TRIAMCINOLONA	4.5-5.5	
Larga duración en sangre DEXAMETASONA	2.5-4.5	
BETAMETASONA	2.5-4.5	36-54
FLUMETASONA	2.5-4.5	

La unión glucocorticoide-proteína es una unión fármaco-receptor (de tipo silente) y por tanto se acepta de forma general que las fuerzas de unión son las mismas; enlace iónico, fuerzas de Van der Waals y combinación con grupos sulfhidrilos, y las características de saturabilidad, afinidad etc. también, por ello las lipoproteínas o la presencia de compuestos que compitan por los lugares de unión de los glucocorticoides, como por ejemplo los β -agonistas, pueden producir alteraciones en el porcentaje de la fracción libre activa, por lo que la eficacia y toxicidad de una dosis dada puede aumentar considerablemente, e incluso producir toxicidad.

4.A.3.- FASE DE METABOLISMO

Los corticosteroides sufren cambios metabólicos en el organismo que están orientados principalmente hacia la formación de metabolitos que tienen propiedades físico-químicas favorables para su excreción. Sufren biotransformaciones que tienden a aumentar su polaridad y reducir el coeficiente de lipo-hidrosolubilidad convirtiéndolos en productos metabólicos más polares, lo cual favorecerá su excreción al impedirse de esta forma su reabsorción a nivel de los túbulos renales.

El catabolismo de las hormonas glucocorticoides se produce principalmente a nivel hepático, aunque un cierto número de reacciones se producen igualmente en ciertos tejidos tales como la placenta y los riñones. Estas reacciones afectan sólo a las hormonas libres, es decir, no ligadas a proteínas. Su finalidad es la inactivación y después la eliminación de las hormonas. En una primera etapa (*metabolismo de fase I*), la inactivación se asegura por la intervención de enzimas del tipo reductasa, hidrogenasa, hidroxilasa y epimerasa que conducen a la formación de metabolitos polares. En una segunda etapa (*metabolitos de fase II*), las reacciones de conjugación con los ácidos glucurónicos y en forma de sulfatos, confieren a las hormonas un

carácter muy hidrosoluble y las incapacita para formar uniones con las proteínas de transporte, facilitando así su eliminación.

Metabolismo de la fase I;

Corticosteroides naturales: En el hombre, la concentración plasmática media del cortisol varía entre 50 y 200 $\mu\text{g/l}$ (ppb), y la tasa de eliminación urinaria del cortisol libre es de 20-50 $\mu\text{g}/24$ h. En bóvidos la concentración plasmática media del cortisol se distribuye de la siguiente forma: en vacas 2 $\mu\text{g}/\text{dl}$, en toros entre 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en terneras 6 $\mu\text{g}/\text{dl}$ y en terneros 3 $\mu\text{g}/\text{dl}$. En pequeños animales esta distribución es en perro < de 1.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ mientras que en gatos está entre 0.3 y 1 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Las enzimas 11 β -hidroxideshidrogenasas de tipo I (HSD-I) y de tipo II (HSD-II) juegan un papel preponderante en la regulación de la producción de hormonas corticosteroides y esteroides, así como en su metabolismo (Jamieson et al., 1999). La primera, localizada en el hígado, se caracteriza por una débil afinidad y una actividad de tipo reductasa, que transforma la cortisona en cortisol. La segunda, localizada principalmente en el riñón, pero igualmente en el colon y en la placenta, se caracteriza por una gran afinidad y una actividad principalmente de tipo oxidasa (Kasuya et al., 1998). La tasa de cortisol puede ser influida por varios factores: sexo, genética, patologías, la acción de otras hormonas. Los glucocorticoides naturales son esencialmente metabolizados por enzimas hepáticas que conducen a derivados hidrogenados, pero igualmente por la flora microbiana gastro-intestinal (Baron et al, 1997; Holland 1982).

Una de las transformaciones metabólicas es la reducción del doble enlace entre el C4 y C5 que conduce a la inactivación de la hormona (Damkjoer et al, 1969). A continuación se produce una reducción del grupo cetona en la posición C3. Para los compuestos 5 β , la reducción del grupo cetona en posición C3 conduce mayoritariamente a los derivados 3 α -hidroxilados, así para los componentes 5 α , esta

reducción da mayoritariamente los derivados 3β -hidroxilados (Gagnault et al., 1997). Los metabolitos 5β -hidrogenados (tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisona) ó 5α -hidrogenados (alo-tetrahydrocortisol, alo-tetrahydrocortisona) representan aproximadamente el 50 % del cortisol urinario en el hombre (Passingham et al, 1987; Kasuya et al., 2000). La naturaleza y las proporciones relativas de los diferentes metabolitos varían según las diferentes especies. Así los principales metabolitos de la fase I del cortisol son los derivados 5β y 5α -hidrogenados en el hombre y el 20β -hydrocortisol en ganado ovino (Schelcher et al., 1999).

Corticosteroides sintéticos: Un estudio realizado en el hombre ha puesto en evidencia la presencia de metabolitos hidroxilados en posición C6 y C20 después de la administración de dexametasona (Rodchenkov et al., 1988). La triamcinolona aparece principalmente en su forma nativa y una pequeña proporción de metabolitos correspondientes a una oxidación en C11 y una reducción del ciclo A. Otros autores han observado las mismas hidroxilaciones en C6 y C20 para la metilprednisolona (Vree et al., 1999a/b) y oxidaciones de los grupos alcohol y cetona en C20 y C21 en el grupo carboxilo. Skrabalak y colaboradores (Skrabalak et al., 1982; Skrabalak et al., 1984) observaron en el caballo los metabolitos urinarios correspondientes a una hidroxilación en C6 y C16. En lo que concierne a la especie bovina, no se han encontrado datos bibliográficos sobre el metabolismo in vivo de los corticosteroides sintéticos. Los únicos trabajos realizados se refieren a los perfiles de eliminación de las formas libres en orina y en heces de la dexametasona, betametasona y la triamcinolona acetónido (Courtheyn et al., 1994; Courtheyn et al., 1998).

Una serie de modificaciones metabólicas comunes se pueden observar tanto *in vivo* como *in vitro*. Es el caso de la reducción de las insaturaciones a nivel del ciclo A, y de los grupos cetonas C3, C11, C20 así como de la hidroxilación en C6. Además la

isomería β parece generalmente predominante en C5. Sin embargo, se pueden notar diferencias sensibles entre los corticosteroides endógenos y los artificiales, en lo que concierne a la naturaleza de las proporciones de los metabolitos observados. Así, las reacciones de hidrogenación parecen más frecuentes para las moléculas naturales, mientras que las hidroxilaciones parece la vía predominante en las moléculas sintéticas (Tomlinson et al., 1997). En conclusión, parece difícil obtener un esquema metabólico general de los corticosteroides, debido al gran número de compuestos que engloban los corticosteroides y también debido a las grandes diferencias entre las distintas especies, junto al gran número de factores que intervienen en el proceso metabólico y de regulación.

Metabolismo de la fase II:

Se ha observado que la conjugación con ácido glucurónico confiere a las hormonas un carácter hidrófilo que facilita su eliminación. Mediante la conjugación con ácido glucurónico se eliminan tanto corticosteroides endógenos como xenobióticos que posean grupos alcohol, fenol, carboxilo y aminas aromáticas. En el caso de los corticosteroides, el ácido glucurónico se conjuga a alcoholes y fenoles y da lugar a éteres. Esta conjugación está catalizada por la UDP-glucoronil-transferasa que se localiza tanto en el sistema microsomal hepático como en el riñón, digestivo y piel. Muy pocos estudios se disponen de las proporciones en forma libre y conjugadas eliminadas en la orina, así como de su repartición en los tejidos. Para el cortisol en el hombre el 95% es eliminada en forma glucurónica, el 4% bajo forma sulfato y un 1% bajo forma libre (Gagnault et al., 1997; Kasuya et al., 2000). Las conjugaciones en la posición C21 parecen las más frecuentes y no existe información sobre la existencia de conjugación en otras posiciones potencialmente disponibles (C3, C11 o en C17).

Hay que destacar que la conjugación con el ácido glucurónico no se lleva a cabo en animales recién nacidos. Los animales muy viejos presentan una menor síntesis proteica y por ello sus sistemas enzimáticos son deficientes, siendo por ello más sensibles a los fármacos.

Biotransformación extrahepática:

A nivel extrahepático también se producen reacciones de biotransformación de fármacos. Los microorganismos intestinales y del rumen son capaces de metabolizar fármacos mediante reacciones de hidrólisis y reducción generalmente. En el intestino se hidrolizan glucuronatos y se producen reacciones de dealquilación, desaminación, deshalogenación y reducciones de diversas clases. Estos procesos metabólicos los puede sufrir tanto los glucocorticoides administrados por vía oral como aquellos que accedan al tracto gastrointestinal por difusión pasiva desde la sangre y por supuesto los metabolitos conjugados o no que se excretan por la bilis. La hidrólisis de un fármaco conjugado liberará el fármaco activo que puede ser reabsorbido.

También pueden sufrir fenómenos de biotransformación por esterases a nivel plasmático, pulmonar, renal...

4.A.4.- FASE DE ELIMINACIÓN

Los fármacos que han sido absorbidos por el organismo no permanecen de forma indefinida en él, sufriendo una serie de procesos que tienen como finalidad la desaparición de las moléculas del fármaco del torrente circulatorio y de sus lugares de acción. Este conjunto de procesos podemos englobarlos bajo la denominación de eliminación.

Los procesos de biotransformación producen, en muchas ocasiones, la inactivación del fármaco, facilitando su excreción. El complejo glucuroconjugado es

más hidrosoluble y más ácido que el fármaco de partida, contribuyendo así a la acidificación de la orina. El cortisol tiene una semi vida de 2 horas, es decir, pronto es captado por el hígado, donde se conjuga con el glucurónico y se excreta por orina (75%) o con las heces (25%). Tan sólo una porción muy pequeña del cortisol aparece sin cambios en la orina. Los productos de excreción pueden determinarse en la orina como 17-hidrocorticosteroides o de 17-cetosteroides. En los túbulos renales se reabsorbe activamente el 80-90% del cortisol libre, pero no las formas conjugadas que permanecen en la orina.

En los rumiantes está muy favorecida la ruta urinaria. En los estudios realizados en ovino tratado con dexametasona se ha observado que la eliminación se efectúa en el 60-70 % en orina y en 30-40 % en las heces. La excreción en las heces comienza más tarde que la excreción en orina pero siguiendo el mismo perfil (Calvarese et al., 1994; Courtheyn et al., 1994). Sin embargo, en el caso de bovinos tratados con betametasona comienza en las heces al mismo tiempo que en orina siguiendo también el mismo perfil de eliminación (Courtheyn et al., 1998).

Estos estudios puntuales no permiten deducir un perfil general de eliminación o de retención de los corticosteroides en las diferentes matrices biológicas (orina, heces, pelo, carne). Un parámetro importante en la excreción de los corticosteroides es la tasa de unión con la proteína CBG, ya que el catabolismo y la eliminación de las hormonas no afectan a la forma libre, como ya hemos indicado. Parece probable, que una parte de la variabilidad observada entre los diferentes corticosteroides, es debida a afinidades diferentes por las proteínas de transporte plasmático, nucleares y receptores y a la estructura (halogenación, metilación) y la forma química (tipo de éster) de la molécula considerada.

La eliminación biliar, es el proceso de excreción de fármacos más importante después de la eliminación renal. En el caso de los corticosteroides, su eliminación biliar se lleva a cabo sin modificar y sin unirse a glucurónico, pudiéndose considerar a los rumiantes como unos excretores biliares medios, siendo el pH de su vesícula biliar de 6.7-7.5 y su tasa de secreción de 15 ml./kg/día.

El organismo está menos adaptado para eliminar los derivados sintéticos como la prednisolona y la dexametasona, de aquí que se incremente la duración del efecto y la actividad.

4.B. - FARMACODINAMIA

4.B.1.- MECANISMO DE ACCION DE LOS CORTICOSTEROIDES SOBRE LOS RECEPTORES HORMONALES

La investigación para la identificación y el aislamiento de los receptores para hormonas de esteroides comenzó durante la década de los sesenta. Los receptores hormonales son específicos, no sólo para los esteroides biológicamente activos, sino también para un tejido determinado. Así, sólo los tejidos "blanco" contienen los receptores adecuados. Por ejemplo, el timo y el tejido fibroblástico tienen receptores para glucocorticoides pero no para las hormonas sexuales.

Los glucocorticoides llegan a los tejidos a través de la circulación sanguínea. Las hormonas esteroides atraviesan fácilmente la membrana plasmática, por difusión pasiva o por transporte activo y se combinan con receptores proteicos específicos de manera reversible. Estos receptores se encuentran principalmente localizados en el citoplasma celular (aunque se piensa que también pueden existir algunos de tipo nucleoplásmico). El receptor forma parte de un complejo multiproteico, denominadas

proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein o HSP). El complejo hormona receptor se forma provocando la exclusión de las proteínas HSP.

Existen distintos tipos de receptores de hormonas de corticosteroides. Los *receptores de tipo 1* poseen una afinidad similar tanto por los glucocorticoides como por los mineralocorticoides, y están presentes en riñón, glándula parótida, colon y músculo cardíaco. Los *receptores de tipo 2*, son específicos de los glucocorticoides, y esencialmente se presentan en hígado, músculo esquelético, colon y tejido óseo. Los dos tipos de receptores están igualmente presentes en el sistema nervioso central, principalmente en el sistema límbico (hipocampo, amígdala) y participan en el retrocontrol negativo de estas hormonas en el eje hipotálamo-hipofisario. El equilibrio de los dos tipos de receptores parece ejercerse a través de la activación o inactivación enzimática de ciertos grupos funcionales de estas moléculas (Rogerson et al, 2000).

El receptor de los glucocorticoides está constituido por una estructura de 750 aminoácidos en la que se pueden distinguir 4 regiones. La primera situada en la extremidad N-terminal y rica en aminoácidos ácidos. La segunda es el dominio de la unión al ADN, situada en el centro y que posee 9 cisteínas de las cuales 8 son capaces de ligarse a 2 átomos de zinc y que permite una estructura llamada "en dedo de zinc" que interactúa con el ADN. La tercera es una región implicada en el paso del receptor al núcleo celular y por último, situada en la extremidad del C-terminal, está la zona de unión de la hormona que participa en la activación transcripcional.

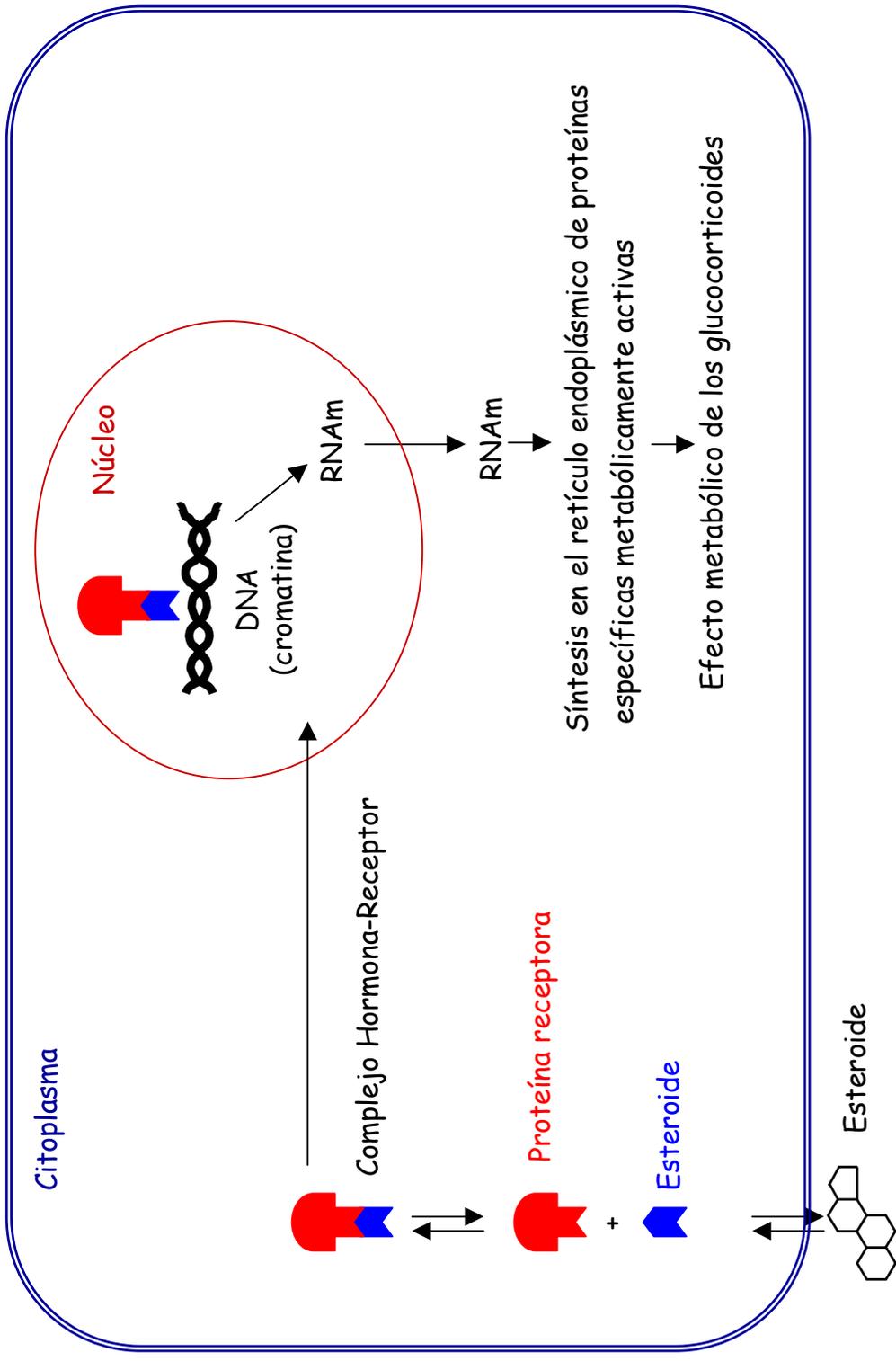
La regulación de la síntesis de receptores se asegura principalmente por los propios corticosteroides que ejercen un retrocontrol (Haughey et al., 1992). Así se ha observado que la reducción de la tasa de hormonas podía inducir en contrarreacción un aumento de la duración de la vida de los receptores, de la

actividad transcripcional de su ARN mensajeros y/o de la estabilidad de este ARNm. Se ha observado un importante pero compleja influencia de los neuromediadores del eje hipotálamo-hipofisario (adrenalina, serotonina, dopamina) sobre la regeneración de los receptores glucocorticosteroideos presentes en el sistema nervioso central.

Como sucede con todas las hormonas esteroides, el mecanismo de acción de los corticosteroides consiste en una estimulación de la síntesis proteica celular, especialmente de enzimas. El proceso atraviesa por las siguientes etapas: (**Figura II.4**).

- Entrada en la célula "blanco" de los corticosteroides, que atraviesan la membrana celular debido a su liposolubilidad. Cuantos más grupos polares posean en su estructura menor será su solubilidad en lípidos, se reduce, por tanto, la capacidad de la molécula para cruzar las membranas celulares.
- Unión de la hormona con receptores intracelulares proteicos específicos, con alta afinidad por la misma, que se encuentran en el citosol, para dar lugar a un complejo esteroide-receptor.
- Paso al núcleo celular de dicho complejo que se une al ácido desoxirribonucleico o ADN de la cromatina nuclear. Se produce un estímulo de la producción de la formación de ácido ribonucleico mensajero o ARN_m - transcripción genética- y del ácido ribonucleico ribosómico o ARN_r.
- A consecuencia de estos fenómenos se produce un aumento de la síntesis proteica intracelular, especialmente de enzimas proteicas, responsables de los efectos metabólicos de dichos glucocorticoides,

Figura II.4



tanto anabólicos como catabólicos, comportándose los glucocorticoides pues, como activadores genéticos.

La capacidad de los corticosteroides para inducir una actividad transcripcional depende de la estabilidad del complejo hormona-receptor. Se ha demostrado que la función del grupo hidroxilo en la posición 21 es suficiente para estabilizar el complejo en el caso de los mineralocorticoides pero que es insuficiente en el caso de los glucocorticoides (Hellal Levy et al. 1999).

4.B.2.- EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LOS CORTICOSTEROIDES

Como consecuencia de la unión de los glucocorticoides a sus receptores se producen una serie de efectos farmacológicos que constituyen la base de su acción terapéutica o de la presentación de efectos secundarios o cambios que justifican su empleo en diferentes usos "no terapéuticos" de tipo ilícito.

4.B.2.1. - Efectos metabólicos.

4.B.2.1.1.- Acción sobre el metabolismo de los hidratos de carbono:

Los glucocorticoides tienen como misión fundamental proteger el cerebro y el corazón de la falta de glucosa, para ello emplea un mecanismo que permite un incremento de la tasa de glucosa pero no permite su uso por los tejidos periféricos. La administración de corticosteroides exógenos favorece la producción de una serie de enzimas que intervienen en la glucogénesis, es decir, la producción de glucógeno a partir de glucosa y en la neoglucogénesis o producción de glucosa a partir de sustancias endógenas (lactato, piruvato, aminos, lípidos...). Se estimula al hígado para que forme glucosa y su acúmulo en el mismo. Además, los glucocorticoides dan

lugar a una disminución de la actividad del receptor a la insulina y un aumento de la secreción del glucagón.

Un estudio realizado en bovinos ha puesto de evidencia un aumento de la glucemia de 0.9 a 1.5 g/L después de la inyección de la dexametasona (Istasse et al., 1989). Sin embargo el metabolismo de la fructosa no se ve afectado por la dexametasona (Tounian et al., 1997).

4.B.2.1.2.- Acción sobre el metabolismo de proteínas y lípidos:

Para favorecer la síntesis de glucosa a partir de aminoácidos, la administración de glucocorticoides aumenta el catabolismo proteico, con aumento de la excreción urinaria de nitrógeno. Estos procesos afectan sobre todo al tejido óseo, conectivo y linfoide y al músculo (tanto liso como estriado) provocando la aparición de miopatías como fue demostrado en el hombre tras el tratamiento con glucocorticoides (Gayan et al., 1998) así como en cultivos de células de ratón después de la administración de dexametasona (Yoshiko et al., 1998).

La administración de glucocorticoides provoca un aumento de la excreción urinaria de ácido úrico por disminución de la reabsorción tubular de este ácido úrico en el riñón.

La administración de dosis continuadas de glucocorticoides lleva a una redistribución de la grasa con movilización de la misma. En el hombre se acumula en las mejillas -"cara de luna"- y también en el dorso -"espalda de búfalo"- y en el perro en el vientre -*abdomen en péndulo*-, pudiendo producirse obesidad (Guidetti et al., 1998; Livingstone et al., 2000). Esto se debe a la lipólisis que se produce en el tejido adiposo de regiones sensibles a los corticosteroides (por activación de las principales enzimas lipolíticas) y a la lipogénesis y depósito de grasa en los demás. La

estimulación de la lipogénesis se debe sobre todo al aumento de la secreción de insulina debido a la hiperglucemia.

Además, se produce un aumento de la absorción intestinal de las grasas y se activa su degradación.

Cuando se administran grandes dosis de glucocorticoides durante largos periodos, la acción catabólica de las grasas y proteínas queda reflejada por el desgaste de los tejidos, por la reducción de la masa muscular (cansancio, debilidad), balance negativo de nitrógeno (aumenta la eliminación de nitrógeno y ácido úrico en orina), por osteoporosis, por adelgazamiento de la piel y por la alteración de los patrones de la grasa corporal.

4.B.2.1.3- Acción sobre el metabolismo inorgánico:

La administración de corticosteroides conlleva una disminución de la respuesta diurética al agua. Este efecto que se observa únicamente con los glucocorticoides se debe a dos fenómenos:

- Aumento de la filtración glomerular.
- Disminución de la reabsorción tubular de agua en los túbulos distales y colectores por reducción de la permeabilidad de los mismos, aumento de la reabsorción activa de sodio y pérdida de potasio en los segmentos distales del nefrón.

La acción sobre el metabolismo electrolítico es característica de los mineralocorticoides aunque también la poseen los glucocorticoides pero en menor grado, su diferencia es cuantitativa. El exceso de tratamiento con corticosteroides origina hipocalcemia, alcalosis metabólica, e incluso polidipsia y poliuria. Pero los

modernos corticosteroides sintéticos, apenas tienen estos efectos, sobre todo la dexametasona.

4.B.2.2.- Efectos sobre el sistema cardiovascular

La administración continuada de corticosteroides es capaz de provocar hipertensión arterial debida a la retención de sodio, resistente incluso a dietas hiponatrémicas, hipervolemia y lesiones arteriales generalizadas.

Los glucocorticoides estimulan la producción de angiotensinógeno por el hígado, lo que puede llevar a un aumento de la angiotensina, que por la estimulación de la producción de aldosterona es capaz de elevar la presión arterial por retención salina.

4.B.2.3.- Efectos sobre el sistema gastrointestinal

Los glucocorticoides aumentan la secreción gástrica de ácido clorhídrico y de pepsina cuya consecuencia es la formación de úlcera gastroduodenal. La inhibición de la fosfolipasa A₂ bloquea la secuencia de formación de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Por tanto una disminución de la PGE provocará una menor protección gástrica y renal. También se produce un adelgazamiento de la mucosa gástrica y una reducción de la producción de mucus, por lo que se debe tener cuidado con su uso muy prolongado. Además reducen la absorción de calcio por el tracto gastrointestinal y promueven su excreción renal.

4.B.2.4.- Efectos sobre la sangre y órganos hemotopoyéticos

Con la administración de glucocorticoides, se observa a nivel de los órganos linfoides la desintegración de los linfocitos -pícnosis y lisis- con verdadera disolución

de los mismos -acción citolítica-. disminuyendo también su producción, de manera que su número en sangre periférica es menor (el recuento no sobrepasa el 28% cuando los valores fisiológicos normales se encontrarían entre el 45-70%) (Brambilla, 1997). Disminuye la liberación de monocitos, eosinófilos y basófilos así como la actividad de los fibroblastos. La cantidad de eritrocitos aumenta, debido a estimulación de la eritropoyesis, al igual que ocurre con los neutrófilos.

Asimismo, en la administración continuada de glucocorticoides, los ganglios linfáticos y el timo sufren una involución acentuada -acción timolítica-. Esta acción se debe al catabolismo proteico y a la acción antianabólica de los glucocorticoides, así como a la disminución de la captación de glucosa por las células linfoides.

La administración de glucocorticoides puede producir un aumento del nivel de las plaquetas sanguíneas.

Todos estos datos significan un hallazgo importante *in vivo* para saber si los animales pueden estar siendo tratados o no con estas sustancias.

4.B.2.5.- Efectos sobre el sistema óseo y piel

El uso de glucocorticoides en tratamientos prolongados y sin una terapia de compensación, puede producir descalcificación e incluso osteoporosis (Sambrook, 2000), lo que puede dar lugar a fracturas patológicas en animales tratados con dichos corticosteroides, por acelerar el metabolismo de los osteoclastos y disminuir el de los osteoblastos. Además, afecta al paratiroides y al metabolismo del calcio. Para contrarrestar el efecto nombrado anteriormente se deben administrar conjuntamente anabolizantes. Producen, por tanto, inhibición del crecimiento óseo (ya que disminuye también la producción de la hormona de crecimiento) e inhibición de la formación de la matriz y de la calcificación.

Dicha administración también puede producir trastornos cutáneos, en forma de estrías con adelgazamiento de la piel y equimosis por fragilidad capilar. Además, también se produce una inhibición de la proliferación de fibroblastos y una inhibición de la síntesis de proteínas conjuntivas como el colágeno y procolágeno retrasando la cicatrización.

Estos trastornos se deben esencialmente al excesivo catabolismo proteico que conduce a la atrofia de los tejidos de la dermis cutánea, incluidos los capilares.

4.B.2.6.- Acción inmunológica

Los glucocorticoides son capaces de inhibir la producción de anticuerpos -acción inmunosupresora-, con dosis muy elevadas de dichos fármacos, produciéndose una disminución de la resistencia a las infecciones en los animales.

En todos los casos, la inmunosupresión -anticuerpos e inmunidad celular- se debe a la disminución de la función y la lisis de los linfocitos B -inmunidad por anticuerpos- y especialmente de los linfocitos T -inmunidad celular-. Diversos estudios han demostrado una disminución de los linfocitos después de la administración de dexametasona (Istasse et al., 1989), de prednisolona (Scudeletti et al., 1999) o de metilprednisolona (Piekoszewski et al., 1994).

Los corticosteroides tienen una acción antialérgica. No parece que los corticosteroides afecten directamente a la reacción antígeno-anticuerpo o a la liberación de histamina, sino que simplemente alteran la reacción celular a la histamina.

4.B.2.7.- Efectos antiinflamatorios

Los glucocorticoides tienen una potente acción antiinflamatoria sea cual sea la causa de la inflamación (química, física, inmunológica), además afectan tanto las manifestaciones inmediatas (hinchazón, calor, rubor, dolor, pérdida de función) como tardías (cicatrización y proliferación celular), pero no afectan a la causa sino al síntoma (excepto en el caso de terapia de sustitución), es decir, se trata de una acción supresiva y si se interrumpe la administración del medicamento se produce una recaída de los síntomas y aún un "efecto rebote", al menos que la enfermedad causal haya sido curada.

La reacción biológica tiene lugar a nivel celular inhibiendo la biosíntesis y la liberación de las prostaglandinas. Se produce una inhibición de la fosfolipasa A_2 (mediada por una proteína llamada lipocortina) por lo que disminuye el factor liberador de plaquetas y los eicosanoides.

Los corticosteroides estabilizan y mantienen la integridad de las membranas celulares, lisosómicas, y mitocondriales.

Los glucocorticoides actúan en cada una de las tres fases del proceso inflamatorio (vascular, celular y de reparación) y reducen las manifestaciones clínicas (fiebre, enrojecimiento, edema y dolor).

Sobre la fase vascular actúan disminuyendo la vasodilatación y la permeabilidad endotelial, con una bajada de la secreción de sustancias vasoactivas tales como serotonina o histamina (produciendo una disminución de la fracción de complemento y una inhibición de la fosfolipasa A_2). Sobre la fase celular inhibe la síntesis y liberación de los mediadores de la inflamación (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos). Y sobre la fase de reparación disminuye la afluencia de macrófagos y granulocitos sobre la zona inflamatoria, aunque dichos corticosteroides inhiben la

formación de los fibroblastos, el tejido de granulación y el depósito de la sustancia fundamental del tejido conectivo, retardando así el proceso de cicatrización. (Lundberg et al., 2000; Majori et al., 1998, Fokkens et al., 1998).

El cariz antiinflamatorio de los glucocorticoides va ligado a la presencia de dos grupos "oxi" o bien "hidroxi", unidos a los carbonos 2 y 17.

La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides se observa de manera sobresaliente en los procesos reumáticos inflamatorios tales como la artritis reumatoide o la fiebre reumática aguda, disminuyendo o desapareciendo de los signos locales y generales.

4.B.2.8.- Acción endocrina

Una terapéutica con corticosteroides muy continuada puede disminuir la actividad de la hipófisis anterior, al hacerse innecesaria la secreción de ACTH y la falta de este estímulo se traduce en la atrofia del córtex suprarrenal pero no de la zona glomerular. Esto es un hallazgo importante en los mataderos a la hora de determinar si un animal ha sido tratado con estas sustancias o no, ya que la glándula suprarrenal aparece disminuida de tamaño. Asimismo, esta medicación continuada, puede repercutir en otras esferas endocrinas que gobierna el lóbulo anterior hipofisario (insuficiencia tiroidea, ovárica, testicular,etc), o en determinados procesos que hemos puesto de manifiesto anteriormente (disminución de la hormona TSH y de las gonadotropinas, aumento de la síntesis de Adrenalina o aumento de la Parato hormona PTH, insulina o glucagón.

4.B.2.9.- Efectos neurológicos

Diversos experimentos en animales han demostrado que una administración prolongada de corticosteroides puede causar múltiples efectos negativos en el desarrollo estructural y funcional del sistema nervioso central (Huang et al., 1999; Matyszak et al., 2000). Estos efectos se producen por una acción directa sobre los receptores presentes en la corteza cerebral (Joëls et al., 1998), o por interacciones con diversos tipos de hormonas como hormonas sexuales o tiroideas, que alteran el sistema neuroendocrino.

Con la administración repetida de glucocorticoides, se pueden presentar trastornos psíquicos -euforia, excitación nerviosa, insomnio, pesadillas- y mentales, que pueden llegar a una verdadera psicosis (Jenkins et al., 2000). En los animales de experimentación, el umbral de estimulación eléctrica del cerebro desciende, eso explica la aparición de ataques epilépticos durante el tratamiento con glucocorticoides.

Las modificaciones de la conducta que se han descrito en perros y gatos tienen su base en la interacción de los glucocorticoides a nivel hipocampal y las estructuras límbicas suprahipotalámicas, tales como la amígdala y el hipocampo (Ratka et al, 1989; Bradbury et al, 1991; Bradbury et al, 1994), con la liberación de neurotransmisores tipo serotoninérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, colinérgicos ...

La regulación "crónica" de los receptores hipocámpales ha sido implicado como un mecanismo primario de deterioro de la regulación del eje HPA en estados de aumento de estas sustancias como son los casos de stress crónico, desórdenes afectivos, etc (McEwen et al, 1987; Brooke et al, 1994) ya que los glucocorticoides son hipersecretados en estados de stress crónico. . La diferencia microanatómica de los receptores de tipo 1 y 2 en el hipocampo es clara, recientes estudios sugieren

que alteraciones en la función del eje HPA están asociados con cambios subespecíficos en la densidad de los receptores de los glucocorticoides (Yau et al, 1992; Whitfield et al, 1990).

En relación con el dolor, sin que sean antiálgicos, se observa un gran alivio, por un doble mecanismo, que se refiere a la descompresión de las terminaciones nerviosas por una disminución de la inflamación y a también por la regulación en los niveles de serotonina y su implicación en los dolores de tipo crónico.

III.- EMPLEO Y RIESGO DEL USO DE LOS CORTICOSTEROIDES

III.1.- UTILIZACION DE LOS CORTICOSTEROIDES COMO AGENTES TERAPEUTICOS

Los glucocorticoides esencialmente se utilizan por sus propiedades antiinflamatorias en reumatología, gastroenterología, oncología, y en neurología. Igualmente se emplean en dermatología y en oftalmología, así como en alergología. La principal restricción de su uso son los efectos secundarios que produce (miopatía por esteroides, osteoporosis, síndrome de Cushing...).

Existen numerosos preparados farmacéuticos con glucocorticoides que permiten su administración por vía oral, inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraarticular, como colirios, pomadas o geles. Los principales usos terapéuticos en distintas especies y con diferentes glucocorticoides aparecen descritas en la **Tabla III.1**:

TABLA III.1

DEXAMETASONA

- Enfermedades metabólicas
 - Enfermedades inflamatorias
 - Alergias
- Vacuno, cerdos, perros, gatos y caballos.

BETAMETASONA

- Acetonemia
 - Inducción al parto
 - Shock
 - Enfermedades inflamatorias y articulares
 - Dermatitis y procesos alérgicos
- Vacuno, ovejas, cabras, pavo, cerdos, caballos, perros y gatos.

FLUMETASONA

- Dermatitis
 - Shock
 - Cetosis
 - Enfermedades inflamatorias
- Vacuno, ovejas.

III.2.- UTILIZACION DE LOS CORTICOSTEROIDES COMO AGENTES DOPANTES

Los glucocorticoides, como cualquier fármaco, presentan una serie de acciones farmacológicas que justifican su utilización terapéutica, pero que a su vez conllevan una serie de efectos secundarios colaterales a la mayoría de las acciones, sobre todo cuando se administran a altas dosis, como es, por ejemplo, la acción catabólica de las grasas y proteínas que queda reflejada por el desgaste de los tejidos, por la reducción de la masa muscular, por osteoporosis, por adelgazamiento de la piel y por la alteración de los patrones de la grasa corporal, (todos estos, síntomas clínicos típicos del síndrome de Cushing, producido de forma natural o bien producido yatrogénicamente). Ahora bien, a veces estos fármacos se pueden utilizar para fines no terapéuticos. Si la administración es a dosis bajas durante largos periodos de tiempo y en función de su biodisponibilidad, su metabolismo y/o su asociación con otras moléculas tales como β -agonistas, lo que van a producir es un aumento de la ganancia de peso e incremento de la relación músculo/grasa debido a la retención de agua en el músculo, pudiendo utilizarse, en este caso ilegalmente, como promotores de crecimiento. Su uso continuado a bajas dosis conlleva una serie de efectos negativos tanto para el animal que lo recibe, pudiendo tener efectos adversos tales como la degeneración del timo en el ganado, o la producción de una carne de menor calidad (Brambilla, 1997), como para el consumidor de los productos de estos animales.

III.3.- ANÁLISIS DE RIESGOS DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

El análisis de riesgo conlleva tres procesos denominados evaluación del riesgo, gestión del riesgo y Comunicación del mismo. Aquí nos vamos a referir tan solo a los dos primeros y desde el punto de vista de los aspectos que interesan a esta memoria, por no ser objeto de la misma un estudio pormenorizado de este análisis de riesgo.

3.1.- EVALUACION DEL RIESGO DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

El proceso del análisis que se realiza tiene por objeto la evaluación de los efectos nocivos de los residuos bajo un enfoque esencialmente científico. No obstante, para seguir profundizando sobre este proceso se considera necesario saber cuales son las bases documentales de cada etapa para comprender la complejidad del mismo. Hay que dar al residuo su dimensión toxicológica puesto que puede comportarse, como cualquier producto químico, con una sustancia nociva para el organismo. Debido a las bajas concentraciones que suelen estar presentes en la economía animal, es difícil que presenten problemas de toxicidad aguda, que por lo general requiere mayores concentraciones, por eso los peligros hay que evaluarlos especialmente mediante estudios de toxicidad crónica, en los que es importante la reiteración de la toma. En función de este análisis, se pueden definir cuales son los niveles o concentraciones a los que no se presentan efectos nocivos y por tanto las tolerancias para asegurar la protección de la salud de los consumidores (Rico et al, 1985). Debemos tener una información completa sobre las características

estructurales y físico-químicas de la sustancia en estudio para poder evaluar posteriormente los datos sobre su seguridad y sobre los residuos derivados de su administración.

Realizado este estudio de toxicidad, la primera cuestión que se precisa responder es cuales son los riesgos que se pueden vincular a la ingesta de residuos. Se describen los efectos tóxicos de la molécula y de sus metabolitos (síntomas observados, duración, consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas y anatomopatológicas). Como hemos comentado anteriormente, si los residuos proceden de animales destinados a la producción de alimentos, es obvio que sus concentraciones no pueden ser muy elevados, pues en caso contrario originarían intoxicaciones en estos animales y no conseguirían el fin inicialmente previsto de mejorar la producción, por tanto el problema en la mayoría de los casos puede surgir de la ingestión regular de pequeñas cantidades de igual sustancia, que puede acarrear a la larga, efectos acumulativos o alteraciones subclínicas que se traducen en toxicidades crónicas o subcrónicas según los casos.

Los estudios de toxicidad crónica por vía oral (por ejemplo el consumo continuado de una sustancia existente en algún alimento), nos sirven para proponer para cada especie investigada un nivel sin efecto observable, también denominado NOEL. Este término define la dosis a la que no se aprecia un incremento, biológicamente significativo, en la severidad o frecuencia de efectos sobre el animal tratado. Existe un NOEL diferente en el caso de hembra gestante y progenie.

Como conclusión de los resultados obtenidos se llevará a cabo una propuesta sobre la ingesta diaria admisible, también denominada por sus siglas como IDA. La IDA es una estimación de la cantidad de un tipo de residuo que puede ser consumida diariamente, durante toda la vida de un hombre, sin que exista riesgo apreciable para

la salud. Se expresa sobre la base del peso corporal. El cálculo de la IDA se fundamenta en estudios toxicológicos, escogiendo siempre aquel que se refiera al parámetro o efecto más sensible en la especie animal más sensible.

Una vez establecida la IDA para una sustancia, se entra en la etapa correspondiente al estudio de residuos. En ella se procede a la fijación de un límite máximo de residuos o LMR para los diferentes tipos de alimentos en forma de residuo marcador. Esta acción se lleva a cabo basándose en varios puntos: El primero es el valor calculado para la IDA y el segundo es la cantidad media de alimento de origen animal que consume diariamente un individuo como dieta standard, ya que con ello valoramos la exposición del hombre a los residuos de un medicamento a través de los alimentos de origen animal. Como es difícil valorar esta exposición basándose únicamente en principios científicos, se prefiere reducir al mínimo los riesgos para el consumidor con una estimación deliberadamente sobre valorada de esa exposición.

Asimismo, se exige el establecimiento de un método de análisis de rutina, que deberá ser capaz de detectar y cuantificar los residuos a concentraciones inferiores al límite máximo.

Al igual que ocurre con los LMR, los procedimientos utilizados para establecer los tiempos de espera han sido armonizados mediante la creación de directrices y recomendaciones comunes para todos los países miembros de la UE (ver apartado 4.2).

3.2.- GESTION DEL RIESGO DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS: MARCO LEGAL

Una vez conocido y evaluado es riesgo, es necesario hacer una gestión del mismo es decir establecer una serie de normas o leyes que permitan controlar el uso de

dichas sustancias sin que se presente riesgo para la salud de los consumidores y por otro lado permita una producción de alimentos acorde a las necesidades higio-sanitarias y de bienestar animal que en estos momentos se requiere y demanda la sociedad.

No obstante la legislación que regula el control de residuos tiene como objetivo fundamental la protección de la salud de los consumidores (Martín, 1997). Asimismo se busca favorecer los intercambios comerciales de alimentos de manera que los sistemas de control gocen de un reconocimiento mutuo que impida el establecimiento de barreras que no sean las estrictamente sanitarias.

3.2.1. - Evolución histórica

El fraude en la utilización de sustancias prohibidas en alimentación animal es muy antiguo, si bien, el control de los mismos es relativamente reciente debido a que es necesario contar con técnicas laboratoriales que permitan la detección de dicho fraude. Los principales obstáculos para su control han radicado en una infraestructura poco operativa para el muestreo y en la realización de pruebas analíticas que pudieran confirmar la utilización de estas sustancias en los animales de abasto.

Desde las primeras sustancias utilizadas, bien en forma de implantes o añadidas al pienso o agua de bebida, como el DES, antibióticos o los tiuracilos, hasta las nuevas sustancias hormonales, los β -agonistas, corticosteroides y otros, de composición desconocida aplicadas en nuestros días, diversos productos de "acabado del animal", han sido objeto de control por los Servicios Veterinarios Oficiales en los mataderos. Con una legislación técnicamente compleja en su aplicación y en sus inicios, con escasos medios de laboratorio que pudieran dar soporte a estas actuaciones en la

línea del sacrificio, la investigación de residuos es hoy en día, una de las principales funciones de la Investigación Veterinaria de Mataderos.

La Directiva más antigua (Anon., 1970), se refiere a los aditivos que pueden ser utilizados en la alimentación de los animales y en qué niveles pueden ser añadidos. Actualmente esta Directiva sigue siendo modificada y puesta al día. Durante finales de los años 70 y la década de los 80, numerosos escándalos y problemas sanitarios acaecidos como consecuencia del uso de los medicamentos veterinarios como promotores de crecimiento salen a la luz. Se detectaron implantes hormonales y antitiroideos y con las primeras referencias bibliográficas de los β -agonistas aparecidas a mediados de estos años, se inicia la era de los modernos promotores de crecimiento no autorizados. A consecuencia de todo ello, diversos países toman medidas para frenar este tipo de prácticas, pero las mismas no son homogéneas, por lo cual la Comisión de la antigua CEE comienza a redactar un proyecto de Directiva (Anon. 1981a), que prohíbe la administración de sustancias con efectos tireostáticos, estrógenos, andrógenos y gestágenos a animales de explotación, así como la comercialización o el sacrificio de los animales a los que se haya administrado las sustancias citadas. También se prohíbe la comercialización de estilbenos y derivados.

En 1985, se aprueba la Directiva 85/358/CEE (Anon. 1985) que complementa a la anterior, al igual que la Directiva 96/22/CE (Anon.1996b). Muchos de los documentos que aparecen desde 1985 tratan de estas prohibiciones y de temas relacionados con los mismos (Directiva 87/410/CEE (Anon. (1987a), Real Decreto 1423/87 (Anon. (1987b), Decisión 88/201/CEE (Anon. (1988)). Muchos de ellos, conciernen a los criterios para los métodos de análisis y a los laboratorios que los ejecutan. En 1993 la UE elabora una Directiva (93/256/CEE) para la aceptación de métodos de análisis para la detección de residuos (Anon. 1993a).

El control de estos residuos debería llevarse a cabo por laboratorios dedicados especialmente a ello (Anon. 1986a), así, el análisis de muestras es realizado por los laboratorios de análisis de rutina (LRF). En cada estado miembro estos laboratorios de rutina deben ser coordinados y controlados por, al menos, un laboratorio nacional de referencia (LNR) designado por el gobierno nacional (Anon. 1989b), (Anon.1993b), (Anon. 1998b). Los LNR son apoyados, aconsejados y controlados por los laboratorios comunitarios de referencia, los cuales fueron designados en 1991 por la UE (Anon. 1991). Anualmente se debe hacer una revisión del programa de residuos, evaluando los resultados de ese año junto con los objetivos para el control en el año siguiente.

La utilización de sustancias no autorizadas en general, y β -agonistas en particular, se dio a conocer a los consumidores tras las intoxicaciones ocurridas en 1990 por consumo de hígado de ternera con altas concentraciones de clenbuterol u otros β -agonistas y también por las posteriores que se sucedieron. Estos brotes dieron un impulso importante al plan, y a partir de 1990, la infraestructura para la investigación de residuos en animales y canales se consolida definitivamente, y se aprueba la legislación que pretende solucionar estos problemas.

En cuanto al caso específico de los corticosteroides, se pueden distinguir tres aspectos en cuanto a la legislación española y europea relacionada con los residuos de los mismos: uso de corticosteroides en animales, límites máximos de residuos y planes de control de residuos (**Tabla III.2**).

La Ley del medicamento (Anon, 1990a) dedica una sección (dentro del capítulo de medicamentos especiales, al medicamento veterinario y el Real Decreto 109/1995 (Anon. 1995a) desarrolla distintos aspectos del medicamento veterinario tales como; evaluación, autorización y registro, ensayos clínicos y farmacovigilancia, fabricación, comercialización, prescripción y distribución de los medicamentos veterinarios.

Estos medicamentos veterinarios pueden ser incorporados a la alimentación del ganado, agua de bebida o administrados directamente al animal por diferentes vías (inyección intramuscular, implantes, etc) con tres fines: de modo terapéutico, como prevención de ciertas enfermedades o como promotores de crecimiento. Como los residuos de estas sustancias pueden ser perjudiciales para la salud de los consumidores de estos animales, su uso debe estar controlado por la ley. Las Directivas de la UE con mayor importancia en lo referente a los residuos de los medicamentos veterinarios se presentan en la **Tabla III.3**.

Tabla III.2

UTILIZACION	LIMITES MAXIMOS DE RESIDUOS	CONTROL Y SANCION
Ley Medicamento 25/1990	Reglamento (CEE) N° 2377/90	Directiva control Residuos 96/23/CE
Ley Medicamento Veterinario 109/1995	Reglamento (CEE) N° 434/97	Real Decreto PNIR 1749/1998
Directiva aditivos alimentación animal 70/524/CEE		Ley Código Penal 10/1995

Las Directivas concernientes a los residuos son revisadas y revocadas cada pocos años para mantenerlas actualizadas y poder evaluar los posibles cambios que en ellas se deben establecer.

Directivas, Reglamentos y Decisiones en relación con los residuos de medicamentos veterinarios

**Tabla
III.3**

1.- En cuanto a Aditivos:	Directiva 70/524/CEE
2.- En relación con Prohibiciones de sustancias hormonales, tireostáticos y otros medicamentos veterinarios:	Directiva 81/602/CEE Directiva 96/22/CE
3.- En relación con Normas de vigilancia y medidas de control de residuos de medicamentos veterinarios:	Directiva 85/358/CEE Directiva 86/469/CEE Decisión 87/410/CEE Real Decreto 1423/87 Decisión 93/257/CEE Decisión 93/256/CEE Directiva 96/23/CE Real Decreto 1749/98 Decisión 2002/657/CE
4.- En relación con Laboratorios de análisis de residuos de medicamentos veterinarios:	Decisión 89/610/CEE Decisión 91/664/CEE Decisión 98/536/CE
5.- En relación a los Límites Máximos de Residuos:	Reglamento 2377/90/CEE Reglamento 1308/99/CE
6.- En relación con Planes y programas relacionados con la detección de residuos de medicamentos veterinarios:	Decisión 88/201/CEE Real Decreto 1262/89

3.2.2.- Establecimiento de Límites Máximos de Residuos

Desde hace tiempo los comités FAO-OMS y la FDA de los Estados Unidos vienen estableciendo límites máximos tolerables de los residuos de medicamentos veterinarios en alimentos basados en la ingesta diaria admisible (Brynes et al, 1996). Por su parte la Comunidad Europea estableció mediante el Reglamento 90/2377/CEE (Anon.1990b) un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos de uso veterinario en los alimentos de origen animal.

Este Reglamento establece cuatro tipos de sustancias;

- . Sustancias para las que se establecen LMR. Anexo I.
- . Sustancias que no están sujetas a un LMR. Anexo II.
- . Sustancias para las que se establecen LMR provisionales. Anexo III
- . Sustancias para las que no puede establecerse LMR alguno (sustancias prohibidas). Anexo IV.

El Reglamento fijaba que a partir del 1 de Enero de 1997 sólo se podían utilizar medicamentos veterinarios con sustancias incluidas en los Anexos I, II, III. Posteriormente, a consecuencia del gran número de solicitudes pendientes, el Reglamento 97/434/CE (Anon. 1997) determina que a partir del año 2000 no se podrán administrar medicamentos veterinarios que contengan sustancias activas no mencionadas en los Anexos I, II y III o que no hubieran depositado el expediente de solicitud de Límites Máximos de Residuos antes del 1 de Enero de 1996. La mayoría de los corticosteroides ya están incluidos en el Anexo I. El Reglamento 99/1308/CE (Anon. 1999) modifica el 2377/90.

Desde un punto de vista legislativo, ningún corticosteroide está autorizado en Europa como promotor de crecimiento. Sin embargo, los corticosteroides sí están autorizados para su uso en terapéutica. Existe en España para el uso terapéutico 13

moléculas autorizadas y 117 preparaciones comerciales registradas (Veterindustria. 2000) para estos compuestos.

Estos compuestos, que pueden ser administrados a animales destinados al consumo, deben de cumplir un plazo o tiempo de espera, desde el tratamiento hasta el sacrificio, que varía en función de la molécula y el modo de administración. Los LMR para los corticosteroides por fin se han establecido, los cuales aparecen en la **Tabla III.4.**

3.2.3.- Regulación de los Planes Nacionales de Residuos

En 1986, se aprueba la Directiva 86/469/CEE (Anon. 1986), por la cual el Consejo establece normas de vigilancia de un determinado número de residuos de sustancias de acción farmacológica o de contaminantes del medio natural en animales de explotación en carnes frescas. En ella queda reflejado que los Estados Miembros deberán presentar un Plan que precise las medidas nacionales que han de llevarse a cabo para cumplir los requisitos exigidos por las Directivas Comunitarias. Con objeto de hacer posible la correcta ejecución del programa, se promulga el RD. 1262/89, de 20 de Octubre, por el que se aprueba el Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR). Su ejecución es responsabilidad de las Comunidades Autónomas, que organizan la toma de muestras, los análisis, y en su caso inician los procesos sancionadores. Como órgano de coordinación de las actividades de las Comunidades Autónomas, encargadas de efectuar los controles, se crea la Comisión Interministerial de Investigación de Residuos en Animales y Carnes frescas, compuestas por diversas Direcciones Generales de los Ministerios de Agricultura y Sanidad.

Tabla III.4

LIMITES MAXIMOS DE RESIDUOS DE CORTICOSTEROIDES

RESIDUO	ESPECIE	TEJIDO	LMR ppb	REGL. N°	ANEXO
METILPREDNISOLONA	B, P	M, G, R, H	10	1286/00	ANEXO III
BETAMETASONA	B, P	L	0.3	2593/99	ANEXO I
	B, P	M, R	0.75	2593/99	
	B, P	H	2	2593/99	
DEXAMETASONA	B	L	0.3	508/99	ANEXO I
	B, P, E	M, R	0.75	508/99	
	B, P, E	H	2	508/99	
PREDNISOLONA	B,	L	6	2535/00	ANEXO I
		M, G	4	2535/00	
		R, H	10	2535/00	

B; Bovino
P; Porcino
E; Equidos

L; Leche
M; Músculo
H; Hígado
R; Riñón
G; Grasa

Las funciones de dicha Comisión son, entre otras; Elaborar una memoria anual relativa a la ejecución del Plan y formular las propuestas que se estimen precisas para una mejor ejecución del mismo.

La Directiva 86/469/CEE fue derogada por la Directiva 96/23/CE (Anon. 1996a). Esta Directiva regula los aspectos de control de residuos en animales vivos y sus productos en la UE y ha sido incorporada al Derecho español mediante el Real Decreto 1749/1998 (Anon. 1998a).

La Directiva clasifica a los residuos en dos grupos;

Grupo A; Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas:

- 1.- Estilbenos, derivados de estilbenos, sus sales y ésteres.
- 2.- Agentes antitiroideos.
- 3.- Esteroides.
- 4.- Lactonas del ácido resorcílico (incluido el zeranol).
- 5.- β -agonistas.
- 6.- Sustancias incluidas en el Anexo IV del reglamento 2377/90 (prohibidas).

Grupo B; Medicamentos veterinarios y contaminantes:

- 1.- Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas y las quinolonas.
- 2.- Otros medicamentos veterinarios;
 - a-. Antihelmínticos
 - b-.Anticoccidianos incluidos nitroimidazoles
 - c-. Carbamatos y piretroides
 - d-. Tranquilizantes
 - e-. Antiinflamatorios no esteroideos
 - f-. Otras sustancias con acción farmacológica
- 3.- Otras sustancias y contaminantes medioambientales;

- a-. Compuestos organoclorados incluidos PCB
- b-. Compuestos organofosforados
- c-. Elementos químicos
- d-. Micotoxinas
- e-. Colorantes
- f-. Otros

Por lo tanto, a los corticosteroides podríamos incluirlos en el Grupo A, 3., según esta Directiva.

El objetivo del Plan de control es detectar cualquier tratamiento ilegal y comprobar si los residuos de medicamentos veterinarios cumplen con los límites máximos de residuos fijados en los Anexos I y III. El Real Decreto 1749/1998 (Anon. 1998a) al regular el plan de investigación de residuos español (PNIR), establece la estrategia y los niveles de muestreo para cada residuo o grupo de residuos y matriz, crea una Comisión Nacional de Coordinación de la Investigación y Control de Residuos o sustancias en animales vivos y sus productos, designa los laboratorios Nacionales de referencia y describe los procedimientos de toma de muestra y las medidas a tomar en caso de infracción. (Calderón, 2000). En el caso de los corticosteroides el Laboratorio nacional de Referencia es la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo) y el Laboratorio Comunitario de Referencia es el Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.

Además de los procedimientos administrativos sancionadores, la Ley Orgánica 10/1995 del Código Penal (capítulo III, artículo 364) (Anon. 1995b) considera como delito a la salud pública la administración en animales cuya carne o productos se

destine al consumo humano de sustancias no permitidas que generen riesgo para la salud o en dosis superiores o con fines distintos de los autorizados.

Si bien la Directiva 86/469/CEE que regulaba anteriormente los planes de residuos (Anon. 1986) se centraba, principalmente en la carne, y este alimento es el principal objetivo del PNIR, la última Directiva 96/23/CE (Anon. 1996a) extiende el control a leche, huevos, pescado, miel y productos de caza.

3.2.4.- Situación en otros países

Algunos países, al contrario que la UE que prohíbe el uso de sustancias con efecto hormonal como promotores de crecimiento, permiten el uso de algunas de estas sustancias. Por ejemplo, en Estados Unidos, Australia, Canadá y Nueva Zelanda las hormonas tanto naturales (como testosterona, 17 b-estradiol, y progesterona) como semisintéticas (como trembolona, zeranol, y melengestrol), pueden ser usadas como promotores de crecimiento. La prohibición del uso de estas hormonas por parte de la UE es normalmente disputa entre la UE con el resto de países que las permiten. La razón para esta disputa es que algunos países quieren exportar carne a los países de la UE procedente de animales tratados con estas sustancias hormonales. La World Trade Organisation (WTO) está tratando de solventarlo (Anon. 1997b).

III.4.- CRITERIOS DE VALIDACIÓN PARA LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Los criterios de validación para los métodos analíticos utilizados para el control de las hormonas prohibidas por la UE fueron expuestos por la Comisión en la Decisión 93/256/CEE (Anon. 1993a). Las técnicas analíticas que se pueden utilizar para la

detección de estas sustancias son; inmunoanálisis (IA), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS), y otros métodos que aparezcan en el Apéndice de la Decisión. También se exponen reglas sobre el tratamiento de la muestra, siendo necesario que la muestra sea representativa del conjunto y en cantidad suficiente que permita su análisis, su repetición y su confirmación.

Actualmente, es la Directiva 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002 de la Comisión la que rige los criterios de validación para los métodos de análisis, aplicando la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. En ella, se fijan algunas definiciones y conceptos así como los mínimos requerimientos para la validación de un método analítico en el análisis de residuos. Este documento incluye varias técnicas de detección tanto para *screening* como para confirmación de sustancias tanto prohibidas como para compuestos con LMR.

El concepto de validación ha sido definido por la norma UNE-EN-ISO 8402 (UNE, 1995) como "la confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista". Es decir, que mediante estudios se demuestre que las características de la técnica la hacen adecuada para el uso que se le pretende dar.

La Directiva 93/99/CEE (Anon. 1993) y su transposición en España mediante el Real Decreto 1397/1995 (Anon. 1995) establecen que los laboratorios que realizan el control oficial de los alimentos deben estar acreditados por la entidad acreditadora (ENAC en España) antes del 1 de Enero de 1998. En el caso de los residuos en alimentos, este plazo se extiende al 1 de Enero del año 2002 por la Decisión de la Comisión 98/179/CE (Anon. 1998).

La acreditación no se concede para un laboratorio en su conjunto sino para la realización de técnicas concretas y hasta hace poco tiempo, se basaba en la existencia de un sistema de calidad conforme a la norma europea EN 45001-UNE 66-501-91 (UNE 1991), pero actualmente se rige por la norma europea 17025. De acuerdo con las directrices de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 y de las guías que la desarrollan tanto para ensayos físico-químicos (ENAC, 1997) como microbiológicos (ENAC, 1997), las técnicas no normalizadas deben ser validadas en cada laboratorio.

IV.- METODOS DE ANÁLISIS

IV.1.- PROTOCOLOS GENERALES PARA EL TRATAMIENTO DE MUESTRAS.

Las etapas de extracción y purificación tratan de aislar de diferentes medios (muestra, homogeneizados, solventes) los analitos buscados. El protocolo analítico de extracción y purificación en una matriz biológica debe adaptarse en función de la especificidad y de la sensibilidad de las técnicas utilizadas para la detección. En la práctica, el principal factor limitante es la interpretación de los cromatogramas, debido a la presencia de compuestos interferentes.

Para conseguir un buen protocolo de análisis se deben conocer las características químicas del analito a evaluar, cual es su polaridad (ácido, básico o neutro), si es soluble en un solvente acuoso o no, etc. para determinar su comportamiento en la extracción con disolventes o en extracciones en fase sólida. Una vez conocidos estos datos, se aplicaran diferentes protocolos y se elegirá el más adecuado, con un bajo coste de análisis y con obtención de resultados en el menor tiempo posible, permitiendo a su vez la automatización y asegurando una buena reproducibilidad, seguridad, precisión y exactitud. Una vez planteado el protocolo del método analítico seleccionado, debe realizarse su validación a fin de conocer perfectamente su funcionamiento.

Para elegir la matriz en la cual se realizará el control de los residuos, se deben tener en cuenta los datos metabólicos y farmacocinéticos disponibles en la bibliografía (Rohatagi S. et al, 1995; Booth L.E.; Scheline R.R. et al; 1968) lo que permite conocer los lugares de acumulación y las biotransformaciones de los analitos evaluados así como las principales vías de eliminación. La orina, el pelo y los tejidos,

son las tres matrices de elección para el control de los residuos en las muestras. Las muestras de pelo también son de fácil obtención y además se pueden hacer controles a más largo plazo (meses). Hay otras matrices que están disponibles únicamente después del sacrificio del animal como son el músculo, el hígado y el riñón o mediante biopsia (aunque no es un sistema habitual en medicina veterinaria).

Otro tipo de muestra de fácil recogida, y que nos proporciona una idea general de lo que se está administrando de forma ilegal a los animales para su engorde en las granjas, son los piensos y cocktails de medicamentos veterinarios usados de forma fraudulenta. Además de la facilidad de obtención, normalmente las cantidades encontradas en ellos son elevadas, no siendo necesarios, por tanto, métodos tan sensibles.

Una vez seleccionada la matriz se procede a la preparación de muestra. La preparación de la muestra es un procedimiento de vital importancia en el análisis químico moderno. Según algunas estimaciones, entre el 60 y el 80% del trabajo y del coste de un laboratorio analítico, se utiliza para el tratamiento o preparación de la muestra con todo lo que ello conlleva (material fungible, instrumental, etc). Este proceso implica la preparación tanto física como química de la muestra para favorecer la extracción elegida.

El sistema de preparación de la muestra va a depender de la matriz y de la estabilidad de los analitos. Puede ser necesario un ajuste del pH para que las condiciones de extracción y de purificación sean las adecuadas o dilución de la misma para reducir la viscosidad y asegurar una fluidez adecuada para su análisis.

La importancia de la preparación de la muestra en el análisis de residuos radica en que algunas veces puede concentrar los componentes hasta niveles adecuados para

efectuar su medida, o eliminar la presencia en la matriz de elementos que interfieren en el análisis y que pueden dificultar la detección de los componentes de interés.

Para la mayoría de los análisis (HPLC, GC, RIA...), la muestra debe ser preparada en una solución determinada por el análisis subsiguiente. Los métodos más comunes para preparación de muestra incluyen la extracción líquido-líquido, la centrifugación, y la extracción en fase sólida.

IV.2. - METODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES

El objetivo de la extracción de una muestra es eliminar el máximo de los componentes interferentes y aislar los analitos investigados. La principal dificultad es aislar una familia de componentes que presentan polaridades variables. Entre los métodos utilizados se puede citar el lavado líquido/líquido (LLE) en medio alcalino (Bailey 1964; Courtheyn et al 1994; Skrabalak et al 1982; Yap et al 1992), HPLC utilizado para extracción (Aguilera et al 1997; Vree et al 1999a), y la cromatografía de inmunoafinidad (Creaser et al 1996; Rule et al 1992; Stanley et al 1993 a/b). Considerando estos diferentes estudios, los métodos desarrollados por otros laboratorios para otro tipo de residuos, esteroides en particular, y las propiedades físico-químicas de los corticosteroides, algunos autores realizan una primera etapa de purificación por LLE y una segunda etapa por SPE en fase normal.

2.1.- DECONJUGACIÓN

Como se mencionó en el apartado (II, 4.A.3) los corticosteroides se presentan en la orina como glucuronatos y esta conjugación se lleva a cabo en el hígado. Por ello, debemos realizar un proceso de deconjugación que libere los corticosteroides del ácido glucurónico, ya que sólo la forma libre es detectada en el análisis

cromatográfico. Este proceso de deconjugación se hará tanto en muestras de orina como en muestras de hígado o riñón. Algunos autores han estudiado la hidrólisis de los corticosteroides por vía química, añadiendo cloruro de acetilo o ácido sulfúrico (Tang et al, 1989) pero según sus métodos, aparecen interferencias y el método no es repetible.

Existe un gran número de preparaciones enzimáticas comerciales que permiten la hidrólisis de los conjugados glucurónidos (β -glucuronidasas) y de sulfatos (arilsulfatasas) (como se vio en el apartado del metabolismo de los corticosteroides, una pequeña parte se conjuga en forma de sulfatos). Existen ciertos productos a partir de moluscos (*Helix pomatia*), de bacterias (*E. Coli*) o de cultivos tisulares (hígado de bovino) que pueden utilizarse para realizar esta hidrólisis. Ciertas preparaciones se caracterizan por tener una acción del tipo β -glucuronidasa y arilsulfatasa a la vez. Algunas de estas preparaciones, son específicas para un sustrato determinado, y sólo tienen accesibilidad a determinados grupos químicos, Poseen unas condiciones de actividad máxima (pH, temperatura...) y tienen influencia sobre el analito (degradación eventual), y sobre el extracto final (aporte de interferencias).

Helix Pomatia (Merck, Ref. 1.04114) es la preparación más utilizada en la bibliografía para la deconjugación de las formas glucurónidas y sulfatos, para diversos tipos de residuos hormonales (Calvarese et al, 1994; Courtheyn et al, 1994; Rizea et al, 1996; Yergy et al, 1995).

2.2.- EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (LLE)

La extracción con disolventes se basa, fundamentalmente, en el empleo de los disolventes adecuados para extraer los analitos de interés de la muestra según el

estado de ionización en que éstos se encuentren. Generalmente, se utilizan disolventes orgánicos (hexano, tert-butilmetileter...). De esta forma separamos los compuestos de interés en la fracción orgánica.

Considerando una muestra que contenga los analitos disueltos en una solución acuosa, el principio del lavado líquido/líquido (LLE) consiste en añadir un cierto volumen de un disolvente orgánico, agitar o tratar con ultrasonidos y centrifugar, con el fin de separar las dos fases y después recuperar la fase orgánica. Esto permite hacer pasar los compuestos de interés a la fase orgánica y dejar en la fase acuosa los compuestos interferentes, en particular los compuestos muy hidrófilos, iónicos y las sales.

Asimismo, se pueden ionizar los analitos de interés para que éstos permanezcan en la solución acuosa, por ejemplo con clorhídrico, y añadir un disolvente orgánico para separar los compuestos apolares que no nos interesen. La utilización de una solución ácida nos permite, a su vez, la eliminación (o la extracción) de los compuestos nitrogenados, mientras que la utilización de una solución alcalina permite ionizar ciertos ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, y otros pigmentos, lo que lleva consigo el refuerzo de la fase de lavado. Negrioli (Negrioli, 1997) ha comparado la eficacia de los diferentes lavados en medio alcalino y ácido en los diferentes solventes orgánicos, así como la influencia de la saturación en sal de la fase acuosa.

En lo que concierne a la extracción de los corticosteroides de la orina por LLE, los disolventes más usados son el eter dietílico (Rodchenkov et al 1988, Yap et al 1992), el diclorometano (Houghton et al 1982) y el acetato de etilo (Bailey 1964). Otros estudios han comprobado la influencia de la naturaleza de la fase orgánica con relación a la fase orgánica/acuosa, del pH, de la fuerza iónica y de los rendimientos de extracción por LLE de los diferentes corticosteroides (Santos Montes et al, 1994;

Skabalak et al 1982). La repetición de los ensayos realizados por Antignac (Antignac, 2001) con NaOH 1M no ha permitido la detección de los analitos. Este fenómeno puede explicarse por una modificación química o una degradación de estos compuestos a partir de un pH demasiado elevado (superior a 12).

2.3.- EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA (SPE)

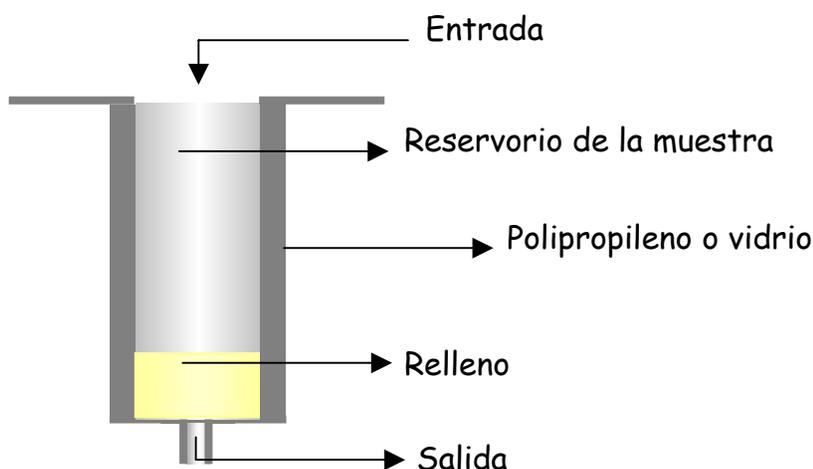
La extracción por fase sólida (SPE) es un método de preparación rápida de las muestras mediante la cual concentran y purifican los analitos buscados previamente antes de proceder a su análisis por técnicas cromatográficas (HPLC, GC-MS, LC-MS). Durante las últimas dos décadas, la SPE ha aumentado firmemente su aceptación entre la comunidad analítica y ha reemplazado rápidamente a métodos tradicionales como la LLE.

Como en la cromatografía líquida clásica, el principio de la SPE responde a las interacciones de uniones lábiles (tipo Van der Waals, electrostáticas, iónicas, hidrófobas, etc) entre los constituyentes de una fase líquida (muestra) y una fase estacionaria sólida. Esta fase estacionaria está constituida normalmente por bolas de sílice con agrupaciones químicas de tipo apolar (cadenas alquilo), de polaridad intermedia (-OH, -CN, -NH₂, diol...) o incluso muy polares. Como en la cromatografía líquida, existen dos tipos de fases estacionarias, la fase inversa (apolar) y la fase normal (polar).

2.3.1.- Rellenos de SPE

La fase estacionaria se puede presentar en una columna de vidrio o más frecuentemente, en la actualidad, en cartuchos de uso único de polipropileno u otro polímero inerte. La estructura básica de un cartucho de extracción es la siguiente;

Figura IV-1



Esquema de la estructura básica de un cartucho de extracción

El elemento clave en cualquier SPE es el sorbente o fase estacionaria. Los rellenos de los cartuchos de extracción son polímeros tridimensionales que generalmente están constituidos por dos tipos de materiales; Sílica o Resinas orgánicas. Las interacciones que se produzcan entre el analito y el relleno del cartucho están condicionadas por el tipo de material que componga el relleno y por los grupos funcionales que presente.

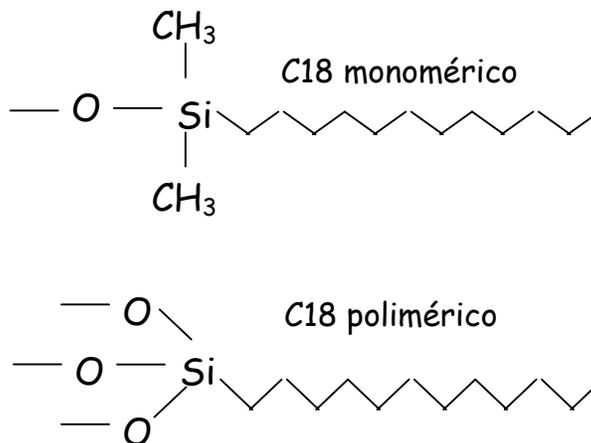
2.3.1.1.- Características químicas de los sorbentes

- *Sorbentes basados en Sílica;*

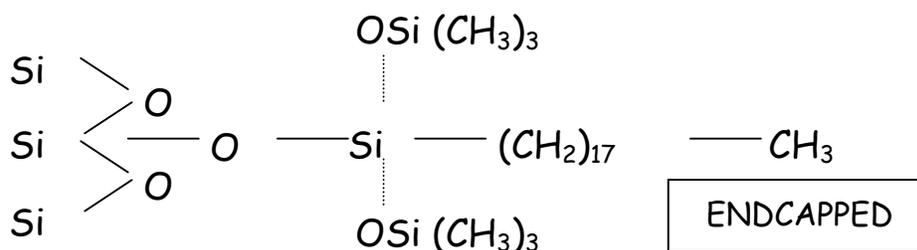
Son los más populares porque son rígidos, no excesivamente caros, reproducibles, estables y son inmunes tanto a encogerse como a hincharse con solventes acuosos u orgánicos. Los rellenos de sílica están formados por partículas de sílica modificadas químicamente con grupos funcionales unidos covalentemente a la superficie formando grupos silano. Las características de estos grupos funcionales

son muy variadas: grupos apolares (C_{18}), polares (NH_2), iónicos (ácido propilsulfónico) ó fases mixtas (C_8 /intercambio catiónico). El carácter de la sílica depende exclusivamente de los grupos funcionales ligados.

Estos grupos silano pueden ser monoméricos o monofuncionales o poliméricos o polifuncionales.



La modificación de la superficie de la sílica modifica la selectividad. Los sorbentes basados en sílica pueden contener una pequeña cantidad de grupos silanoles libres o sin reaccionar. Esto da a la superficie un carácter polar y más sensible a los valores de pH extremos. Un número importante de analitos son ionizados por esta razón y como consecuencia disminuye la recuperación, produciéndose retenciones indeseables. Para minimizar estas interacciones secundarias, se realiza el proceso denominado *endcapping*, reacción en la cual el silanol residual es metilado generalmente con trimetilsilil derivados (TMS)



Sin embargo se debe tener en cuenta que en SPE los grupos silanoles libres pueden ser usados para facilitar la retención de analitos polares en fase reversa como C_{18} , C_8 y fenil.

-. *Sorbentes de tipo polimérico:*

Están formados por resinas, que están compuestas habitualmente por poliestireno-divinilbenceno (PSDVB o SDB). Las características de las resinas dependen de la naturaleza del monómero que forma el polímero. Generalmente, las resinas son hidrófobas y no polares. Se puede modificar su polaridad por adición de grupos funcionales. Las resinas son menos sensibles al pH que la sílica.

2.3.1.2.- Propiedades físicas de los sorbentes

Los sorbentes para extracción en fase sólida están disponibles en un amplio rango de superficies químicas, tamaño de poro (60, 120, 300... Å°), tamaño de partícula (10, 40, 100... μm) y soportes (sílica, albúminas, polímeros...).

Las propiedades físicas que afectan a sus características son;

-. *Área superficial:* A mayor área superficial, mayor eficacia. En los sorbentes tradicionales suele ser de 250 a 600 m^2/gr . Este área viene determinada por el tamaño de la partícula y el tipo de relleno.

-. *Tamaño de poro:* En la mayoría es de 60 a 70 Å° . Como consecuencia se restringe el acceso a macromoléculas grandes y se limita su interacción con los sorbentes.

-. *Tamaño de partícula:* El tamaño medio suele ser de 50 μm . Cuanto menor sea el tamaño de la partícula más bajas serán las recuperaciones y se necesitará mayor cantidad de disolventes.

2.3.1.3.- Pasos en el proceso de SPE

La preparación típica de la muestra con SPE consiste, básicamente, en los siguientes pasos:

Tabla IV-1

OPERACION	OBJETIVO
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pretratamiento muestra 	→ Liberar de la matriz proteica
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acondicionamiento cartucho 	→ Equilibrado del sorbente
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapas de carga 	→ Concentración de compuestos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapas de limpieza 	→ Eliminación de interferencias
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapas de elución 	→ Separación de los compuestos de interés
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapas post-elución 	→ Evaporación y reconstitución

Una vez acondicionada la fase estacionaria contenida en el cartucho a fin de activarlo y estabilizarlo y después de depositar la muestra, se pueden seguir dos estrategias. Por una parte se puede lograr la retención de los analitos buscados mientras que las interferencias de la matriz pasan por el cartucho sin retenerse (ver **Figura IV-2**), o bien los compuestos interferentes pueden quedar retenidos mientras que el analito es eluido durante la carga de muestra o en el paso de lavado (ver **Figura IV-3**).

Figura IV-2

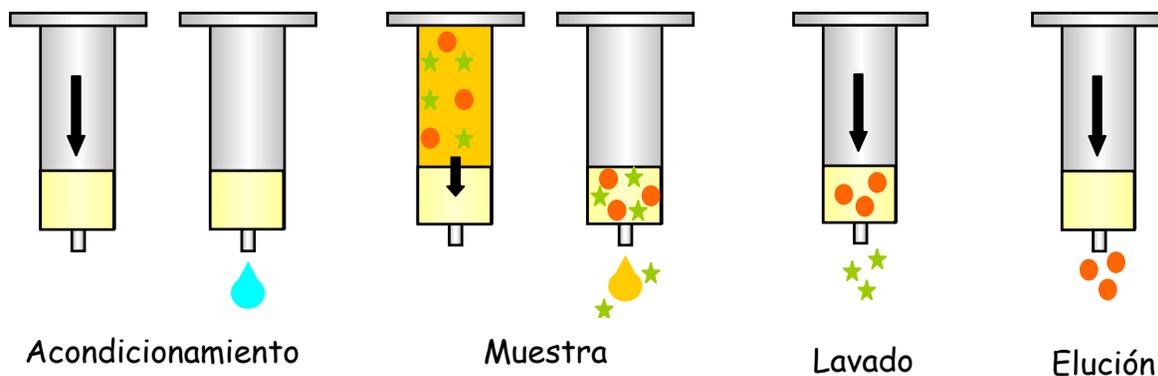
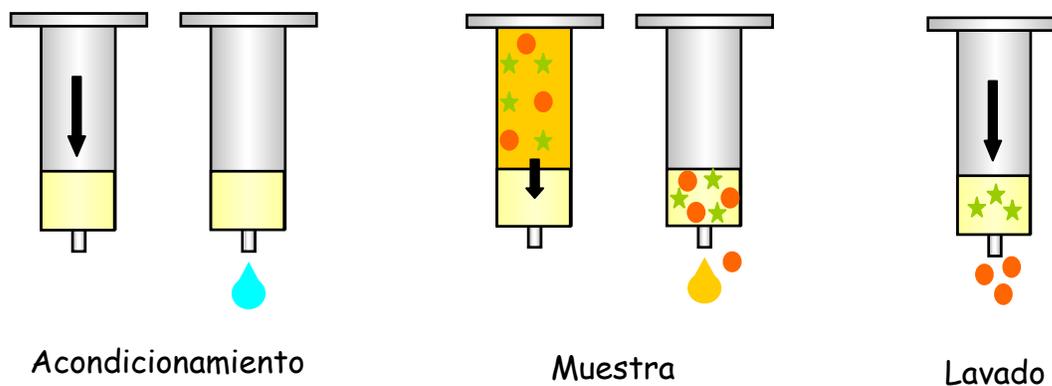


Figura IV-3



La segunda estrategia se selecciona normalmente cuando los componentes de interés están presentes en concentraciones elevadas. Cuando están en niveles bajos, o bien hay que aislar múltiples componentes de polaridades diversas, se utiliza la primera estrategia. Esta primera se utiliza también para enriquecimiento de trazas de compuestos en niveles extremadamente bajos y para concentración de muestras diluidas. Una matriz compleja puede tratarse con una combinación de las dos

estrategias para aislar los diferentes analitos. La primera estrategia es la más habitual, con una fase de elución de los analitos.

Con cualquiera de las estrategias se pueden utilizar tres modos cromatográficos distintos; *Fase normal*, *fase reversa* e *intercambio iónico*. La selección de la estrategia, modo, relleno y solventes de elución depende tanto de las características de la muestra como del objetivo de la separación. Las características fundamentales de cada modo cromatográfico se describen en la **Tabla IV-2**.

Tabla IV-2

	MODO CROMATOGRAFICO		
	FASE NORMAL	FASE REVERSA	INTERC. IONICO
Tipos de Relleno	Sílice, Florisil, Diol, NH ₂ , CN, Alúmina	C ₁₈ , C ₈ , tC ₂ , Diol, NH ₂ , CN,	NH ₂ , Accell Plus
Polaridad de Relleno	Alta	Baja	Alta
Rango de polaridades de disolventes	Baja a media	Alta a media	Alta
Solventes de carga de muestra	Hexano, Tolueno CH ₂ Cl ₂	H ₂ O, Tampones	H ₂ O, Tampones
Solvente de elución	Acetato de etilo Acetona, CH ₃ CN	H ₂ O/CH ₃ OH H ₂ O/CH ₃ CN	Tampones Sol. Salinas
Orden elución muestra	Primero componentes menos polares	Primero componentes más polares	Primero componentes menos ionizados
Solvente necesario para eluir	Aumentar polaridad del solvente	Disminuir polaridad del solvente	Aumentar fuerza iónica o cambiar pH

2.3.1.5.- Mecanismos de extracción

Los tres mecanismos más comunes usados en SPE son la fase reversa, la fase normal y el intercambio de iones.

2.3.1.5.1.- Fase reversa

Se usa, generalmente, para extractos hidrofóbicos o analitos orgánicos polares contenidos en una matriz o muestra acuosa. La fase reversa común contiene cadenas hidrocarbonadas y las uniones son de tipo Van der Waals. Por lo tanto, son rellenos apolares.

Los más comunes son rellenos con grupos funcionales C18, C8 o anillos aromáticos como fenil o SDB, ligados covalentemente a la superficie de la sílica. Es un sorbente no específico que puede retener bastantes tipos de compuestos orgánicos. Es importante optimizar las condiciones de extracción, especialmente los lavados. Los analitos son eluidos normalmente con solventes orgánicos tales como MeOH o acetonitrilo, en combinación con agua, ácidos, bases y otros solventes y modificadores orgánicos.

2.3.1.5.1.1.- Características de los cartuchos C18

- Se introdujeron en el mercado hace más de 15 años y es uno de los productos más referenciados como relleno para extracción en fase sólida.

- Tienen una cadena hidrocarbonada de 18 carbonos unida a la sílica y su estructura es:



- Las interacciones son de tipo no polar.

- Es el más hidrofóbico dentro de los cartuchos de tipo no polar y el más popular.

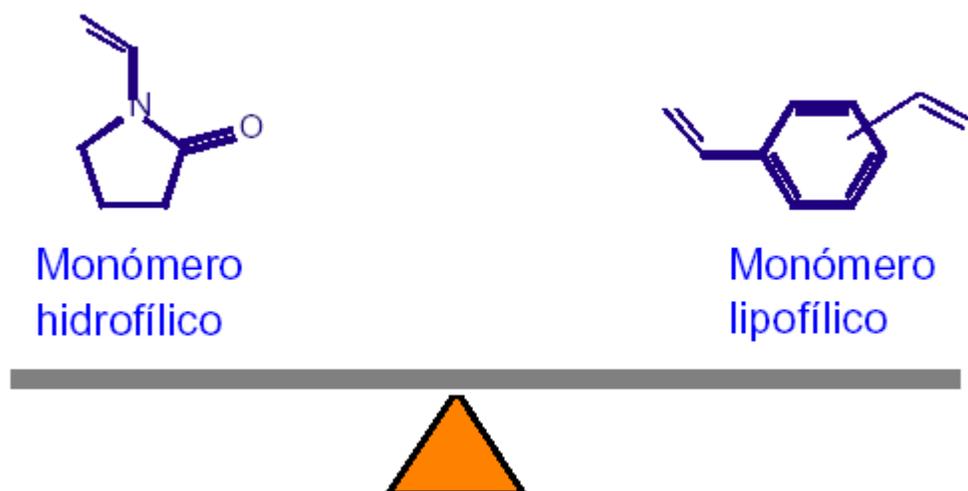
-Es un sorbente de baja selectividad, por lo tanto los extractos eluidos son generalmente poco puros y pueden presentar interferencias no deseadas.

- Las sales no se retienen en este tipo de cartuchos.

La extracción por sílice (C18) es la más usada corrientemente, como se puede observar en los artículos aparecidos en la bibliografía sobre la purificación de corticosteroides por SPE (Bean et al 1997; Calvarese et al 1994; Courtheyn et al 1994; Diamandis et al 1988; Furuta et al 1998; Minagawa et al 1985; Negriolli 1998; Rizea Savu et al 1996; Santos Montes et al 1994; Yergey et al 1995; Marcos et al, 1989).

2.3.1.5.1.2.- Características de los cartuchos OASIS

Los cartuchos OASIS se diferencian de los C18, en que están formados por un macro-copolímero (poli(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona)) con balance de tipo hidrofílico-lipofílico, mientras que los cartuchos C18 no tenían este carácter hidrofílico.



El monómero hidrofílico le proporciona:

- Afinidad a ambientes acuosos
- Propiedades humectantes
- Permite trabajar con el sorbente seco sin pérdida de recuperación y reproducibilidad.

El monómero lipofílico le proporciona:

- Afinidad a ambientes lipídicos.
- Propiedades de fase reversa para retención de analitos

Las dos principales características de este relleno de cartuchos OASIS HLB (marca registrada por Waters) son su posibilidad de mantenerse húmedo y la retención de un amplio rango de compuestos tanto polares como no polares, proporcionando altas y reproducibles recuperaciones para compuestos ácidos, básicos y neutros, incluso si el cartucho se seca.

Este tipo de cartuchos retienen más fuertemente los analitos ionizados que los rellenos de fase reversa de base sílice. No obstante, las recuperaciones pueden ser mejoradas si el analito está en una forma menos ionizada.

Pocos o ninguno son los estudios que se encuentran en la bibliografía en lo referente a la extracción de los corticosteroides con este tipo de relleno (Proceedings EU-Workshop (RIVM), Bilthoven, The Netherlands; Pharmaceutical Applications Notebook. WATERS OASIS).

2.3.1.5.2. - Fase normal

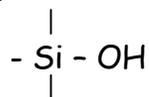
Son normalmente empleados para extractos de analitos polares con solventes orgánicos no polares. Los mecanismos de retención están basados en puentes de hidrógeno y uniones dipolo-dipolo entre los analitos polares y las fases estacionarias

polares (debido a los grupos hidroxilo que presentan) tales como sílica o alúmina. Existe un gran número de fases disponibles, entre las cuales destacan los tipos aminopropil (NH₂), cianopropil (CN), sílice (SiOH) o Diol, que permiten interacciones más o menos fuertes. La optimización de la separación consiste en escoger el tipo de fase adecuada, así como los solventes apropiados tanto para los lavados como para la elución. Los analitos pueden ser eluidos con el uso de concentraciones relativas bajas de solventes orgánicos polares tales como MeOH o isopropanol, en combinación con solventes orgánicos no polares.

2.3.1.5.2.1- Características de los cartuchos de sílica

- Los cartuchos de sílica son generalmente considerados como los sorbentes más polares disponibles.

- Su estructura es:



- Las interacciones son de tipo polar.

- Es uno de los mejores sorbentes para separar compuestos con estructura química similar.

- Nunca debe ser acondicionado con disolventes polares tales como el MeOH porque pueden darnos resultados poco reproducibles.

- Se usa para separar compuestos que presenten en su molécula grupos funcionales que contengan dipolos, y la mayoría de compuestos que contengan hetero-átomos así como también grupos con propiedades de resonancia como por ejemplo moléculas con anillos aromáticos.

La retención de los corticosteroides en los cartuchos con relleno de sílica se produce por una fuerte interacción entre los hidroxilos de la fase estacionaria y los

grupos hidroxilo y cetónidos que existe en las posiciones C11, C17, C20 y C21 de los corticosteroides, formando una estructura local muy polar (Antignac 2001).

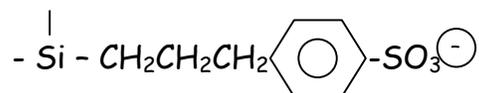
2.3.1.5.3.- Intercambio de iones

Se usa para extractos ionizados en muestras de baja fuerza iónica (orgánica o acuosa). Los sorbentes con carga positiva o negativa son usados para retener analitos de carga contraria. Así por ejemplo, analitos cargados positivamente que contienen aminas son retenidos con cargas negativas o intercambiadores catiónicos, tales como ácido sulfónico o ácido carboxílico. Por el contrario, analitos cargados negativamente son retenidos por cargas positivas o intercambiadores aniónicos conteniendo grupos amino. Sólo los compuestos cargados son retenidas en el cartucho, el resto de las matrices y contaminantes son eliminados durante la carga de muestra y los lavados. Por esta razón, se usa generalmente el intercambio catiónico para la extracción de compuestos básicos de las matrices biológicas. Los analitos son eluidos con sales con alta fuerza iónica, tampones y ácidos o bases fuertes.

2.3.1.5.3.1.- Características de los cartuchos Bond Elut Certify® (SCX)

- Consiste en un sorbente en el cual se combinan 2 ó más grupos funcionales, permitiendo así una múltiple retención de analitos. En este caso está formado por una cadena C8 y un fuerte intercambiador de cationes, el ácido bencenosulfónico.

Su estructura es:



- Muy efectivo en la extracción de un amplio rango de compuestos de matrices de tipo acuosas, orina, sangre, suero, etc.

- Los analitos se retienen fuertemente en el sorbente por mecanismos no polares por la presencia del anillo de benceno.

- Permite realizar lavados con disolventes con agua y MeOH, eliminando contaminantes tanto polares como no polares de las matrices.

- Los resultados obtenidos son; una buena limpieza, reproducibilidad y una buena recuperación.

Varios son los artículos que aparecen en la bibliografía en los que se utilizan este tipo de cartuchos para la extracción de medicamentos veterinarios (Lai et al, 1997) pero en ningún caso aparecen artículos sobre su uso en la extracción de los corticosteroides.

2.3.1.5.4.- Fase mixta

Existe otra opción que son los rellenos de fase mixta. Presentan diferentes mecanismos de acción sobre los analitos, pudiendo de esta forma extraer compuestos que tengan características químicas diferentes, tanto polares como apolares. Suelen combinar mecanismos de interacción hidrófobos con mecanismos de intercambio iónico.

En general, la especificidad del sorbente es altamente dependiente de la composición de la matriz y de los solventes en los que esté diluida, afectando así a la extracción.

2.3.1.6.- Elección del mecanismo de extracción

La elección de un mecanismo de extracción apropiado para una muestra, va a depender principalmente de tres factores interrelacionados;

- *Tipo de analito*; Hay que tener en cuenta los grupos funcionales de los analitos a analizar. Compuestos que contengan cadenas alquilo, anillos alicíclicos, anillos aromáticos u otros grupos funcionales con una significativa estructura hidrocarbonada, podrán ser retenidos probablemente con sorbentes no polares. En cambio, la presencia de grupos polares como grupos hidroxilo o aminas nos hace pensar en una retención en un sorbente de tipo polar. Otros factores que también tienen influencia en la retención de los analitos son la solubilidad y las características de ionización del mismo.

En el caso presente, los corticosteroides pueden formar interacciones hidrófobas a nivel del ciclo carbonado pregnano, y a nivel de los grupos polares hidroxilos y cetónidos de los carbonos 3, 11, 17, 20 y 21.

- *Tipo de matriz*; La matriz en la que se encuentran los analitos que deben ser extraídos condiciona y determina el tipo de extracción que debemos utilizar. Si la matriz es de tipo acuoso, por ejemplo orina, y los analitos buscados tienen grupos de tipo no polar o grupos con carga iónica podrán ser extraídos, generalmente, con sorbentes de tipo no polar o por intercambio de iones. Si se trata de matrices de tipo oleoso o un solvente de tipo no polar, los analitos con grupos polares podrán ser extraídos con sorbentes polares.

Un factor a tener en cuenta es que el tipo de disolvente que moviliza la muestra debe ser compatible con la fase estacionaria. La elección de los disolventes de lavado y de elución depende de una solución de compromiso entre el rendimiento de extracción y el grado de purificación, lo que se traduce al final en una solución de compromiso entre sensibilidad y especificidad. Se podría hablar más de una extracción que de una purificación.

- *Objetivo del análisis*; El solvente que se utilice en la elución de los cartuchos, deberá ser compatible con la técnica de detección que se vaya a usar. Así, por ejemplo, si la técnica seleccionada se trata de HPLC, la fase móvil podría, en algunos casos, ser utilizada como solvente de elución, mientras que si la técnica seleccionada es cromatografía de gases, la elución debería realizarse con solventes volátiles.

2.3.1.7.- Ventajas de la extracción en fase sólida (SPE) frente a la extracción líquido/líquido (LLE).

Desde la primera mitad de los años 70, cuando se comercializaron los SPE y fueron por primera vez introducidos en los laboratorios, los analistas han sustituido la LLE por la SPE por la simple razón de que mejoran los resultados con menores complicaciones.

Los beneficios que proporciona la SPE frente a la LLE son los siguientes:

- Mejora la selectividad y especificidad.
- Aumentan las recuperaciones.
- Intensifica la eliminación de interferencias.
- Aumenta la reproducibilidad.
- Reduce el trabajo, su uso es fácil, existe la posibilidad de automatización y esto nos permite analizar múltiples muestras a la vez.
- Aumenta la flexibilidad en términos de miscibilidad de solventes.
- Elimina emulsiones.
- Disminuye el consumo de solventes.

- . Reduce la exposición del personal del laboratorio a solventes tóxicos e inflamables.

- . Concentra los analitos buscados y como consecuencia aumenta la sensibilidad y disminuye el límite de detección y el límite de cuantificación y se alarga la vida de las columnas.

VI.3.- METODOS DE DETECCIÓN

Ya en tiempo de Aristóteles se utilizaban los efectos adsorptivos de distintas tierras para tratar el agua de mar. La paternidad y la denominación de las separaciones "cromatográficas" corresponde al botánico ruso Michail T. Tsweet quien en un congreso en 1903, descubrió por primera vez la separación de colorantes de plantas. Es conocido como el Padre de la Cromatografía.

Pasaron aproximadamente 30 años hasta que fue reconocida la utilidad de la cromatografía de adsorción como técnica analítica por R. Khun y colaboradores, en 1931. Pocos años más tarde, unos investigadores rusos trasladaron el principio a capas delgadas de adsorbentes. Stahl (Stahl., 1969) y Kirchner (Kirchner., 1978) desarrollaron a partir de aquí la cromatografía de capa fina, estandarizando los procedimientos, equipos, adsorbentes, y dando auge a esta técnica simple, a bajo costo y eficiente.

A principios de los años setenta parecía que los rápidos avances en la cromatografía líquida de columna y especialmente en HPLC podían desplazar a la cromatografía de capa fina, Posteriormente han ido apareciendo otras técnicas de detección con instrumental más sofisticado pero que hacen que el análisis sea más sencillo, sensible y específico, como por ejemplo son la cromatografía de gases con

distintos detectores (de captura de electrones, de llama, de masas, etc), o la cromatografía líquida con detector de masas, o masasⁿ (Bauer et al., 1992).

Algunos de estos métodos cromatográficos son adecuados para el análisis de corticosteroides a los niveles deseados, pero son costosos y requieren un tiempo de análisis largo. Habrá que establecer los más adecuados en función de las necesidades de cada laboratorio.

VI.3.A- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ALTO RENDIMIENTO: HPTLC

3.A.1.- INTRODUCCION

La técnica de HPTLC fue aplicada con éxito en varios laboratorios de rutina involucrados en el control de residuos de hormonas (Smets., 1994).

Algunos métodos cromatográficos adecuados para el análisis de corticosteroides (HPLC, GC-MS, LC-MS) son costosos y requieren un tiempo de análisis largo cuando se trata de un número elevado de muestras. Por esta razón, es deseable contar con un método de screening de amplio espectro, rápido y sensible que pueda ser utilizado para el análisis, al tiempo, de un número considerable de muestras. Dentro de las limitaciones de esta técnica, se cree que podemos mostrar al HPTLC como una viable alternativa al HPLC (Courtheyn et al., 1993a). La rapidez con que se pueden recoger los resultados, la economía de reactivos y solventes y la ventaja de un soporte nuevo en cada lote de análisis, hace de esta técnica una poderosa herramienta analítica para la detección de nuevos productos administrados ilegalmente. Este método está recomendado para laboratorios de control donde la economía y el tiempo son esenciales.

A pesar de que algunos autores han desarrollado métodos de detección de corticosteroides en HPTLC, pocos son los datos disponibles en la literatura sobre el análisis multiscreening de los corticosteroides.

Los factores que influyen para que se realice una buena separación son la fase estacionaria y la fase móvil elegidas. Las características tanto de las fases estacionarias polares como de las no polares por las que se rige este tipo de cromatografía son similares a las comentadas en el apartado VI.2, 3.1.5 para cartuchos de extracción en fase sólida. Los sorbentes de mayor significación práctica son el gel de sílice, el gel de sílice modificado, el óxido de aluminio y la celulosa. Cerca de un 90% de las separaciones se realizan sobre gel de sílice, un polvo poroso y amorfo que contiene en su superficie grupos Si-OH que pueden formar enlaces por puente de hidrógeno entre ellos o con sustancias polares. Existen también geles de sílice con grupos funcionales quirales, que permiten separar sustancias ópticamente activas (Bauer et al., 1992). Al cambiar de una fase estacionaria normal a una fase reversa se invierte el orden de elución de las sustancias.

Además del sorbente, la elección del eluyente también influye decisivamente en la separación. El eluyente disuelve del sorbente las sustancias a separar, haciéndolas avanzar a lo largo de la fase estacionaria. Su avance depende de si la sustancia tiene mayor afinidad por el eluyente o por el sorbente.

Otros factores a tener en cuenta son; saturación de la cubeta, humedad relativa, variaciones de temperatura ambiente, tamaño de grano de las partículas en la fase estacionaria, etc. (Bauer et al., 1992).

3.A.2.- DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE HPTLC

3.A.2.1.- Preparación de la muestra y aplicación de la misma

En general, las muestras deben ser sometidas a algún tipo de preparación para poder ser analizadas mediante esta técnica. En algunos casos, se les somete a una extracción con distintos solventes (Kajal et al., 1994) o incluso a una extracción en fase sólida (Courtheyn et al., 1993b). El uso de un sistema de HPLC anterior al HPTLC, puede incrementar la especificidad de la técnica y diferenciar entre algunos productos que podrían dar como resultado un falso positivo (Smets F., 1994; Courtheyn et al., 1993b).

En general, cuando se trata de un líquido como de un polvo, a las muestras se les adiciona algún disolvente, generalmente MeOH (Kajal et al., 1993). Se agitan bien y después, si es necesario, se les somete a una centrifugación.

Si se trata de sitios de inyección, son cortados en piezas y sometidos a una extracción con algún solvente, generalmente MeOH (Deaseleire E. et al, 1994; Vanoosthuyze K.E. et al, 1996; Smets et al, 1991) y a una centrifugación posterior.

Si se trata de implantes, se pueden encontrar restos del producto en forma de pastillas semidisueltas, las cuales, después de su extracción de la zona implantada, se pondrán en un tubo y se realizará una extracción con algún disolvente, agitando y centrifugando posteriormente.

Sobre una línea de partida en la fase estacionaria, se aplican las sustancias disueltas ayudándose de una jeringa o con capilares. La aplicación puede hacerse puntualmente o en forma de banda y la elección del disolvente de la muestra es determinante. La muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, efectos inductivos, etc). El mejor procedimiento es el uso de equipos

de aplicación automatizados (Camag Linomat IV), muy importante, sobre todo, en análisis cuantitativos, ya que el origen donde se aplica la muestra es homogéneo al igual que el volumen aplicado.

3.A.2.2.- Desarrollo de la placa

En cromatografía de capa fina se entiende por desarrollo que el eluyente de la mezcla penetra en la capa y en su avance transporta las sustancias aplicadas en la dirección del flujo. A causa de las interacciones entre muestra, fase móvil y fase estacionaria, las sustancias se separan en sus componentes individuales.

Para desarrollar los procesos cromatográficos, se requiere disponer de cámaras cromatográficas o "tanques" debiendo estimarse el tamaño y la forma por el tipo de placa a utilizar y también el tipo de cromatografía, permitiendo así el desarrollo simultáneo de varias placas.

La técnica de elución más utilizada es el método creciente lineal, aunque existen autores que describen un método bidimensional lineal (Courtheyn et al., 1993b), sobre todo cuando se trata de muestras de piensos y premezclas. La característica particular de este sistema de elución es la posibilidad de emplear en el segundo recorrido un principio o mecanismo de separación distinto al del primer desarrollo.

Se debe buscar un sistema óptimo para la separación de los corticosteroides mediante la combinación de diferentes disolventes. Con el uso de mezclas de solventes hay diferencias en la selectividad, produciendo distintas separaciones. Varios autores han realizado estudios para averiguar cuál es el solvente ideal o la mezcla de solventes adecuada y en qué proporciones (Klaus et al., 1994; Vanoosthuyze et al., 1993; Huetos et al., 1998; Hoebus et al., 1993; Smets et al., 1991; Courtheyn et al., 1993; Kajal et al., 1994). Es difícil definir el solvente ideal. En el caso del

método de elución bidimensional la elección de disolventes se complica. La optimización de solventes se realiza basándose en la selectividad del triángulo de Snyder (Rozylo et al, 1998). Clasifica los solventes en 8 grupos dependiendo de su capacidad como aceptor de protones, donador de protones y un fuerte interactor dipolar. La mayoría de los autores consideran la mezcla de MeOH y cloroformo como la óptima para la separación de los corticosteroides (Szepesi et al., 1991; Windhorst et al., 1990) evaluando en sus trabajos cual es el ratio entre ambos que mejor separa estos compuestos.

3.A.2.3.- Detección

Después del desarrollo, se detectan las sustancias separadas. Esto es muy sencillo en caso de compuestos coloreados o de sustancias que pueden hacerse fluorecer o que absorben radiación UV. Cuando las sustancias no cumplen estas propiedades, deben de derivatizarse con reactivos para formar sustancias coloreadas fluorescentes o absorbentes en la luz UV.

-. Detección mediante radiación UV: Se hace indispensable disponer de una lámpara UV, ya que de esta manera se puede visualizar las manchas ya sea por contraste con el fondo de una placa con indicador de fluorescencia como por la propia fluorescencia de los compuestos separados. Es un procedimiento rápido y sencillo para detectar los compuestos separados. Existen lámparas UV que emiten radiación de longitud de onda de 240 nm y/o 366 nm. La detección se realiza en habitaciones oscuras o en cubetas con lámpara UV integrada. Son varios los autores que ofrecen métodos de detección por UV (Fenske, 1997; Fenske, 1995; Vanoosthuyze et al, 1993)

Las sustancias cuya propia fluorescencia puede excitarse por radiación UV se detectan preferentemente sobre capas sin indicador fluorescente. Se hacen visibles bajo radiación UV como zonas luminosas coloreadas y brillantes sobre fondo oscuro.

- Detección por derivatización: Las reacciones de derivatización se utilizan cuando las reacciones individuales no reaccionan a la radiación UV o cuando la sensibilidad de la detección es insuficiente. La derivatización postcromatográfica sirve, sobre todo, para aumentar la sensibilidad de la detección. Usualmente los reactivos de detección se pulverizan sobre la placa mediante atomizadores adecuados o por inmersión de la placa en la sustancia derivatizante (Fenske, 1995).

Existen una serie de soluciones reactivas que son evaluadas para determinar la selectividad, sensibilidad y especificidad de los métodos. Entre las soluciones estudiadas están una solución de azul de tetrazol, que lo que produce es una oxidación del grupo α -ceto del carbono 17 de la cadena de los corticosteroides (Kajal et al, 1994; Courtheyn et al, 1992, Courtheyn et al, 1993b; Graham et al, 1978), una solución formada por oxiclورو de circonio octahidrato, ácido alizarín sulfónico e hidróxido sódico, una solución de ácido sulfúrico 95-97% en MeOH o en etanol utilizando una placa con indicador de fluorescencia (F₂₄₅) (Smets et al, 1991; Vanoosthuyze et al, 1993) y una solución formada por 2,4-dihidroxibenzaldehido, ácido acético glacial y ácido sulfúrico 95-97% (Vanoosthuyze et al, 1993; Huetos et al, 1999). El cortisol y la cortisona también se hacen fluorescentes por dansilhidracina (Funk et al, 1994) o ácido sulfúrico (Jork et al, 1994).

A menudo los cromatogramas deben ser sometidos a una fuente de calor (estufa), para activar la reacción o para ser transformados en derivados fluorescentes por activación del secado térmico (Fenske, 1997; Fenske, 1995; Klaus et al, 1994; Hoebus et al, 1993).

Evaluación densitométrica de los cromatogramas: En este caso, se utiliza un densitómetro de barrido, que puede transferir, en poco minutos, la densitometría de la placa al software para su integración, localización de las posibles manchas de interés y su posible identidad, a través de un espectro registrado sobre la misma placa a las sustancias de referencia (Kajal et al, 1993; Kajal et al, 1994; Taylor et al, 1993). Por ejemplo, por densitometría podrían hacerse valoraciones cuantitativas, como por ejemplo de betametasona valerato (Indrayanto et al, 1997), aunque ese no es el objetivo buscado con una técnica de screening,

3.A.2.4. - Identificación

Tras finalizar un cromatograma en capa fina, deben de evaluarse los resultados. Existe una gran variedad de métodos adecuados a cada tipo de problemática (evaluación cualitativa, semicuantitativa, cuantitativa).

La primera información que proporciona un cromatograma terminado, es el comportamiento de elución de las sustancias separadas.

Se expresa mediante el parámetro Rf (en inglés, relate to from);

$$R_f = \frac{\text{Distancia entre el punto de partida y la mancha de la sustancia}}{\text{Distancia entre el punto de partida y el frente del eluyente}}$$

Con fines de identificación es necesario relacionar los Rfs de los compuestos analizados con los de las sustancias patrón. La medida de la posición de la mancha de la sustancia se toma en su punto más intenso (generalmente en el centro).

La eficacia de la separación del sistema se manifiesta en el ensanchamiento que experimenta la mancha aplicada de la sustancia a lo largo del recorrido cromatográfico.

3.A.3.- CRITERIOS DE VALIDACIÓN

Los dos criterios más importantes discutidos son, primeramente, que el valor o valores R_f de la sustancia analizada deben concordar con el valor o valores R_f típicos de la sustancia patrón (una variación del $\pm 3\%$ es aceptada) y también que la apariencia visual del analito sea indistinguible del que se usa como material de referencia (Decisión 93/256/CEE; Smets et al, 1994).

VI.3.B.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION; HPLC

3.B.1.- INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado anteriormente, fue a principios de los años 70 cuando la cromatografía líquida adquiere su mayor auge. El avance posterior en fabricación de columnas, rellenos y detectores en continuo, permitió el nacimiento de la cromatografía líquida de alta presión después denominada de alta resolución (HPLC: *High-performance liquid chromatography*).

3.B.2.- CLASIFICACION DE LOS PROCESOS CROMATOGRAFICOS EN HPLC

El proceso cromatográfico se considera un conjunto de fuerzas que compiten de manera selectiva por un compuesto (analito o soluto) para, por una parte, fijarlo al relleno de la columna o fase estacionaria, o llevarlo disuelto en los líquidos que fluyen a través de la columna o fase móvil. Los distintos tipos de fuerzas entre fase

estacionaria y solutos definen los distintos tipos de cromatografía, cuyas bases químicas son las mismas que las que rigen la extracción en fase sólida con cartuchos. Se pueden, por tanto, clasificar en;

3.B.2.1.- Procesos de fase normal

Históricamente fue la primera que se desarrolló, utilizándose fases estacionarias polares (sílice, alúmina, hidroxiapatito) y fases móviles apolares (ciclohexano, isooctano, tetracloruro de carbono, etc), aplicándose a la separación de solutos apolares. El origen de la retención es, por tanto, la interacción de los grupos polares de los analitos con los grupos polares de la superficie de relleno. La sílice es el material más utilizado. Los grupos -OH de su superficie son los responsables de la interacción entre la parte polar del analito y la fase estacionaria. Esta interacción compite con la interacción de la fase móvil con los grupos funcionales de la sílice.

Este tipo de proceso es especialmente útil para compuestos de polaridad intermedia, aunque es limitado a compuestos solubles en disolventes apolares. Otro inconveniente es que el uso de agua puede afectar a este tipo de cromatografía.

No son muchos los estudios encontrados en la bibliografía para el análisis de corticosteroides por este tipo de proceso (Simova et al, 1996; Treiber, 1995; Huetos et al, 1999; Döppenschmitt et al, 1995).

3.B.2.2.- Procesos de fase reversa

Reúne condiciones opuestas a las de la fase normal, fase móvil polar y fase estacionaria apolar, generalmente enlazadas a partículas inertes de sílice. Es la cromatografía más utilizada, pues las fases móviles polares permiten cromatografiar

una amplia variedad de compuestos de interés bioquímico, farmacológico o químico. Más del 90% de las aplicaciones de compuestos de bajo peso molecular se hacen en fase reversa. La retención está basada es una atracción primaria entre la fase estacionaria y la región no polar del analito. El orden de elución es de hidrofílico a hidrofóbico, de polar a no polar. La fase estacionaria más común es C18 y las fases móviles más comunes son acetonitrilo, MeOH, tetrahidrofurano, etc, con agua como componente de la fase móvil.

La mayoría de los estudios realizados en HPLC con corticosteroides han utilizado esta técnica (Santos Montes et al, 1994; Hariharan et al, 1992; Lai et al, 1997; Santos Montes et al, 1993; Jusko et al, 1994).

3.B.2.3.- Procesos de intercambio iónico

La fase móvil compite con la estacionaria por los solutos mediante fuerzas iónicas. Al pasar una fase móvil iónica, la variación de la fuerza iónica permite eluir el soluto de la columna. La limitación es que el soluto sea iónico (un anión o un catión). Los compuestos ionizados se separan como especies ionizadas en solución por intercambio selectivo en los puntos activos del relleno. Existen intercambiadores aniónicos (atraen aniones) y catiónicos (atraen cationes). Se precisan fases móviles tamponadas que proporcionan contraiones, control del pH y de la fuerza iónica del medio. Se trata de una técnica muy útil para cromatografiar iones inorgánicos.

2.4.- PROCESOS DE PAR IÓNICO

Con algunos solutos iónicos, al pasar una fase móvil polar que contiene un contraión de carga contraria a la de los solutos, entre ambos se forma un par iónico de menor fuerza iónica, por lo que se podría estar en condiciones de

cromatografarlo. Se añade a la fase móvil un catión o anión hidrofóbico, que interacciona con el analito formando un par iónico, susceptible a ser retenido en columnas de fase reversa. Funciona bien para ácidos débiles y bases débiles.

3.B.3.- COMPONENTES DE UN EQUIPO DE HPLC

Todo cromatógrafo de HPLC dispone de, al menos, cinco módulos:

- .- *Bomba o sistema de bombeo de la fase móvil*; En ocasiones es conveniente disponer de bombas capaces de proporcionar gradientes, especialmente para resolver mezclas de componentes de polaridades diferentes.
- .- *Inyector (manual o automático)*; Incorpora la muestra a la fase móvil.
- .- *Tubos de conexión*; Los tubos han de ser del menor diámetro interno posible para evitar la difusión de los solutos y el ensanchamiento de los picos
- .- *Columna*; Es la parte más importante del sistema cromatográfico. Existe la posibilidad del uso de *precolumnas cromatográficas*, cuyo uso atenúa los pulsos de la bomba, satura la fase móvil en fase estacionaria antes de que llegue a la columna y alargan la vida de las columnas.
- .- *Detector*; Junto con la columna es una de las partes más importantes del equipo instrumental. Deben ser universales, selectivos, específicos y precisos. Se pueden clasificar por su fundamento instrumental en: ópticos (UV-VIS, diode-array, fluorimétricos, refractómetros, polarímetros...), eléctricos (electroquímicos, conductímetros), de técnicas acopladas (espectrometría de masas, quimioluminiscencia...).
- .- *Sistema de visualización de resultados*.

Hay otros módulos complementarios a veces necesarios para la aplicación: Horno de columnas, un segundo detector, colector de fracciones, etc, y también una serie

de pequeños accesorios como soportes del inyector y de columnas, reservorios o botellas especiales para la fase móvil, restrictores de presión, filtros intermedios, etc.

3.B.4.- DESARROLLO DE UNA TECNICA DE HPLC PARA LA DETECCION DE LOS CORTICOSTEROIDES

Muchas son las combinaciones posibles a la hora de desarrollar un método de detección para corticosteroides por HPLC. La fase estacionaria tiene un papel fundamental en el desarrollo de un método ya que uno de los principales objetivos en la cromatografía de los corticosteroides es separar adecuadamente dexametasona y betametasona. Estos dos corticosteroides difieren únicamente en la configuración del grupo metilo presente en el carbono C16 estando en la dexametasona en posición α mientras que en la betametasona está en posición β , por lo que son difícilmente separables con una resolución adecuada. Es primordial obtener esta separación ya que con LC-UV los espectros son idénticos y por LC-MS ambos compuestos producen los mismos fragmentos. Por tanto, sólo el tiempo de retención puede ser utilizado a la hora de su identificación con cualquiera de estos procedimientos de detección.

Varios son los artículos que se pueden encontrar en la bibliografía en lo referente al análisis de los corticosteroides por HPLC. Algunos de ellos utilizan HPLC con columnas de fase normal (Minagawa et al, 1995; Courtheyn et al, 1993; Simova et al, 1996; Treiber 1995; Döppenschmitt et al, 1995) y otros, la mayoría, en fase reversa (Courtheyn et al, 1994; Houghton et al, 1982; Gonzalo et al, 1997; Delahaut et al, 1993; Lai et al, 1997; Santos Montes et al, 1993; Lensmeyer et al, 1995; Violín, 1995; Hirai et al, 1997), y en algunos casos se asocian a columnas de inmutofinidad (Bagnati et al, 1996a; Bagnati et al, 1996b; Stouten et al, 1996; Groot et al, 1996;

Iglesias et al, 2000) o usan precolumnas (Shearan et al, 1990; Neufeld et al, 1998; Valenta et al, 1994). A su vez, varios son los artículos en los que se utilizan detectores de diodo-array (DAD) (Courtheyn et al, 1993; Anderson et al, 1990; Valvo et al, 1994) y en otros casos fluorescencia (Neufeld et al, 1998; Inove et al, 1994) o detectores de UV-visible (Anneli et al, 1977; Kessler 1982; Hay et al, 1997; Shearan et al, 1990; Wade et al, 1991; Schilt et al, 2000), aunque últimamente la tendencia es a utilizar acoplados al HPLC detectores de masas o masasⁿ (Shibasaki et al, 1997; Rizea et al, 1996; Fiori et al, 1998; Marwah et al, 2001; Vanoosthuyze et al, 1996; Volmer et al, 1997).

V.3.C.- CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASAS: GC-MS

3.C.1.- INTRODUCCION

En los últimos años ha aumentado mucho el uso de métodos físicos de detección para el aislamiento e identificación de ciertas especies orgánicas e inorgánicas existentes en una mezcla. Los primeros en usar gases como fase móvil en la separación cromatográfica fueron James y Martin en 1952 para ácidos grasos cortos. Actualmente la cromatografía de gases es una de las técnicas más utilizadas para compuestos volátiles en la detección de residuos de medicamentos veterinarios, sobre todo, si están acoplados a un detector de masas, ya que los límites de detección para algunas sustancias son realmente bajos. Existe la posibilidad de acoplar otro tipo de detectores como por ejemplo el detector de captura electrónica, para sustancias halogenadas.

3.C.2.- CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases proporciona una forma rápida y sencilla de determinar el número de componentes de una mezcla, la presencia de impurezas en una sustancia y en muchos casos, la 1ª evidencia de la identificación de un compuesto. Cuando se realiza un análisis por GC, se busca el modo de trabajo que permita una buena resolución, una alta sensibilidad y si puede ser, un corto tiempo de análisis.

El principio común está basado en un fluido o fase móvil, en este caso un gas, que circula a través de una fase estacionaria (sólido o líquido). Cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema, se producen una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de magnitud diferente para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con distinta velocidad a lo largo del sistema. La espectrometría de masas, es, sin duda alguna, la técnica analítica instrumental más completa que existe hoy en día. Entre las cualidades que justifican esta afirmación, podemos citar, su capacidad de identificación, puede analizar muestras complejas, posee una gran sensibilidad, es universal y específica, proporciona una información estructural e isotópica de la molécula, y es una técnica relativamente rápida.

3.C.3.- INSTRUMENTACION

Un cromatógrafo de gases está compuesto esencialmente por:

.- *Fuente de gas portador*, Proporciona la fase móvil (gas). Los gases que más se utilizan son el helio (usado en detectores de masas y de ionización de llama), y el nitrógeno (en detectores de ionización de llama), y en menor proporción el hidrógeno (en detectores de conductividad térmica) ya que es inflamable, o el argón y el metano

(en detectores de captura electrónica) dependiendo, en muchos casos, del detector empleado.

.- *Portal de inyección*; Permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Es donde se volatiliza la muestra. Como consecuencia, su temperatura se debe seleccionar de modo que la volatilización de la muestra sea completa para no tener pérdidas, a T° superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra.

Existen distintas formas de introducir la muestra en el inyector y son:

Inyección en Split: Al introducir la muestra se vaporiza en el inyector, generalmente en una proporción (5:1). Se usa para el análisis de componentes mayoritarios en la industria petroquímica, alimentación, aromas, aceites esenciales, etc.

Inyección en Splitless: En este caso se introduce toda la muestra en el inyector. Generalmente se utiliza cuando es necesaria una sensibilidad de ppm o de ppb. Se utiliza principalmente en el análisis de trazas, aromas, contaminación ambiental, etc.

Inyección On Column: En este caso la muestra se coloca directamente en la columna, de esta forma se elimina la descomposición de los compuestos lábiles. Se utiliza para compuestos de baja volatilidad y compuestos lábiles térmicamente, sobre todo se usa en la industria petroquímica y contaminación ambiental.

.- *Columna*; Son fundamentalmente derivados de las siliconas (OV), derivados de polietilenglicoles (carbowax), poliésteres de succinato de dietilenglicol (DEGS), y se pueden clasificar en muy polares, polares, intermedias, baja polaridad, no polares. Las características que debe de reunir son:

- .- Elevada superficie por unidad de volumen.
- .- Estabilidad térmica.

- .- Dureza mecánica.
- .- Inactividad química o de absorción.
- .- Baja resistencia al paso de un gas.
- .- Una estructura porosa con uniformidad de diámetro de poro.

.- Detector; Es uno de los elementos más importantes, siendo muy variados por sus características, diseños y funciones. Las propiedades que debe cumplir un detector son: selectividad, universalidad, bajo ruido de fondo, estabilidad. Sensibilidad y linealidad.

Los principales tipos de detectores son; detector de conductividad térmica (TCD), detector de ionización de llama (FID), detector de nitrógeno-fósforo (N-P-FID), detector de captura electrónica (ECD), y detector de masas.

3.C.4.- GC-MS

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de muestras muy complejas. La separación por cromatografía de gases se realizará mediante columnas capilares. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de la muestra, el único dato del que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. El tiempo de retención cromatográfica del analito y el del patrón debe tener un margen de tolerancia de $\pm 0.5\%$ (Decisión 2002/657/CE). Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras complejas con número elevado de componentes. Por su parte, la espectrometría de masas puede identificar de modo casi inequívoco cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla. Parece evidente,

según lo expuesto, que la asociación de las dos técnicas, GC y MS, podría dar lugar a una técnica combinada que permitiría la separación e identificación de mezclas complejas. El acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un detector de masas tiene la facultad de poder detectar niveles de subnanogramos, de cualquier compuesto que pueda ser cromatografiado. Este acoplamiento sirve para confirmación e identificación de residuos de productos orgánicos y compuestos nuevos. Se puede obtener información estructural para cada uno de los componentes de la mezcla origen.

El detector de masas, además de proporcionarnos los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o TIC (Total Ion Current).

Existen dos tipos de ionización;

.- Impacto electrónico (EI: Electron Impact): Las moléculas de la muestra introducida se encuentran con una cortina de electrones procedentes de un filamento incandescente produciéndose un impacto. Tiene lugar es una interacción entre los electrones incidentes y el átomo bombardeado, sin que llegue a haber contacto real, dadas las dimensiones relativas de las partículas subatómicas y el propio átomo. Unos impactos serán más eficaces que otros, produciéndose en algunos casos la ionización sin exceso de energía, lo que conducirá a la formación de *iones moleculares* exclusivamente. En otros casos, y dependiendo de la eficacia del impacto, aparecerán iones con diferentes excesos de energía, lo que dará lugar a diferentes *iones fragmento*.

Para un compuesto dado, y siempre que se reproduzcan las condiciones de la ionización, especialmente la energía de los electrones, las proporciones relativas del

ión molecular y de los diferentes fragmentos producidos serán fijas, constituyendo el *patrón de fragmentación* de esa molécula, que queda reflejado en el *espectro de masas* obtenido, y que se puede considerar como la huella digital de la molécula analizada.

Cuando ya conocemos la sustancia que se está analizando, para obtener mayor sensibilidad, menor número de interferencias y mayor especificidad, se pueden seleccionar las masas buscadas para esa sustancia. Se habla entonces de *modo SIM*, en el cual sólo se buscan unas masas determinadas, mientras si lo que se busca es el espectro completo de masas se tratará de *modo SCAN* (debe haber un mínimo de cuatro iones con una intensidad relativa $\geq 10\%$ del pico base) (Decisión 2002/657/CE).

.- Ionización química (CI: Chemical Ionisation); La ionización química se realiza mediante la reacción de las moléculas neutras del analito con iones procedentes de la previa ionización, generalmente por impacto electrónico, de un gas reactivo (metano principalmente, isobutanol, amoniac).

Dado que el proceso de ionización química no comunica prácticamente exceso de energía, los iones moleculares formados son muy estables, por lo que la fragmentación será casi inexistente. Por ello a esta técnica de ionización también se le llama "técnica blanda". La ionización química positiva (CI+) es el caso más frecuente. Sin embargo, la formación de iones negativos puede ser también un proceso muy eficiente con una ausencia de fragmentación casi total.

Ha de utilizarse un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos. La confirmación de las sustancias en el grupo A del Anexo I de la Directiva 96/23/CE requiere un mínimo de 4 puntos de identificación. La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo B del Anexo I de la Directiva 96/23/CE requiere un mínimo de 3 puntos de identificación (ver Decisión 2002/657/CE).

3.C.4.1.- Procesos de derivatización

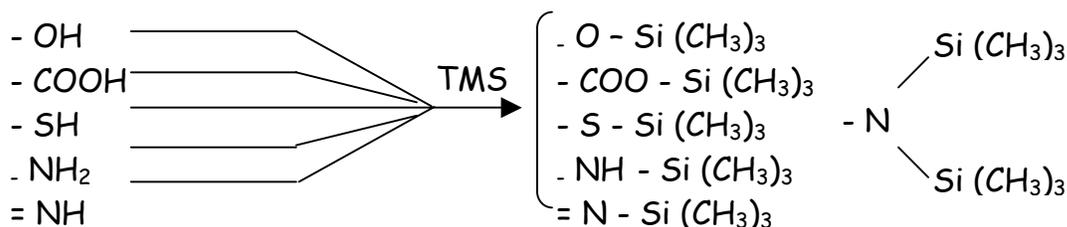
La derivatización a compuestos volátiles se ha introducido para aumentar el campo de aplicación de la cromatografía de gases a compuestos que de otra forma sería imposible analizar por esta técnica, como es el caso de aminoácidos, azúcares y compuestos relacionados. La presencia de diferentes grupos polares en las muestras es la principal dificultad para su análisis por cromatografía de gases y así tenemos que los grupos carboxilo, hidroxilo, carbonilo, tiol y amino por su polaridad y su tendencia a formar puentes de hidrógeno muestran una baja volatilidad y por esto y otros fenómenos (fuerte adsorción en el soporte de la fase estacionaria, picos asimétricos, inestabilidad química y térmica de los compuestos, etc) originan pérdidas de los compuestos de la muestra en el sistema cromatográfico, y se hace imposible su análisis sin una derivatización previa. Al realizar una derivatización se consigue:

- Posible reducción de formación de picos cromatográficos.
- Separación de dos compuestos estrechamente relacionados.
- Aumentar la sensibilidad del compuesto resultante para un determinado detector.

Es de importancia especial la combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (GC-MS), por la cual, se han desarrollado recientes derivados especiales que llevan a fragmentos característicos, que hacen posible su identificación y cuantificación posterior (Drozd, 1981).

Los derivados más frecuentes utilizados en la cromatografía de gases de compuestos no volátiles para bloquear sus grupos funcionales son *silil derivados*. Se pueden preparar trimetilsilil derivados por la reacción de estos agentes con los grupos que contienen hidrógeno activo. Los primeros que utilizaron estos reactivos

fueron McLaughin y Henion (McLaughin et al, 1990) para derivatizar seroalbúmina bovina y analizarlo por GC-MS-EI. Las reacciones que se producen son las siguientes:



Los derivatizantes pertenecientes a este grupo más utilizados son:

BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida): Se utiliza para la sililación y esterificación de grupos no excesivamente reactivos (-NH, -NH₂).

MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida): Muy similar al anterior, sólo que produce picos más simétricos y con tiempos de retención más cortos.

Piridina: Es otro solvente con una buena capacidad de solvatación (acetonitrilo, dimetilformamida...) y es uno de los reactivos más frecuentemente usados. En algunas fases pueden aparecer picos con algo de cola y solapamiento de los componentes más bajos.

El análisis directo de los esteroides libres por GC es difícil debido a su alto peso molecular y a la presencia de grupos polares. Utilizando derivados se mejora la simetría de los picos, lo que facilita la evaluación cuantitativa y también se aumenta la volatilidad y estabilidad de los compuestos, así como distinguir diferencias estéricas entre varios esteroides. Los sililderivados son muy utilizados, ya que así se pueden bloquear de una vez todos los grupos polares que pueda haber en la molécula. Para la sililación de grupos hidroxilo de esteroides puede ser utilizado cualquier agente

sililante y en algunos casos es posible utilizar un catalizador en la reacción, como es el trimetilclorosilano (TMCS) (Drozd, 1981).

3.C.5.- APLICACION AL ANALISIS DE RESIDUOS DE LOS CORTICOSTEROIDES.

Dada la gran variedad de detectores y columnas que pueden asociarse a la cromatografía de gases (GC), esta técnica se puede emplear en el análisis de numerosos residuos presentes en los alimentos: disolventes organoclorados en aceites y cafés descafeinados, pesticidas presentes en alimentos, fundamentalmente organoclorados, organofosforados, y carbamatos, restos de monómeros de polímeros empleados en envases de alimentos, aditivos de los materiales poliméricos que pueden migrar a los alimentos (ftalatos), contaminantes en agua (hidrocarburos aromáticos, PCPs), productos no permitidos añadidos a los alimentos, identificación de sustancias químicas (esteroles, ác. grasos), etc.

En cuanto a los corticosteroides, varios son los autores que utilizan este tipo de cromatografía para su análisis. Después de evaluar las posibilidades de detección de los corticosteroides con técnicas como son HPTLC o HPLC (con detectores que no sean de masas). Algunos autores observaron que presentaban numerosas interferencias y los límites requeridos para las distintas matrices no se conseguían. Por ello, varios de ellos evaluaron técnicas de cromatografía de gases asociadas principalmente a detectores de captura electrónica (ya que varios de los corticosteroides poseen grupos halógenos) (Huetos et al, 2003b) y de masas (Yap et al, 1992; Courtheyn et al, 1994; Huetos et al, 2003a;).

Dentro de las técnicas de GC-MS utilizadas para la detección de los corticosteroides encontradas en la bibliografía, todas ellas utilizan el modo de ionización química negativa (Courtheyn et al, 1994; Huetos et al, 2003a; Stanley et al,

1993; Delahaut et al, 1997; Bagnati et al, 1996b; Igbal et al, 2001) ya que por impacto electrónico no se obtuvieron resultados.

Para poder detectar los corticosteroides es necesario derivatizarlos. De las posibles derivatizaciones que se pueden realizar son varias las evaluadas. Algunos autores derivatizan los esteroides con trimetilsililderivados; algunos con MSTFA a 70°C durante 15 min. (Yap et al, 1992), o también con BSTFA durante 45 min. a 110°C (Ashok et al, 1989). Otros con PFBO (pentafluorobencilhidroxilamida) durante 6 horas a 60°C (Igbal et al, 2001). Otros autores han realizado estudios de derivatización con piridina o derivados de esta sustancia, como el clorocromato de piridina, como Courtheyn que derivativa con esta sustancia a 92°C durante 3 horas (Courtheyn et al, 1994; Delahaut et al, 1997; Vannosthuyze et al, 1996), aunque posteriormente acorta el tiempo de derivatización a 10 min. utilizando dicromato potásico en una reacción con agua-ácido sulfúrico (9/1) y añadiéndole posteriormente carbonato sódico y agua (Courtheyn et al, 1998). Con este tipo de derivatización es imposible derivatizar la triamcinolona y el acetónido de triamcinolona. Algunos autores (Koupai-Abyazani et al, 1995) estudiaron la derivatización de estas dos sustancias, que no pueden ser derivatizadas debido a la presencia de un grupo acetónido entre el C16 y C17 que lo hace resistente a la oxidación con piridina clorocromato.

También existen estudios de la derivatización con piridina a 80°C durante 120 min. (Stanley et al, 1993) Incluso otros autores han realizado estudios de mezclas de derivatizantes como por ejemplo la mezcla de piridina y BSTFA sometiendo a 100°C de temperatura durante 2 horas (Bagnati et al, 1996), o con MSTFA durante 15 min. a 70°C después de derivatizarlo previamente con piridina durante 30 min. a 60°C (Yap et al, 1992), o la que realiza Negriolli y colaboradores que combinan piridina con

DMF-DMA (N,N-dimetilformamida dimetil acetal) durante 3 horas a 80°C con una segunda derivatización con MSTFA/TMIS (1000/5) a 60°C durante 45 min. (Negriolli et al, 1996).

V.- MATERIAL

V.1.-REACTIVOS

- Acetato de etilo para análisis de trazas (Merck, Ref. 110972 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
- Acetato sódico anhidro (Panreac, Ref. 131633 o equivalente, Barcelona, España).
- Acetona (Merck, Ref. 100012 o equivalente, Darmstadt, Germany).
- Acetonitrilo grado HPLC (Lab Scan, Ref. C02C11X o equivalente, Dublin, Irlanda).
- Acido acético glacial para análisis (Panreac, Ref. 131008 o equivalente).
- Acido clorhídrico fumante 37% (Merck, Ref. 100317 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
- Acido sulfúrico 95-97% (Merck, Ref. 100731 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
- Agua destilada calidad Alpha Q. (Millipore, Milford, MA, USA).
- Acido alizarín sulfónico (Merck, Ref. 105229 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
- Azul de tetrazol para microscopía (Merck, Ref. 108103 o equivalente, Darmstadt, Germany).
- Benceno (Merck, Ref. 1783 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
- Cartuchos OASIS HDL (300 mg) (Waters, Ref. WAT094226, Milford, MA, USA).
- Cartuchos SepPak C18 (360 mg) (Waters, Ref. WAT051910 Milford, MA, USA).
- Cartuchos Sílica (Waters, Ref. WAT051900 Milford, MA, USA).
- Cartuchos Bond-Elut (300 mg) (Varian, Ref. 06203, Middleburg, The Netherlands).
- Cloroformo (Merck, Ref. 102445 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
- Columnas:
 - Symmetry C18 (4.6 x 150mm) 5 μ m (Waters, Ref. WAT045905, Milford, MA, USA).

-
- Symmetry Shield RP C8 (3.9 x 150mm) 5 μ m (Waters, Ref. WAT200658, Milford, MA, USA).
 - NovaPak C18 (4.6 x 250mm) 4 μ m (Waters, Ref. WAT86344, wat052840 Milford, MA, USA).
 - Novapak C18 (8 x 100mm) 4 μ m (Waters, Ref. WAT86344, Milford, MA, USA).
 - Synergi Max RP 80A C₁₂ (4.6 x 250mm) 4 μ m (Phenomenex, Ref.00G-4337-EO, Milford, MA, USA).
 - Synergi Max RP 80A C₁₂ (2.0 x 150mm) 4 μ m (Phenomenex, Ref.00F-4337-BO, Milford, MA, USA).
 - Lichrosorb Diol (4 x 125mm) 5 μ m (Hibar-Merck, Ref. 50499 o equivalente, Darmstadt, Germany).
 - Diclorometano (BDH, Ref. 103406N o equivalente, Inglaterra).
 - Dihidroxibenzaldehido (Fluka, Ref. 37511 o equivalente, Buchs, Switzerland).
 - Eter dietílico (Panreac, Ref. 13270 o equivalente).
 - Eter terc-butilmetílico (Merck, Ref. 101995 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - Filtros Millex 0.45 mm (Millipore, SLHV 025 NS).
 - Gas Helio 99.98% (Air Liquide, Madrid, España).
 - Gas Metano de alta pureza (Air Liquide, Madrid, España).
 - β -Glururonidasa/arylsulfatasa (Merck Ref.104114 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - n-Hexano para análisis de trazas (Merck Ref. 104371 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - Hidróxido sódico para análisis (Merck, Ref. 106469 o equivalente, Darmstadt, Germany).

-
- Isooctano para análisis de trazas (Merck, Ref. 15440 o equivalente, Darmstadt, Germany).
 - Isopropanol ó 2-Propanol (Merck, Ref. 101040 o equivalente, Darmstadt, Germany).
 - Metanol grado HPLC (Lab Scan, Ref. C17C11X o equivalente, Dublin, Irlanda).
 - Oxidloruro de Circonio octahidrato (Merck, Ref. 8917 o equivalente, Darmstadt, Germany).
 - Piridina clorocromato (SIGMA, Ref. P-3278, St.Louis, MO, USA).
 - Placas HPTLC Sílica Gel 60 (5x5) (Merck Ref. 105644 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - Placas HPTLC Sílica Gel 60 (10x10) (Merck Ref. 105631 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - Placas HPTLC Sílica Gel 60 (10x20) (Merck Ref. 105641 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - Placas HPTLC Sílica Gel 60 (10x20) con indicador de fluorescencia F₂₅₄ (Merck Ref. 105642 o equivalente, Darmstadt, Alemania).
 - Propanol-2 (Isopropanol), (Merck, Ref. 1010402500 o equivalente, Darmstadt, Germany).
 - Proteinasa de Bacillus Subtilis (Fluka, Ref. 82490 o equivalente, Buchs, Switzerland).
 - Tamiz molecular (Merck, Ref. 5704 o equivalente, Darmstadt, Germany).
 - Tolueno para analisis (Merck, Ref. 108325 o equivalente, Darmstadt, Alemania).

V.2.-APARATOS Y EQUIPOS

2.1.-APARATOS

Además de las instalaciones generales del laboratorio (campanas extractoras, instalaciones de gases, sistema de vacío, etc.), se utilizan los siguientes equipos y aparatos:

- Jeringa para aplicador automático Linomat IV (Camag, Berlín, Alemania).
- Jeringas de plástico (20 ml.) (Monojet, Millipore, Milford, MA, USA)
- Spray para reveladores con difluorometano como aerosol propelente (Fingilab, Barcelona, España).
- Lámpara de luz ultravioleta (Guido rayos, Madrid, España).
- Sistema de extracción por vacío para cartuchos de fase sólida Manifold (Millipore).
- Baño de ultrasonido con termostato para T^a entre 35-42 °C aproximadamente.
- Centrífuga para tubos de 10 ml. (modelo Herml.e Z200A, o equivalente, Wehingen, Alemania).
- Centrífuga para tubos de 50 ml. (modelo Macrotonic o equivalente, Selecta, Madrid, España).
- Agitatubos.
- Nevera.
- Concentrador de muestras con sistema de nitrógeno, (modelo Turbo-Vap IV, Zymark o equivalente, Hopkinton, MA, USA).
- Purificador de agua (modelo Alpha Q Millipore o equivalente).
- pH-metro con precisión de 0,01 unidades de pH.
- Congelador (con T^a de congelación mínima de -20°C).
- Estufa (con un rango de temperatura de 10°- 90°C aproximadamente) (Pacisa, Madrid, España).

- Homogeneizador (Braun 1,2,3 o equivalente).
- Balanza de precisión (modelo Mettler AE 200 o equivalente).

2.2.- EQUIPOS

- Aplicador automático Linomat IV (Camag, Muttentz, Switzerland).

Cromatógrafo de gases con detector de masas:

- Cromatógrafo de Gases (Modelo HP 6890N o equivalente, Hewlett Packard).
- Detector de captura electrónica (Modelo HP 5973N o equivalente, Hewlett Packard).
- Columna capilar de sílice fundida SPB-5 (5% difenil, 95% dimetilpolixilosano) (Supelco); longitud 30 m., diámetro 0.25 mm.
- Inyector automático (Modelo HP 7683 o equivalente, Hewlett Packard).

Cromatógrafo gases con detector de captura de electrones:

- Cromatógrafo de Gases (Modelo HP 5890 o equivalente, Hewlett Packard).
- Detector de captura electrónica (Modelo HP 19233-60570 o equivalente, Hewlett Packard).
- Columna capilar de sílice fundida SPB-5 (Supelco); longitud 30 m., diámetro 0.25 mm.

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución:

- Inyector automático modelo 717 (Waters, Milford, MA, USA).
- Detector Diodo Array modelo 990 (Waters, Milford, MA, USA).
- Bomba dispensadora de solventes modelo 600E (Waters, Milford, MA, USA).

2.3.- MATERIAL

- Pipetas Pasteur .

- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas de doble aforo de 1 y 2 ml.
- Microjeringas para inyección en un sistema de cromatografía de gases (GC).
- Viales topacios de 2 ml. con cápsula de aluminio.
- Viales de 2 ml. con tapón de plástico e inserto para inyección de muestras en GC-MS.
- Tubos de ensayo de vidrio de 1,5 cm de diámetro por 10 cm de longitud.
- Tubos de centrifuga de 50 ml. con tapón enroscable.
- Matraz topacio aforado de 25 y 50 ml.
- Frasco topacio de 25 y 50 ml., con tapa de rosca.
- Micropipeta electrónica graduada en un rango de 50-200 μL y de 100-5000 μL .

V.3.- PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

3.1.- PATRONES

Dexametasona (Sigma-Aldrich D-1756 o equivalente, Steinheim, Germany).

Metilprednisolona (Sigma-Aldrich M-0639 o equivalente, Steinheim, Germany).

Cortisona (Sigma-Aldrich C-2755 o equivalente, Steinheim, Germany).

Hidrocortisona (Sigma-Aldrich H-5885 o equivalente, Steinheim, Germany).

Flumetasona (Sigma-Aldrich C-2755 o equivalente, Steinheim, Germany).

Beclometasona (Sigma-Aldrich B-0385 o equivalente, Steinheim, Germany).

Triamcinolona (Sigma-Aldrich T-6376 o equivalente, Steinheim, Germany).

Betametasona (Sigma-Aldrich B-7005 o equivalente, Steinheim, Germany).

Prednisolona (Sigma-Aldrich P-6004 o equivalente, Steinheim, Germany).

Prednisona (Sigma-Aldrich P-6254 o equivalente, Steinheim, Germany).

Resto de corticosteroides: Donación de la Agencia Española del Medicamento.

3.2.- SOLUCIONES PATRÓN

- Soluciones Madre: Dexametasona (u otro corticosteroide) ($400 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$); Se pesan 20 mg. de dexametasona en un matraz aforado de 50 mg. y se lleva a volumen con MeOH. Estabilidad de, al menos, 1 año.
- Solucion Intermedia ($8 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$): Se transfiere 1 ml. de la solución madre a un matraz aforado de 50 ml. y se enrasa con MeOH. Estabilidad de, al menos, 1 mes.
- Solución de Trabajo: Se preparan soluciones de trabajo de $0.16 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de dexametasona u otro corticosteroide (transfiriendo 1 ml. de la solución intermedia a un matraz de 50 ml. y enrasando a volumen) y de $0.04 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. No se deben usar estas soluciones más de una semana después de su preparación.
- Solución mezcla de siete corticosteroides (dexametasona, betametasona, prednisolona, flumetasona, beclometasona, triamcinolona y metilprednisolona) de concentración $0.05 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Todas estas soluciones se conservan en oscuridad y en nevera a 4°C (rango $2-10^{\circ}\text{C}$).

VI.- METODOS DE ANÁLISIS

VI.1.- PROTOCOLOS PARA EL TRATAMIENTO DE DISTINTAS MATRICES PARA LA EXTRACCION DE LOS CORTICOSTEROIDES.

Como se dijo anteriormente, el objetivo de la extracción es eliminar los componentes interferentes y aislar los analitos. El protocolo analítico de extracción y purificación en una matriz biológica debe adaptarse en función de la especificidad y de la sensibilidad de las técnicas utilizadas para la detección.

1.1.- DECONJUGACION DE LOS CORTICOSTEROIDES

Los corticosteroides se presentan en la orina como glucuronatos. Por ello, debemos realizar un proceso de deconjugación que libere los corticosteroides del ácido glucurónico, ya que sólo la forma libre es detectada en el análisis cromatográfico. Este proceso de deconjugación se hará tanto en muestras de orina como en muestras de hígado o riñón.

El método utilizado en este estudio para el análisis de los corticosteroides, comprende una hidrólisis enzimática con *Helix Pomatia* (Merck, Ref. 1.04114), ya que es la enzima que, como ya se ha visto en la revisión bibliográfica, es la más utilizada y con la que se obtienen los mejores resultados. Esta preparación, es eficaz para la deconjugación de las formas glucurónidas y sulfatos.

Los estudios de deconjugación de los corticosteroides se deben realizar dentro de un intervalo de pH, temperatura y tiempo en el cual la actividad de la enzima sea la óptima.

1.1.1.- Estudio de las condiciones óptimas de pH, temperatura y tiempo de deconjugación

1.1.1.1.- pH

Se ha realizado un estudio de la variabilidad de la cantidad de corticosteroides detectados en una muestra de hígado que contenga dexametasona incubando esa muestra a dos diferentes pH (dentro del intervalo 4.8-6.0, considerado el óptimo por la casa comercial para la actuación de la enzima *Helix Pomatia*) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

El procedimiento ha sido el siguiente;

Se pesaron, en dos tubos diferentes, 2.5 g de hígado en cada uno y se añadieron 10 ml. de agua y 30 μ L de β -glucuronidasa. En uno de los tubos se ajustó el pH a 4.8 mientras que en el otro tubo el pH se ajustó a 6. Estos hígados se incubaron en una estufa a $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$ durante 4 horas y después de este tiempo se purificaron siguiendo el protocolo de purificación con cartuchos OASIS que se expone en el apartado (VI-VI.1-1.3.3-3.3.III). En ambos casos se añadió a la muestra 20 ng del patrón interno metilprednisolona. La detección se realizó con un sistema HPLC con el modo cromatográfico definido en el apartado (VI-VI.2-2.2.4). Este experimento se realizó por duplicado.

1.1.1.2.- Temperatura

En lo que se refiere a la temperatura, se escogió el intervalo de $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$, ya que es la temperatura óptima a la que actúa esta enzima *Helix Pomatia*. Se evaluó otra temperatura ($50^{\circ}C$) debido a la existencia de otros estudios que aplican esta

temperatura en el proceso de deconjugación de los corticosteroides (Antignac, 2001).

1.1.1.3.- Tiempo

Se ha realizado un estudio del tiempo de incubación en orina y en hígado. Según el protocolo experimental descrito en los apartados anteriores (pH de 4.8 y temperatura de $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$). Se han incubado las muestras de orina e hígado durante 0, 2, 4, 8, 20 y 24 horas para saber cual es el tiempo óptimo de incubación.

En cuanto a la cantidad de enzima añadida, hemos considerado, según los datos bibliográficos (Le Bizec et al. 1996; Ferchaud et al; 2000) que los 30 μ L utilizados permiten tener las condiciones necesarias para la hidrólisis en lo que se refiere a la eficacia de esta enzima sobre los corticosteroides.

1.1.2.- Incubación con subtilisina

La subtilisina es una proteasa bacteriana (producida por *Bacillus subtilis*) que hidroliza específicamente ésteres aromáticos y amidas.

Para evaluarlo, se llevó a cabo un experimento en el cual a un hígado que contenía dexametasona se le añadieron 10 ml. de agua, 1 ml. de tampón de pH 7.5 (óptimo para la actuación de la subtilisina) y 120 μ L de una solución de subtilisina (5 mg de subtilisina en 2 ml. de tampón pH 7.5). Se incubó durante 2 y 4 horas para ver si los resultados obtenidos mejoran los obtenidos con β -glucuronidasa.

1.2.- EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

Se preparan 250 ml. de soluciones acuosas a pH 3, 7 y 11. Para ello se toman 125 ml. de tampón pH 8 compuesto por fosfato sódico dibásico y fosfato potásico

monobásico y se le añade 50 ml. de agua calidad Millipore. Después se ajusta a los diferentes pH: en el caso de pH 3 y 7 se realiza mediante la adición de ácido fosfórico al 85% mientras que en el caso de pH 11 el ajuste se realiza con sosa 1N, y en los tres casos se enrasa cada solución tampón a 250 ml. con agua Millipore, comprobando que el pH no haya variado. De cada una de las soluciones tampón se tomaron 2 ml. por quintuplicado en cinco tubos de ensayo. La cantidad de patrón añadida a cada 2 ml. de solución fue de 12.5 ng. de una solución patrón mezcla, de concentración 0.05 ng/ μ L, de 7 corticosteroides (beclometasona, betametasona, dexametasona, flumetasona, metilprednisolona, prednisolona y triamcinolona).

Los solventes seleccionados para realizar la extracción fueron los siguientes: tert-butilmetileter, n-hexano, eter dietílico, acetato de etilo y diclorometano. A cada 2 ml. de las soluciones tampón enriquecidas con patrón se le añadieron 4 ml. (x2) en cada uno, con un disolvente diferente.

Después de agitar y ultrasonicar todos los tubos se separa la capa orgánica de la acuosa mediante una pipeta Pasteur, evaporando la orgánica con nitrógeno en el Turbo Vap a 35°C y reconstituyéndola en 200 μ L. de fase móvil compuesta por H₂O/CH₃CN (70/30) e inyectándose 20 μ L. de los 200 en un sistema HPLC con las condiciones cromatográficas consideradas como óptimas (Ver apartado HPLC, VI-VI.2-2.2.4).

Paralelamente se hizo un estudio de las posibles pérdidas que podrían haber en el proceso de evaporación de los distintos disolventes. Para ello, a 8 ml. de solvente orgánico se le añadieron 12.5 ng de la mezcla patrón de 0.05 ng/ μ L y se evaporaron en el Turbo Vap con corriente de nitrógeno a 35°C, para posteriormente ser reconstituidas en la misma fase móvil que la prueba anterior (200 μ L. de H₂O/CH₃CN (70:30)) e inyectándose 20 μ L. en un sistema HPLC y comparándose con las áreas de los patrones inyectados directamente en la misma cantidad.

1.3.- EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA (SPE)

Todos los estudios realizados en cartuchos se han hecho con sustancias patrón, aunque los métodos seleccionados, posteriormente deben ser evaluados con muestras reales, ya que la presencia de interferencias puede hacer que los resultados de recuperación cambien llamativamente.

A su vez, todos los cálculos de recuperación obtenidos, han sido evaluados con la columna cromatográfica de elección para el análisis por HPLC de corticosteroides (VI-VI.2-2.2.4).

1.3.1.- Estudios realizados con cartuchos Sílica para la extracción de corticosteroides

En este caso, el estudio se realizó sólo para dexametasona, ya que en el momento en el que se comenzó con este estudio era el corticosteroide de elección en el engorde ilegal del ganado.

El método que se evaluó fue el siguiente:

No es necesario acondicionar este tipo de cartuchos, aunque si fuera necesario se realizaría con un disolvente muy apolar como el hexano o el ciclohexano.

Para la etapa de lavado se utilizó un disolvente de fuerza eluotrópica elevada tipo diclorometano. El método utilizado fue el siguiente;

2.5 ml. Hexano + 7.5 ml. CH_2Cl_2 + Patrón de DEX.

Cartucho Sílica : - Cargar la muestra.

- 4 ml. CH_2Cl_2 .

- Elución; (*)

Elución; (*); Se evalúan 5 posibilidades de elución:

Tabla VI-1

Elución I	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (100 + 0)
Elución II	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 + 2)
Elución III	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 + 5)
Elución IV	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 + 10)
Elución V	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80 + 20)

En lo que concierne a la elución, se han evaluado cinco posibilidades, para observar si pequeñas variaciones en la mezcla elegida para la elución (CH₂Cl₂/MeOH), producen grandes cambios en el porcentaje de recuperación de los corticosteroides.

1.3.2.- Estudios realizados con cartuchos C₁₈ para la extracción de corticosteroides

Se seleccionaron 4 métodos para comparar sus recuperaciones y definir así cual de ellos era el más eficaz. Son los siguientes:

METODO 3.2-I

100 ml. H₂O + 2.5 ml. MeOH + Patrón de DEX.

Cartucho C18: - Acondicionar; 5 ml. MeOH + 5 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.
- 4 ml. H₂O.
- 4 ml. H₂O/Acetone (4/1).
- 4 ml. H₂O/MeOH (4/1).
- Secar el cartucho.
- 4 ml. Hexano/CH₂Cl₂ (4/1).
- 4 ml. Hexano/Acetato de etilo (9/1).
- Elución con 4 ml. Hexano/ Acetato de etilo (1/1).

Método 3.2-I; Courtheyn et al, 1992.

METODO 3.2-II

10 ml. H₂O + Patrón de DEX.

Cartucho C18: - Acondicionar; 5 ml. MeOH + 5 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.
- 5 ml. H₂O/Acetona (4/1).
- 1 ml. n-Hexano.
- Elución con 2 ml. Eter dietílico (x 2).

Método 3.2-II; Santos Montes A. et al 1993.

METODO 3.2-III

10 ml. H₂O + Patrón de DEX.

Ajustar pH a 7.

Cartucho C18: - Acondicionar; 5 ml. MeOH + 5 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.
- 4 ml. MeOH/H₂O (55/45).
- Elución con 4 ml. MeOH.

Método 3.2-III; Marcos et al, 1989.

METODO 3.2-IV

9 ml. H₂O + 3ml. MeOH + Patrón de DEX.

Cartucho C18: - Acondicionar; 5 ml. MeOH + 5 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.
- 4 ml. H₂O
- Secar el cartucho.
- 4 ml. Hexano/CH₂Cl₂ (4/1).
- Elución con 4 ml. Hexano/Acetato de etilo (1/1) (x 3).

Método 3.2-IV; Courtheyn et al, 1992.

1.3.3.- Estudios realizados con cartuchos OASIS para la extracción de corticosteroides

En este caso, el estudio también se realizó con sustancias patrón pero esta vez, además de la dexametasona (DEX), se analizaron otros corticosteroides: betametasona (BET), flumetasona (FLU), metilprednisolona (MTP), prednisolona (PRD), y triamcinolona, (TRI). Esta ampliación del estudio de cartuchos a otros patrones se debe a que a lo largo del tiempo en el que se realizó la parte experimental de esta tesis, se vio la presencia de corticosteroides distintos a la dexametasona en muestras biológicas analizadas por otras técnicas, como la de HPTLC. Se evaluaron 3 métodos:

METODO 3.3-I

5 ml. de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.0 + Patrones (DEX, BET, FLU, MTP, PRD, TRI).

Cartucho OASIS: - Acondicionar; 3 ml. MeOH + 3 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.
- 3 ml. MeOH / H₂O (3/7).
- Elución con 3 ml. MeOH.

METODO 3.3-II

5 ml. de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.0 + Patrones (DEX, BET, FLU, MTP, PRD, TRI).

Cartucho OASIS: - Acondicionar; 3 ml. MeOH + 3 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.
- 3 ml. MeOH / H₂O (5/5).
- Elución con 3 ml. MeOH.

Método 3.3-I y 3.3-II; Método basado en el método general de uso para este tipo de cartuchos que ofrece la casa comercial, con algunas modificaciones en el paso de lavado.

METODO 3.3-III

10 ml. H₂O + 0.1 ml. de tampón acetato 0.1 M pH 4.8 + Patrones (DEX, BET, FLU, MTP, PRD, TRI).

Cartucho OASIS: - Acondicionar; 3 ml. MeOH + 3 ml. H₂O.

- Cargar la muestra.

- 3 ml. MeOH / 0.2 M NaOH (4/6) (x2)

- 3 ml. H₂O.

- Elución con 3 ml. MeOH.

Método 3.3-III; Proceedings of the EU-Workshop organised at RIVM, Bilthoven, The Netherlands, 1992.

1.3.4.- Estudios realizados con cartuchos Bond Elut Certify[®] para la extracción de corticosteroides

Como se puede observar en la **Tabla VI-2** se evaluaron cuatro métodos con este tipo de rellenos. Todos ellos están basados en distintas variaciones del protocolo general ofrecido por la casa comercial para este tipo de cartuchos para el análisis de drogas ácidas y neutras (Bond Elut Certify[™], Instruction Manual, Sample Preparation, Varian). Sobre la fase de lavado y de elución del cartucho, se hacen una serie de modificaciones. Existe la posibilidad, al ser de fase mixta, de actuar como un cartucho de fase reversa o como un cartucho de intercambio iónico.

Protocolo General

5 ml. tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6 + Patrones (DEX, BET, FLU, MTP, PRD, TRI).

Cartucho Bond Elut Certify:

- 2 ml. MeOH + 2 ml. tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.
- No secar el cartucho.
- Cargar la muestra.

Se acondicionó el cartucho con 2 ml. de MeOH y 2 ml. de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.0 y después se depositó la muestra, los seis patrones de corticosteroides (DEX, BET, FLU, MTP, PRD, TRI) en el cartucho disueltos en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.0.

En el paso de lavado, el uso de ácido acético se realiza para que el sorbente del cartucho quede cargado positivamente, actuando así como intercambiador iónico de tipo aniónico. El lavado con hexano se realiza para la elución de las posibles interferencias de tipo lipídico que puedan existir en la muestra. Para la elución se utilizan diferentes eluyentes (Método 3.4-I: diclorometano, Método 3.4-II: MeOH (para evaluar su capacidad de competir con el sorbente y poder desligar de él a los corticosteroides) y Método 3.4-III y 3.4-IV: distintas proporciones de acetonitrilo/agua).

Tabla VI-2

METODO	LAVADO	ELUCION
3.4-I	1 ml. tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6/ MeOH (80/20). Secar durante 5 min. 1 ml. Acido acético 1 M. Secar durante 10 min. 1 ml. de Hexano. Secar durante 2 min.	CH ₂ Cl ₂ (4 ml.)
3.4-II	1 ml. tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6/ MeOH (80/20). Secar durante 5 min. 1 ml. Acido acético 1 M. Secar durante 10 min. 1 ml. de Hexano. Secar durante 2 min. 4 ml. CH ₂ Cl ₂ Secar el cartucho.	MeOH (3 ml.)
3.4-III	Igual que METODO II	CH ₃ CN/H ₂ O (50/50) (3 ml.)
3.4-IV	Igual que METODO II	CH ₃ CN/H ₂ O (30/70) (3 ml.)

VI.2.- PROTOCOLOS PARA LOS DISTINTOS METODOS DE DETECCIÓN DE LOS CORTICOSTEROIDES.

2.1.- HPTLC

2.1.1.- Preparación de las muestras

2.1.1.1.- Cocktails

Estos productos (compuestos por medicamentos veterinarios o una mezcla de ellos usados de forma ilegal), que se remiten tanto en forma de líquido como de polvo, se pesan en una balanza calibrada (0.5 g) y se les adiciona 3 ml. de MeOH. Se debe de agitar bien y después, si es necesario, se les somete a una centrifugación.

2.1.1.2.- Sitios de inyección

Los sitios de inyección son cortados en piezas con un escalpelo y puestos en una bolsa de plástico. Después se adiciona 5 ml. de MeOH y se ponen en el stomacher durante 5 min. Se pasa a un tubo y se centrifuga durante otros 5 min. a 1000g. Se evapora el sobrenadante con corriente de N₂ a 40°C. Si al añadirle en MeOH el resultado es un líquido sucio y con sangre, se añade 2 veces 5 ml. de eter dietílico para extraer sustancias que podrían interferir en el análisis, después se centrifuga y el sobrenadante se evapora. El residuo se pone en MeOH.

Si se trata de implantes, se pueden encontrar restos del producto en forma de pastillas semidisueltas, las cuales, después de su extracción de la zona donde se encuentran, se pondrán en un tubo y se les añadirán 3 ml. de MeOH, agitando enérgicamente hasta su disolución y centrifugando posteriormente.

2.1.2.- Aplicación de las muestras

El proceso a seguir en la aplicación de las muestras es el ya explicado en el capítulo anterior sobre HPTLC. En este caso la cantidad a aplicar de las sustancias problema a analizar es de 30 μ l, las cuales se aplicaran junto a los standards o patrones para su comparación. La cantidad de standard a aplicar debe ser la suficiente para poder ser visto y evaluado (depende del límite de detección de cada técnica).

De cada uno de los 18 diferentes corticosteroides evaluados, 800 ng de cada uno son aplicados a 1 cm de la parte inferior de la placa mediante el Camag Linomat IV, con una jeringa de 100 μ l.

2.1.3.- Desarrollo de la placa

Después de la saturación del tanque de cromatografía, respetando las condiciones cromatográficas, las placas son eluidas con las distintas fases móviles. Se han comparado diferentes fases para determinar la mejor mezcla para la separación de los glucocorticoides.

Se comparan 20 mezclas diferentes de solventes orgánicos para ver la eficacia de separación de los 18 corticosteroides por HPTLC. En la **Tabla VI-3** se expone la composición de los distintos sistemas de solventes probados, que se agruparon en distintas categorías: A, B, C y D, acordes con su habilidad para separar los diferentes corticosteroides;

Tabla VI-3

FASE MOVIL	COMPOSICION	GRUPO
Eter dietílico	100	A
CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	90 + 10	A
Acetato de etilo	100	A
CH ₂ Cl ₂ -Hexano-CH ₃ OH	50 + 48 + 2	A
CHCl ₃ -éter de petróleo (30-40)-isobutanol-CCl ₄	40 + 20 + 20 + 20	A
Éter de petróleo (30-40)-isobutanol	52 + 50	A
Éter de petróleo (30-40)-isobutanol-CCl ₄	50 + 30 + 40	A
Benceno-CH ₃ OH	90 + 10	A
Benceno-isopropanol	80 + 20	A
Eter dietílico-CH ₃ OH	90 + 10	B
CH ₂ Cl ₂	100	C
CHCl ₃	100	C
Eter dietílico-Hexano	70 + 30	C
Eter dietílico-Hexano	88 + 12	C
CH ₂ Cl ₂ -Hexano	90 + 10	C
CHCl ₃ -eter dietílico	90 + 10	C
CHCl ₃ -acetato de etilo	90 + 10	C
CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O	90 + 10 + 1	C
CHCl ₃ -MeOH	92 + 8	D
CHCl ₃ -acetona	90 + 10	D

Categoría A.- Fases móviles que separan insuficientemente los compuestos evaluados con manchas difusas y con colas.

Categoría B.- Fases móviles que no separan corticosteroides porque todos se mueven con el frente (todos los Rf son aproximadamente 1).

Categoría C.- Fases móviles no suficientemente polares para poder mover compuestos desde el sitio de aplicación (todos los valores de Rf son aproximadamente cero).

Categoría D.- Fases móviles que dan un amplio espectro de valores de Rf para los corticosteroides.

2.1.4.- Detección de los corticosteroides por HPTLC

Se han evaluado diferentes métodos para la detección de los corticosteroides.

Después de la elución de las placas, se secan al aire y se aplican los diferentes reactivos.

El método de fluorescencia también ha sido evaluado como método de detección para corticosteroides. Con un eluyente de cloroformo/MeOH (98/2) se realiza el desarrollo de la placa y se introduce en una mezcla de hexano/parafina (2/1) sometiendo después la placa a 170°C durante 12 min. La excitación se realiza a 360-370 y la emisión a 400 nm. Aparece fluorescencia aunque no es un método selectivo.

Se comparan varias mezclas reactivas para evaluar la selectividad, sensibilidad y especificidad de los métodos;

Mezcla 1.- Se preparan tres soluciones por separado;

1.1.- Una solución de oxiclورو de circonio octahidrato (5 g) en agua (100 ml.);

1.2.- Una solución de ácido alizarín sulfónico (0.14 g) en agua (100 ml.);

1.3.- Hidróxido sódico (0.5 M).

Con este reactivo las placas se sumergen en la solución 1.1 durante 10 segundos, se seca con corriente de aire, se pulveriza con la solución 1.2 y también se seca al aire y finalmente se pulveriza con la solución 1.3.

Mezcla 2.- La mezcla reactiva es preparada disolviendo una solución de 2,4-dihidroxibenzaldehído (0.25 g) en ácido acético glacial (50 ml.) (Mezcla A) y una mezcla de ácido sulfúrico (95-97%) y ácido acético glacial (12.5 ml./37.5 ml.) (Mezcla B). Antes del uso se deben mezclar A y B (1/1). Después de pulverizar la placa, se calienta durante 10 min. a 95°C en un horno y se ve a la luz del día.

Mezcla 3.- Mezcla de una solución de azul de tetrazol (0.25 g) en MeOH (50 ml.) y una solución de hidróxido sódico (10 g) en agua (50 ml.). Las soluciones se deben mantener en la oscuridad y en nevera. Esta mezcla se pulveriza sobre la placa mediante un *spray* (Fingilab®) como aerosol propelente.

Mezcla 4.- Una solución de ácido sulfúrico 95-97% (1 ml.) en MeOH (9 ml.). En este caso la placa elegida lleva indicador de fluorescencia (F₂₄₅)

Para el desarrollo del color en las mezclas 3 y 4, es necesario introducir la placa en una estufa y calentarla a 85-90°C durante 10 min.

2.1.5.- Especificidad del ensayo

Se estudió la especificidad de estas condiciones cromatograficas con otros compuestos similares como los anabolizantes. 35 anabolizantes esteroideos (Tabla VI-4) y otras 10 drogas veterinarias, cuya presencia se ha detectado en algunas matrices biológicas, como por ejemplo, raptopamina, oxalato de verde malaquita, tilosina, ivermectina, azaperona, o carazolol, fueron los elegidos para el estudio de la especificidad del método. Las placas se desarrollan con el método de elución de cloroformo/MeOH (92/8). Después de la elución de las placas, se secan al aire y se

tratan con las Mezclas 2 y 3 y se calientan en la estufa a la temperatura correspondiente para cada mezcla. En ellas se habían aplicado 2 µg. de las sustancias analizadas para ver posibles interferencias en el análisis de los corticosteroides.

Tabla VI-4

ANABOLIZANTES ANALIZADOS	
Acetoxiprogesterona	Etinilestradiol
Boldenona	Fluoximesterona
Caproxiprogesterona	Hexestrol
Clormadinona acetato	Medroxiprogesterona acetato
Clortestosterona acetato	Megestrol acetato
Delmadinona acetato	Melengestrol acetato
Dienestrol	Mestranol
Dienestrol diacetato	Metilboldenona
Dietilestilbestrol	Metiltestosterona
Dietilestilbestrol dipropionato	Norandrostediona
Estradiol	Nortestosterona
Estradiol benzoato	Nortestosterona decanoato
Estradiol diacetato	Nortestosterona fenilpropionato
Estradiol fenilpropionato	Nortestosterona propionato
Estradiol valerato	Progesterona

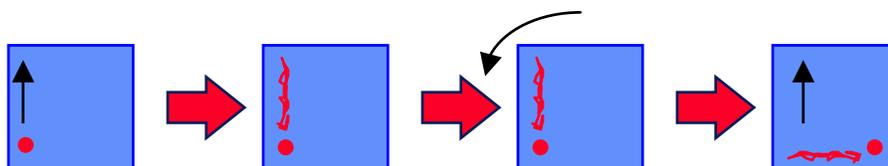
2.1.6.- Aplicación de la técnica de HPTLC en piensos.

Se realiza un método de detección en placa bidimensional. Este sistema se basa en un trabajo de Vanoosthuyze (Vanoosthuyze et al, 1993).

La preparación de la muestra en el caso de los piensos se debe realizar mediante una extracción líquido-líquido. Se evaluaron 3 métodos de extracción LLE; el primero realiza una extracción con 10 ml. de agua y 2.5 ml. de MeOH, se lleva a ultrasonidos durante 15 min. después de mezclar bien con el pienso y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 min. para extraer posteriormente el sobrenadante. El segundo método de extracción es similar al anterior, aunque en este caso sólo se realiza la extracción con 10 ml. de agua (no se añade MeOH). El sobrenadante, tanto en el primer como en el segundo método, se purifica con un cartucho C_{18} con el procedimiento expuesto en el apartado VI-VI.1-1.3.2-3.2-IV.

El tercer método consistía en realizar una extracción con 25 ml. de una mezcla de disolventes orgánicos formada por diclorometano/hexano (75/25) (x2), y una posterior extracción con cartuchos Sílica con el procedimiento que aparece en el apartado VI- VI.1-1.3.1-elución IV. El eluato obtenido se evapora y se reconstituye según el método a seguir posteriormente. Es decir, debido a que se trata de una matriz bastante sucia y complicada de analizar, se presupone que sólo una extracción con un cartucho de Sílica no es suficiente para una buena limpieza de la matriz que no produjera interferencias en el análisis posterior, por ello se somete al eluato a una segunda extracción por SPE con cartuchos C_{18} , para ello se han evaluado los cuatro métodos que se valoraron en el apartado VI-VI.1-1.3.2, junto también con los métodos evaluados con los cartuchos OASIS (ver apartado VI-VI.1-1.3.3). Los eluatos de todas las pruebas se evaporan a sequedad y se reconstituyen con 100 μ L de MeOH. Estos extractos se aplican con un aplicador automático Linomat en la parte inferior izquierda de la placa de sílica gel 60. El inconveniente de esta técnica es que sólo se podrá aplicar una muestra por placa.

Esta placa se eluirá en dos dimensiones en un tanque saturado, primero con una fase móvil formada por diclorometano-eter dietílico-MeOH-agua (77-15-8-1.2) y después de secar al aire y realizar una rotación de la placa de 90°, se realiza una segunda elución con cloroformo-acetato de etilo-agua (10-90-1).



Después de aplicará el revelador seleccionado para los corticosteroides formado por la Mezcla 2, y se calentará en la estufa durante 10-15 min. a 95°C.

2.2.- HPLC

Se han evaluado diversas columnas cromatográficas, desde columnas NovaPak C_{18} hasta columnas polares, como por ejemplo, las columnas Diol, realizando más de 25 combinaciones teniendo como variables diferentes temperaturas de columnas, fuerza iónica, distintos pH, presencia de modificadores orgánicos en la fase móvil, etc.

El sistema de HPLC utilizado consiste en; un detector de Red de Diodos (DAD) utilizado a una λ de 240, un inyector WATERS TM 717 Autosampler, un detector WATERS 996 Photodiode Array Detector y una bomba WATERS 590.

Las columnas evaluadas en este trabajo son las siguientes; Symmetry C_{18} (4.6 x 150mm) 5 μ m, Symmetry Shield RP 8 (3.9 x 150mm) 5 μ m, NovaPak C_{18} (4.6 x 250mm) 4 μ m, Novapak C_{18} (8 x 100mm) 4 μ m, Synergi Max RP 80A C_{12} (4.6 x 250mm) 4 μ m, Synergi Max RP 80A C_{12} (4.6 x 150mm) 2 μ m, Lichrosorb Diol (4 x 125mm) 5 μ m.

Los corticosteroides seleccionados para este estudio fueron; dexametasona, betametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometasona, flumetasona y

triamcinolona. Las soluciones patrón de trabajo utilizadas (8 y 0.2 ng/ μ L) fueron preparadas a partir de una solución de 0.4 mg/ml. de sustancia patrón en MeOH y almacenadas en nevera y en oscuridad.

2.2.1.- Columnas SYMMETRY C₁₈

Con este tipo de columnas se evaluaron los siguientes parámetros:

Influencia de la proporción de MeOH/H₂O: Se inyectaron los siete corticosteroides (DEX, BET, PRD, MTP, TRI, BCL, HDR) con distintas proporciones de MeOH/H₂O para determinar como influyen las distintas proporciones de MeOH y de agua en la separación de los corticosteroides. Las proporciones evaluadas fueron las siguientes: MeOH/H₂O 100/0, 90/10, 85/15, 80/20, y 70/30.

Influencia de la presencia de MeOH o de acetonitrilo en la fase móvil: Se inyectaron 3 patrones, DEX, BET y PRD, con dos fases móviles diferentes: MeOH/Fosfato disódico 0.02M pH7 (55/45) y Acetonitrilo/ Fosfato disódico 0.02M pH7 (55/45) para observar la influencia de la presencia de MeOH o del acetonitrilo en los tiempos de retención. También se evaluó la *influencia de la proporción de disolvente orgánico en estas fases móviles*, ya que Symmetry es muy sensible a los cambios en la proporción de disolvente orgánico en la mezcla.

Influencia del pH y de la concentración del tampón: Se realizan pruebas con el tampón fosfato disódico 0.02M a dos pH diferentes (pH 3 y 7) para observar si un cambio de pH influye en la separación de los corticosteroides, así como también se estudia si cambios en la molaridad del tampón provocan cambios significativos en los tiempos de retención. Para ello se realizan estudios con el tampón fosfato disódico variando su molaridad de 0.02 M a 0.05 M.

Influencia de la presencia de tetrahidrofurano; Se evalúa si la presencia de tetrahidrofurano (THF) en la mezcla de la fase móvil tanto con MeOH como con acetonitrilo produce cambios en el orden de elución de los corticosteroides.

Todas las pruebas efectuadas con esta columna se realizan a temperatura ambiente y con un flujo de paso de fase móvil por la columna de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.2.2.- Columnas SYMMETRY SHIELD C₈

Para conocer el comportamiento de los corticosteroides en este tipo de columna, muy similar a la Symmetry Shield C₁₈ se utilizó una fase móvil compuesta por THF/CH₃CN/Fosfato disódico 0.02M pH7 (25/5/75).

2.2.3.- Columnas NOVAPAK C₁₈

Las columnas NovaPak C₁₈ son, al igual que las columnas Symmetry, columnas C₁₈ pero de mayor longitud.

Con columnas NovaPak C₁₈ (8 x 100 mm) 4 μm con compresión radial se realizó un estudio sobre la influencia de la fase orgánica, evaluando distintas fases móviles; MeOH/THF/H₂O (70/2/28), MeOH/CH₃CN/H₂O (70/4/26), CH₃CN/H₂O (40/60), CH₃CN/H₂O (30/70), MeOH/H₂O (70/30), MeOH/H₂O (80/20). Con una fase móvil formada por CH₃CN/H₂O (30/70) se estudió la influencia del tamaño de la columna en el tiempo de retención de los corticosteroides, comparándola con una columna Novapack C₁₈ (4.6 x 250mm) 4 μm .

2.2.4.- Columnas PHENOMENEX SYNERGI MAX

La evaluación de la columna Phenomenex Synergi Max 80A C₁₂ (4.6 x 250 mm) 4 μ m, se llevó a cabo con una fase móvil de CH₃CN/H₂O (30/70). También se estudió si un aumento en la proporción de acetonitrilo en un 10% produce algún cambio en el tiempo de retención.

Con el fin de poder llevar a cabo el análisis por LC-MS, técnica actualmente muy utilizada en el análisis de residuos, se estudió el comportamiento de una columna Phenomenex Synergi Max RP 80A C₁₂ de (4.6 x 150 mm) 2 μ m. con una proporción de fase móvil de CH₃CN/H₂O (30/70) pero con la incorporación de ácido fórmico al 0.1% y a un flujo de 0.4 ml./min, disminuyendo así el gasto de disolventes.

Todos los análisis realizados hasta el momento con el resto de las columnas se efectuaron a T^a ambiente. Pero en este caso, con la columna Phenomenex Synergi Max 80A C₁₂ (4.6 x 250 mm) 4 μ m se evaluó un incremento de T^a hasta 40°C con una fase móvil de CH₃CN/H₂O (30/70), un flujo de 1.2 ml./min.

2.2.5.- Columnas DIOL

Se seleccionó una columna Lichrosorb Diol (4 x 125) 5 μ m. con una fase móvil con disolventes orgánicos (en ningún caso se utilizará una fase acuosa ya que se trata de una columna de fase normal de tipo polar). Se eligió una fase móvil formada por Hexano/Isopropanol (90/10) y una velocidad de flujo de 2.5 ml./min.

2.2.6.- Determinación de dexametasona en piensos por HPLC

Se han evaluado los mismos métodos de extracción que se evaluaron para la aplicación de una técnica de detección de HPTLC (ver apartado VI-VI.2-2.1.6) para

después ser reconstituido en 100 μL . de MeOH e inyectarse en un sistema HPLC con una columna Lichrosorb Diol (4 x 125) 5 μm , más una precolumna también de fase normal y una fase móvil formada por Hexano/Isopropanol (90/10) con velocidad de flujo de 2.5 ml./min.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en placa para la detección de corticosteroides, se seleccionó la tercera extracción expuesta en el apartado VI-VI.2-1.6, seguida de una purificación con un cartucho Sílica y posteriormente con un cartucho C_{18} u OASIS para evaluar la detección en piensos de corticosteroides por HPLC-DAD. Para ello, a varios piensos diferentes, sin presencia de corticosteroides en ellos, se les añadió patrón de dexametasona a niveles diferentes (100, 200, 400, 800 y 1600 ng.g^{-1}).

Para evaluar la repetibilidad del método a seis muestras de pienso se le añadió 88 ng.g^{-1} de dexametasona y fueron analizadas en el mismo día.

2.3.- GC-MS

El método seguido para la detección de los corticosteroides con este tipo de técnica fue el siguiente:

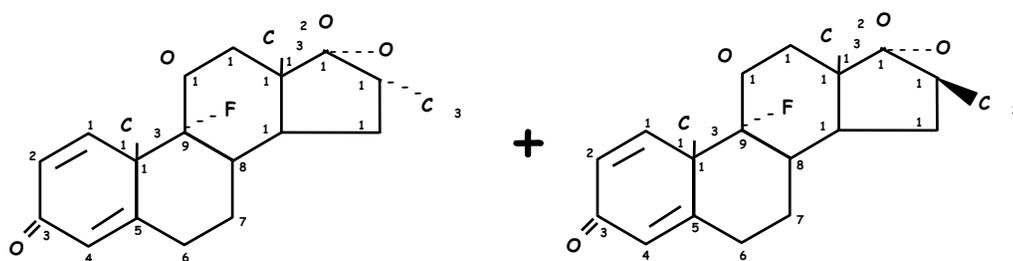
En un primer paso, diferentes patrones de corticosteroides fueron derivatizados, antes de evaluar muestras reales, para saber si el sistema de derivatización-detección era correcto. Para ello, 5 ng. de los distintos patrones a examen (DEX, BET, PRD, MTP, y FLU) se evaporaron a sequedad en viales topacio con corriente de nitrógeno. Sobre el extracto seco se añadieron 50 μl . de acetonitrilo y se agitó enérgicamente. Posteriormente se añadieron 200 μl . de una solución acuosa que contenía 50 mg.ml^{-1} de piridina clorocromato y 25 mg.ml^{-1} de acetato sódico. Los viales topacio se cerraron herméticamente con una cápsula y se colocaron en una

estufa a $92^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas aproximadamente. Después de este tiempo, se recogieron los viales de la estufa, se enfriaron en nevera, se desencapsularon y se transfirieron los contenidos a tubos de 10 ml.

Para extraer los corticosteroides oxidados del extracto, se añadieron a cada tubo 3 ml. de la mezcla de extracción constituida por eter terbutil metílico/diclorometano (2/1) y se agitó bien. Se centrifugó durante 5 min. hasta la separación de las dos capas. Se enfrió en un baño de hielo en el congelador y se pasó la capa superior a un tubo seco de 10 ml. mediante una pipeta Pasteur. Esta operación de extracción debe realizarse dos veces. Se unen los extractos obtenidos de las dos extracciones y se llevaron a sequedad, mediante evaporación en el Turbo-vap a T° ambiente bajo una corriente de nitrógeno. Se reconstituyeron los residuos secos con 30 μL . de tolueno, agitando los tubos exhaustivamente y se analizaron por GC-MS.

Lo que se produce con este tipo de derivatización es una enolización del grupo ceto del C17, produciendo dos derivados α y β (ver **Figura VI-1**).

Figura VI-1



9 α -fluoro-16 α -metil-1,4-androstandiona
-3 11 17-triona

9 α -fluoro-16 β -metil-1,4-androstandiona
-3 11 17-triona

El proceso de derivatización de la triamcinolona difiere del resto de los corticosteroides. Esta sustancia es resistente a la derivatización descrita y por ello, antes es necesario realizar una hidrólisis previa a la oxidación. Para ello, basándose en un trabajo de Courtheyn (Courtheyn et al, 1998), se añaden 50 μ l. de acetonitrilo y 50 μ l. de de HCl 6N. La mezcla se agita y se calienta a 85°C durante 30 min. Después de enfriarse se le añade 50 μ l. de NaOH 5N y 200 μ l. de la solución de piridina clorocromato. Se agita la muestra y se calienta a 92°C \pm 2°C durante 3 horas, extrayéndose posteriormente como se especificó anteriormente.

En el proceso de derivatización existen unos *puntos críticos* a tener en cuenta, concretamente la humedad, la temperatura y el tiempo. Condiciones extremas de humedad en los viales puede afectar a este proceso de derivatización, dando resultados poco repetibles. Asimismo, variaciones de la temperatura durante la derivatización o mantener los viales a T^a ambiente durante mucho tiempo antes de ponerlos en la estufa, pueden llevar consigo una mala derivatización e incluso que ésta no se realice.

2.3.1.- Detección de corticosteroides en muestras de orina por GC-MS.

El volumen de la muestra a tomar deberá ser suficiente para permitir realizar el análisis. Este método utiliza 10 ml. por determinación. Se debe descongelar la muestra justo antes del momento del análisis y proceder a su homogenización mediante agitación.

En este estudio la metilprednisolona fue utilizada como standard interno (IS). En un principio el método se evaluó sólo para dexametasona, aunque otros corticosteroides también pueden ser analizados con el método propuesto.

Diferentes cantidades de la solución patrón de dexametasona de $0.04 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (100 μl , 250 μl , 500 μl y 1250 μl) y una cantidad constante de IS (500 μL . de una solución de concentración de $0.04 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($2.0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)), se añadieron a 10 ml. de orina bovina que no contiene dexametasona ni metilprednisolona, para la preparación de curvas de calibración.

Después las muestras de orina se ajustaron a pH 4.6-5.0 agregando a 1 ml. de tampón acetato 1.0 M con pH 4.8 y con ácido acético de 20 %, si fuera necesario. Se añadieron 30 μL . de β -glucuronidasa para hidrolizar los conjugados glucurónicos y se agita enérgicamente. Se incuba en una estufa a $38 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas aproximadamente. Después de este tiempo, se enfrían las muestras y se centrifugan hasta la separación de sólidos.

La purificación de las muestras de orina se lleva a cabo mediante cartuchos OASIS (Waters). Para ello se activa el cartucho OASIS (3 ml. de MeOH y 3 ml. de agua), y se transfiere la muestra al cartucho. Se realiza un lavado con 3 ml. de MeOH/NaOH 40/60 (v/v) y 3 ml. de agua para eluir posibles interferencias y se eluye el cartucho con 3 ml. de MeOH. El eluato se evapora a sequedad con ayuda de una corriente de nitrógeno en el Turbo-Vap a T^a ambiente.

Posteriormente se debe realizar una derivatización similar a la que se expone en el apartado anterior (Courtheyn et al. 1994).

Condiciones instrumentales del GC-MS:

- . Cromatografo de Gases (Modelo HP 6890N o equivalente).
- . Detector de ionización química negativa (Modelo HP 5973N o equivalente).

- Columna GC: Columna capilar de sílice fundida SPB-5 (Supelco); longitud 30 m., diámetro 0.25 mm.

- Gas portador: Helio (con un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y metano como gas de ionización, ambos de alta pureza (Air Liquid, Madrid, Spain).

- Temperaturas:

T° inyector; 260°C

T° horno programado;

	Tiempo Total	T°	Rampa
Inicial		100°C	
2 min.	2	100°C	
9 min.	11	280°C	$20^\circ\text{C}/\text{min}$
10 min.	21	280°C	
2 min.	23	300°C	$10^\circ\text{C}/\text{min}$
3 min.	26	300°C	

- Modo; Splitless.

- Volumen de inyección; $2 \mu\text{L}$.

Al conocer los fragmentos de masas de cada corticosteroide, se puede realizar un análisis en modo SIM, seleccionando los iones de masas de cada uno de los corticosteroides evaluados.

2.3.1.1.- Curva de calibración

Las curvas de calibración se realizaron en días diferentes: Cada día, las muestras de orina (10 ml.) se adicionan a niveles diferentes con patrón de dexametasona (0.4, 1.0, 2.0, y $5.0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se analizan con la extracción y purificación que se relatan en el apartado anterior. Una concentración constante de metilprednisolona ($2.0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)

se añadió a cada muestra. La curva de calibración se construye con cada grupo de muestras.

La linealidad de la respuesta se evaluó con el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta, definido como el ratio o cociente entre la abundancia del ion m/z 310 y la abundancia del ion m/z 312 con concentraciones diferentes de dexametasona en ng.ml^{-1} y una constante concentración de IS de 2 ng.ml^{-1} :

$$\frac{\text{Abundancia 310} / \text{Abundancia 312}}{\text{concentración de DEX} / \text{concentración de MP}}$$

El coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración obtenida, está representada por la ecuación $y = ax + b$, donde "x" es la concentración de dexametasona y "y" el cociente entre la abundancia del ión m/z 310 y la abundancia del ión m/z 312. Se calculará por los resultados obtenidos a partir de 20 muestras diferentes de orina, con niveles de concentración de corticosteroides diferentes, analizados en el mismo día,

2.3.1.2.- Detección

La capacidad de detección se estudió analizando 20 muestras de orina diferentes añadidas con patrón de dexametasona en una concentración de 0.2 ng.ml^{-1} .

2.3.1.3.- Cuantificación

La cuantificación se realizó mediante el ratio obtenido entre la abundancia obtenida del fragmento m/z 310 (el fragmento más abundante de dexametasona) y la

abundancia del fragmento m/z 312 (el fragmento más abundante de metilprednisolona) y el factor de respuesta de la curva de calibración de cada día.

La concentración de dexametasona en muestras con presencia de un pico de dexametasona se calculará por medio del factor de respuesta de la curva de calibración del mismo día. Las muestras con una supuesta concentración de dexametasona superior a 0.2 ng.ml^{-1} , se someterán al procedimiento de la identificación.

2.3.1.4.- Repetibilidad y reproducibilidad del procedimiento de cuantificación.

Para evaluar el repetibilidad del método, se analizan cinco muestras de la misma orina, añadidas con patrón de dexametasona al mismo nivel y analizadas en el mismo día. Las muestras se adicionaron con 1 ng.ml^{-1} de dexametasona y 2 ng.ml^{-1} de metilprednisolona como IS. La repetibilidad fue estimada como el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta.

Para evaluar la reproducibilidad del método, 10 ml. de muestras de orina se analizaron en días diferentes y en niveles diferentes. Las pruebas fueron adicionadas con concentraciones de dexametasona de 0.4, 1.0, 2.0, y 5.0 ng.ml^{-1} y con una concentración constante de metilprednisolona, como IS, de 2.0 ng.ml^{-1} .

2.3.1.5.- Confirmación: identificación y especificidad

Para la confirmación de la identidad del pico detectado, los criterios de la Decisión Europea 2002/657/CE deberían de ser cumplidos aunque esta Decisión todavía no está aprobada. Según esta Directiva, las tolerancias máximas permitidas cuando las

intensidades relativas de los iones están comprendidas entre 20 y 50 % tienen que estar dentro de un ± 25 % mientras que si este rango comprende del 10-20%, la tolerancia permitida es del ± 30 %.

La identificación de picos del dexametasona fue llevada a cabo comparando los ratios obtenidos con los ratios correspondientes a las muestras enriquecidas con patrón.

También se analizaron 20 muestras de orina, en teoría libres de la presencia de dexametasona, para verificar la ausencia de dexametasona o la presencia de compuestos que produjeran interferencias en el análisis.

2.3.1.6.- Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad y reproducibilidad de los ratios entre las abundancias obtenidas de los iones diferentes (310, 330 y 295) se determinaron en las muestras añadidas a diferentes niveles, tanto las realizadas en el mismo día como en días diferentes.

2.3.1.7.- Efecto matriz

El efecto de la matriz fue estudiado. Para ello se analizaron las muestras de orina con el equipo y las condiciones descritas para el GC-MS, analizando la misma cantidad de dexametasona (20 ng) en presencia de cantidades diferentes de la misma muestra de orina (0, 1, 3, 6 y 10 ml.) y sometiendo a estas muestras al proceso analítico completo.

Para verificar cuál es la causa del efecto de la matriz, se realizó la siguiente prueba: 0.64 ng y 1.28 ng de patrón de dexametasona (B y D respectivamente) y un extracto de 10 ml. de orina (A) después de la extracción y purificación de la misma fueron derivatizados y cada uno de ellos resuspendidos, después de la extracción del

derivatizante y de la evaporación a sequedad, en 30 μ l. de tolueno. Posteriormente, los extractos fueron inyectados en el GC-MS. A su vez, dos veces el volumen inyectado en los extractos anteriores se inyecta con una mezcla del patrón y el extracto de orina (1 + 1).

La posible influencia del tipo de matriz en el factor de respuesta fue estudiada en tres diferentes ensayos realizados en el mismo día "intra-day": diferentes muestras de orina (orina de bovino adulto y joven y orina de cerdo) se añadieron a niveles diferentes (0.2-1.0 ng.ml^{-1} DEX/ ng.ml^{-1} MTP) y se repitió este ensayo en tres días diferentes.

2.3.1.8.- Series de trabajo

A la hora de aplicar el método al análisis de rutina en un laboratorio, la serie de trabajo a realizar debería ser la siguiente:

- Blanco de reactivos; Se sustituyen los 10 ml. de orina por 10 ml. de agua desmineralizada ó 10 ml. de una muestra negativa.
- Muestra a analizar; Se toma por duplicado 10 ml. \pm 0,1 de muestra de orina.
- Muestras enriquecidas: Se deben incluir al menos dos muestras por serie añadiendo a 10 ml. \pm 0,1 de muestra de orina una cantidad conocida de dexametasona de forma que la concentración sea igual o superior al límite de detección.

2.3.1.9.- Detección de otros corticosteroides en orina

Con la extracción y la purificación utilizada para la dexametasona en orina, y el tipo de detección expuesto anteriormente, se pueden detectar otros corticosteroides como por ejemplo la flumetasona y la prednisolona. Se añadieron a las orinas, además

de 160 μl . de la solución patrón de dexametasona de concentración, 320 μl . de la solución patrón de flumetasona y 320 μl . de la solución patrón de prednisolona. En este caso también debe enriquecerse con IS. Se utilizará, como en el caso anterior, el patrón de metilprednisolona del cual se añadirán 320 μl .

2.3.2.- Detección de corticosteroides en hígado, riñón y piensos por GC-MS.

En el caso de un tejido u otra muestra sólida (piensos, por ejemplo), se tomarán 2.5 g. Se debe descongelar la muestra justo antes del momento del análisis y proceder a su homogenización con un homogenizador.

A todas las muestras se les añade una cantidad constante de patrón interno metilprednisolona (500 μL . de una solución de concentración de 0.04 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

Después de añadir 10 ml. de agua a las muestras de tejido (hígado y riñón), se añade, al igual que a las muestras de orina, 1 ml. de tampón acetato 1 M, pH 4.8 y 30 μL . de β -glucuronidasa y se agita enérgicamente. Se incuba en una estufa a $38 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 horas. Después de este tiempo, se enfrían las muestras y se centrifugan hasta la separación de sólidos. Si se trata de piensos se realiza una primera extracción LLE como se define en el apartado (VI-VI.2-2.1.6), y después de evaporar el eluato y reconstituirlo con 9 ml. de agua y 3 ml. de MeOH, se realiza una segunda extracción con cartuchos OASIS similar a la que se describe en el siguiente párrafo.

La purificación de las muestras de hígado, riñón y pienso, se lleva a cabo mediante cartuchos OASIS (Waters). Para ello se activa el cartucho OASIS (3 ml. de MeOH y 3 ml. de agua), y se transfiere la muestra (sobrenadante) al cartucho. Se realiza un lavado con 3 ml. de MeOH/NaOH 40/60 (v/v) y 3 ml. de agua para eluir posibles

interferencias y se eluye el cartucho con 3 ml. de MeOH y el eluato se evapora a sequedad con ayuda de una corriente de nitrógeno en el Turbo-Vap a T^a ambiente.

Posteriormente se debe realizar una derivatización similar a la que se expone en el apartado anterior (Courtheyn et al. 1994).

Las condiciones instrumentales del GC-MS son similares a las utilizadas en el análisis de la orina.

VII.- RESULTADOS

VII.1.- RESULTADOS EN LA DECONJUGACION DE LOS CORTICOSTEROIDES

Después de los estudios realizados con la enzima *Helix Pomatia* con distintas temperaturas, pHs y tiempos, los mejores resultados obtenidos se exponen a continuación:

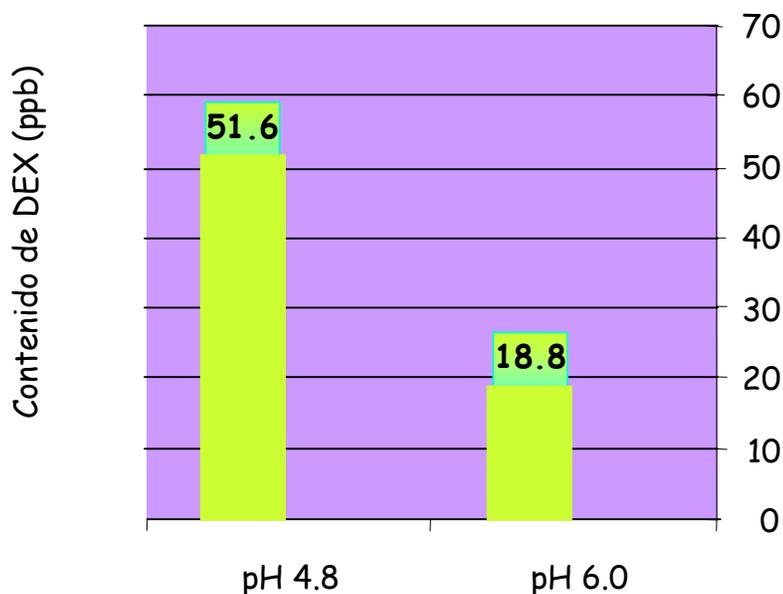
1.1.- RESULTADO DEL ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PH, TEMPERATURA Y TIEMPO DE DECONJUGACIÓN

1.1.1.- pH

Con el estudio realizado a pH 4.8 y 6 a $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$ durante 4 horas, como se propone en el apartado VI-VI.1-1.1.1, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Gráfica VII-1

Influencia del pH en la deconjugación de un hígado con dexametasona



■ Incubación con glucuronidasa/arylsulfatasa a diferentes pH para 4 horas

Como se observa en la **Gráfica VII-1**, hay diferencias evidentes entre los resultados obtenidos con los dos valores de pH, siendo la deconjugación de corticosteroides en el caso de pH 4.8 casi tres veces mayor que si se utiliza un pH 6.0.

1.1.2.- Temperatura

En lo que se refiere a la temperatura, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en un tiempo similar, fueron similares con temperatura de $50^{\circ} C$ y con el intervalo $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$.

1.1.3.- Tiempo

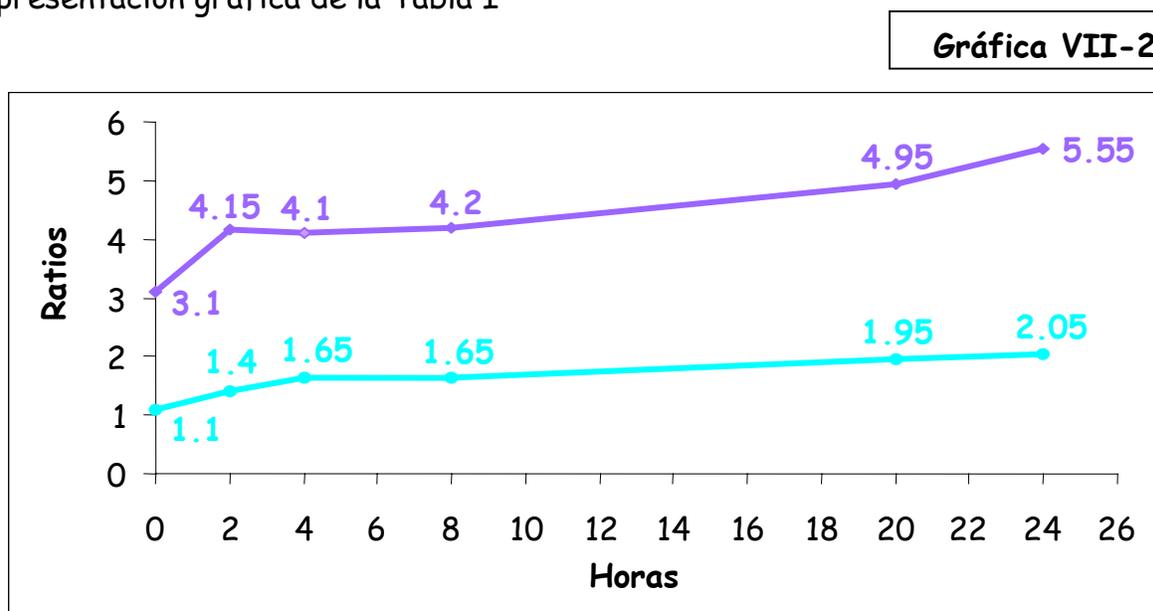
Según el protocolo experimental descrito a pH de 4.8 y temperatura de $38^{\circ} C \pm 2^{\circ}$ se han incubado las muestras de orina e hígado durante 0, 2, 4, 8, 20 y 24 horas para saber cual es el tiempo óptimo de incubación. Los resultados son los siguientes:

Cantidad de dexametasona en orina según el tiempo de incubación

Tabla VII-1

Tiempo de incubación	Relación entre IS (metilprednisolona) y dexametasona (ratios)					
	Día 1		\bar{x} Día 1	Día 2		\bar{x} Día 2
0 horas	1.1	1.1	1.1	3.1	3.1	3.1
2 horas	1.4	1.4	1.4	4.1	4.2	4.15
4 horas	1.6	1.7	1.65	4.3	3.9	4.1
8 horas	1.7	1.6	1.65	4.3	4.1	4.2
20 horas	1.9	2.0	1.95	4.9	5.0	4.95
24 horas	2.0	2.1	2.05	5.5	5.6	5.55

Representación gráfica de la Tabla I



Los valores que se muestran en las **Tablas VII-1 y VII-2**, y **Gráficas VII-2 y VII-3**, son la variación de la relación entre el patrón interno añadido (20 ng. de metilprednisolona,) y la dexametasona contenida en la orina y en el hígado dependiendo del tiempo de incubación.

En la **Gráfica VII-2** se aprecian los resultados obtenidos para los distintos tiempos de incubación en orina, observándose que el tiempo óptimo corresponde a 24 horas.

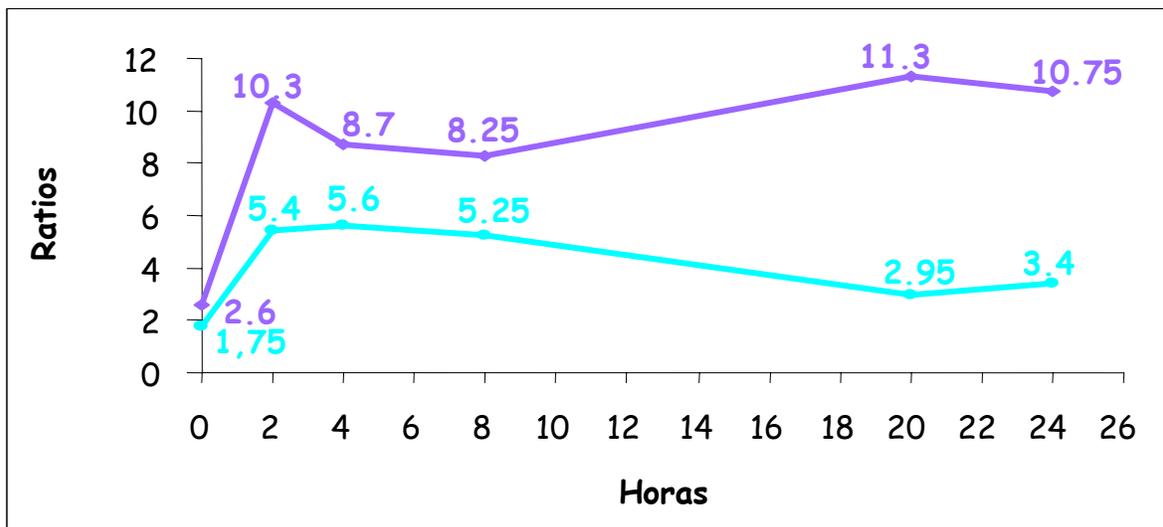
Cantidad de dexametasona en hígado según el tiempo de incubación

Tabla VII-2

Tiempo de incubación	Relación entre IS (metilprednisolona) y dexametasona (ratios)					
	Día 1		\bar{x} Día 1	Día 2		\bar{x} Día 2
0 horas	1.6	1.9	1.75	2.7	2.5	2.6
2 horas	5.6	5.2	5.4	10.3	10.3	10.3
4 horas	5.3	5.9	5.6	8.8	8.6	8.7
8 horas	5.3	5.2	5.25	7.3	9.2	8.25
20 horas	4.2	1.7	2.95	10.7	11.9	11.3
24 horas	4.2	2.6	3.4	11.4	10.1	10.75

Representación gráfica de la Tabla VII-2

Gráfica VII-3

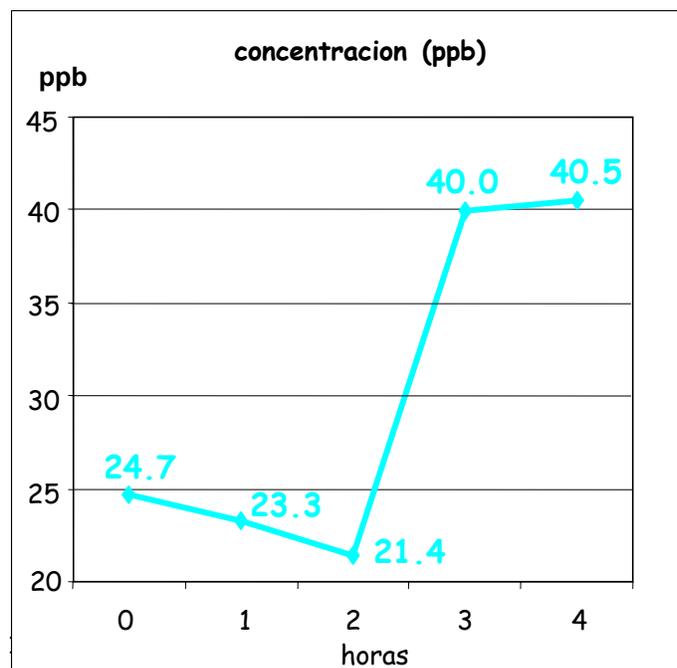
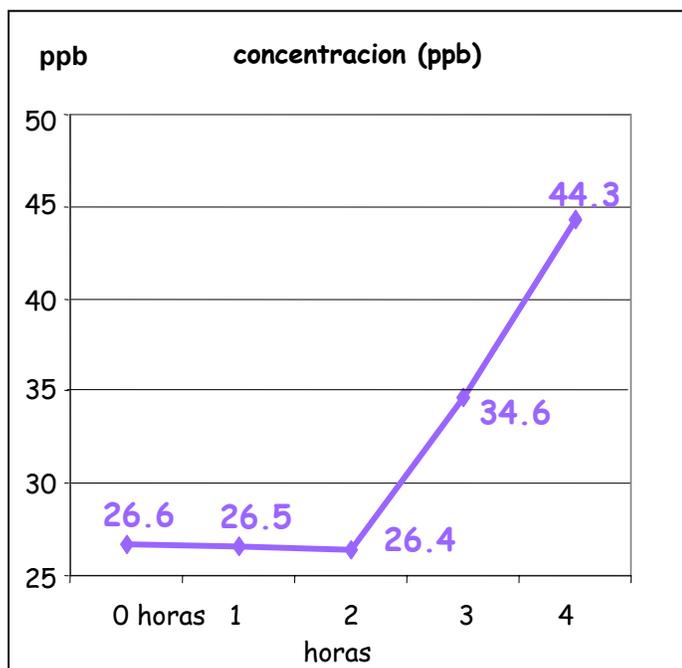


En cambio, como se aprecia en la **Tabla VII-2** y en la **Gráfica VII-3**, para el hígado parece que existe un óptimo de deconjugación entre 2 y 4 horas, descendiendo con el tiempo la cantidad de dexametasona detectada. Por ello, se realizó un estudio más detallado de la incubación de tejidos entre 0 y 4 horas, con las mismas condiciones que el estudio anterior. El resultado se muestra en la **Gráfica VII-4**.

Gráfica VII-4

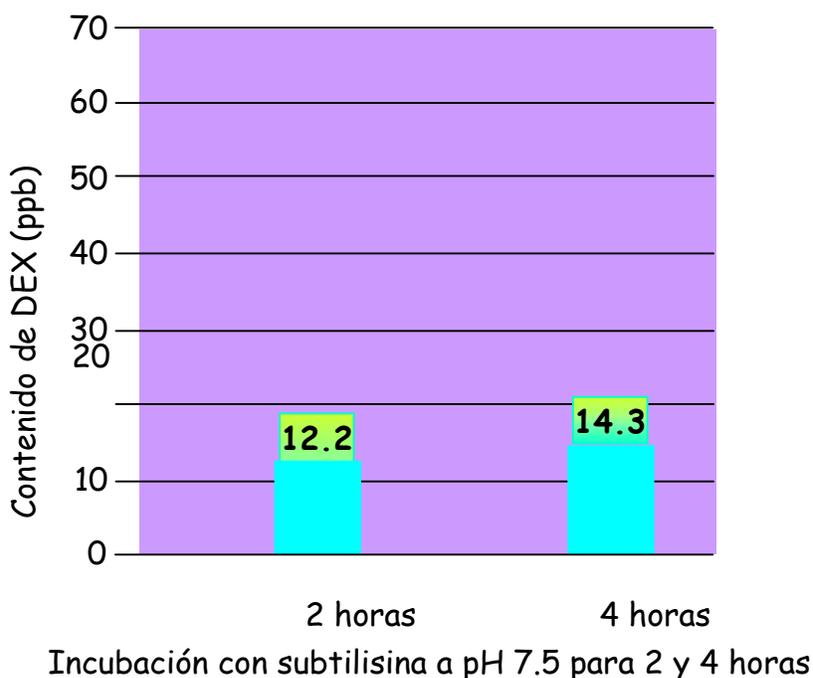
Hígado "A"

Hígado "B"



Dentro de este periodo de tiempo, el óptimo de incubación es de 4 horas en el caso del hígado.

También se realizó un estudio de la incubación durante 2 y 4 horas con subtilisina cuyo resultado se presenta en la **Gráfica VII-5**;

Gráfica VII-5

VII.2.- RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

Los resultados obtenidos en la extracción con disolventes se presentan en las **Tablas VII-3 y VII-4** respectivamente. A su vez, este estudio da una idea de la termolabilidad de cada uno de los corticosteroides evaluados.

Tabla VII-3: Resultados de la recuperación (en %) en la extracción con distintos disolventes y a diferentes pH de los corticosteroides.

n=3	Recuperación en %					pH 3	
	FLU	BCL	DEX	MPT	BET	PRD	TRI
Tert-butilmetileter	70	73	75	72	73	62	16
n-Hexano	–	–	–	–	–	–	–
Eter Dietílico	92	97	92	88	92	73	16
Acetato Etilo	38	44	47	55	45	42	9
Diclorometano	27	28	31	35	28	28	10

n=3	Recuperación en %					pH 7	
	FLU	BCL	DEX	MPT	BET	PRD	TRI
Tert-butilmetileter	50	52	52	56	53	50	44
n-Hexano	8	8	10	10	10	8	5
Eter Dietílico	99	82	98	97	90	74	38
Acetato Etilo	62	44	55	61	47	54	43
Diclorometano	60	48	54	59	49	52	24

n=3	Recuperación en %					pH 11	
	FLU	BCL	DEX	MPT	BET	PRD	TRI
Tert-butilmetileter	41	–	44	40	53	34	14
n-Hexano	–	–	–	–	–	–	–
Eter Dietílico	67	–	67	67	84	56	15
Acetato Etilo	103	26	105	96	106	89	29
Diclorometano	65	–	67	61	88	54	8

Tabla VII-4: Resultados de las pérdidas ocurridas en la evaporación de los 5 disolventes.

n=2	Pérdidas, en %, en la evaporación						
	FLU	BCL	DEX	MPT	BET	PRD	TRI
Tert-butilmetileter	s.p.	1.3	4.6	10.6	10.9	3.1	29.8
n-Hexano	s.p.	s.p.	3.1	2.9	10.3	s.p.	20.5
Eter Dietílico	s.p.	s.p.	1.1	3.7	5.3	s.p.	4.8
Acetato Etilo	s.p.	s.p.	5.7	7.7	15.8	2.0	11.8
Diclorometano	5.6	1.6	9.2	0.6	10.2	7.3	11.3

s.p.: Sin pérdidas.

Se calculó la recuperación obtenida en cada uno de los casos, comparando el área correspondiente con el área de una inyección de 12.5 ng de patrón directo de la mezcla de corticosteroides, que es la cantidad de patrón que debería aparecer si no hubiera ninguna pérdida en el proceso de extracción con ese disolvente, ni en la evaporación del mismo.

Según los resultados que aparecen en estas tablas, se observa que el solvente con el que mejor se extraen los corticosteroides es el eter dietílico en el caso de pH 3 y 7 y el acetato de etilo en el caso de pH 11 para los siete corticosteroides evaluados, aunque la triamcinolona, por su comportamiento químico diferente al resto, tiene recuperaciones más bajas.

En cuanto a las pérdidas en la evaporación, es con el CH_2Cl_2 con el disolvente que mayores pérdidas se observan, siendo la betametasona junto con la triamcinolona los corticosteroides más afectados en este proceso.

VII.3.- RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA

3.1.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS SÍLICA PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES

En lo que concierne a la elución, se observa en la **Tabla VII-5** que pequeñas variaciones en la mezcla de elución ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$), producen grandes cambios en el porcentaje de recuperación de los corticosteroides.

Con la utilización de CH_2Cl_2 al 100 % se obtiene un rendimiento de elución insuficiente (0%). Solamente con la inclusión de MeOH en el eluato se consigue aumentar la recuperación de la dexametasona. Con proporciones tales como 98/2, 95/5 y 80/20, también obtenemos bajas recuperaciones, en particular, para los compuestos más polares que quedan fuertemente retenidos. Es con la mezcla de elución $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10), con la que la recuperación de este corticosteroide es aproximadamente del 93%.

		Recuperación en %	Tabla VII-5
Elución I	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100 + 0)	0.0 ± 0.0	
Elución II	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98 + 2)	67.4 ± 3.7	
Elución III	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95 + 5)	76.4 ± 7.9	
Elución IV	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90 + 10)	93.1 ± 3.1	
Elución V	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80 + 20)	71.8 ± 5.4	

3.2.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS C₁₈ PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES

Los resultados obtenidos para la recuperación de la dexametasona se muestran en la **Tabla VII-6**.

Tabla VII-6

n = 3	METODO 3.2-I	METODO 3.2-II	METODO 3.2-III	METODO 3.2-IV
Recuperación de patrones	11.1% ± 7.6	61.5% ± 15.1	55.0% ± 9.3	35.1% ± 5.0

Se puede observar según estos resultados, que el método más eficaz a la hora de extraer y purificar patrones de corticosteroides (ver métodos en el apartado VI-VI.1-1.3.2) es el Método 3.2-II con resultados muy cercanos al Método 3.2-III, aunque en ningún caso se consigue una recuperación satisfactoria.

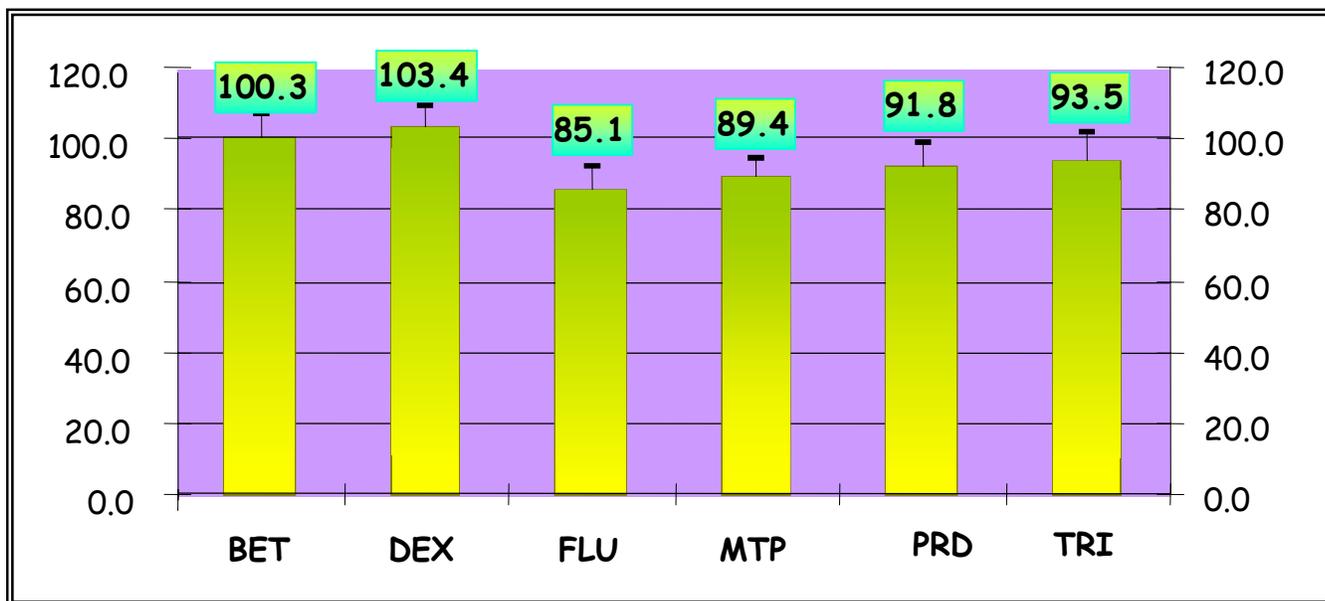
3.3.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS OASIS PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES

En los tres métodos evaluados (apartado VI-VI.1-1.3.3), se obtienen recuperaciones muy similares para los 6 corticosteroides estudiados. En el caso de un lavado con 30% de MeOH, el rendimiento para los compuestos menos polares es alto, mientras que es más bajo para los compuestos más polares que son menos retenidos y en parte eliminados en la fase de lavado. Aunque en los tres métodos la recuperación de la triamcinolona es bastante más baja que para el resto de los corticosteroides, se obtiene la menor recuperación con el Método 3.3-II.

Resultados:

METODO 3.3- I;

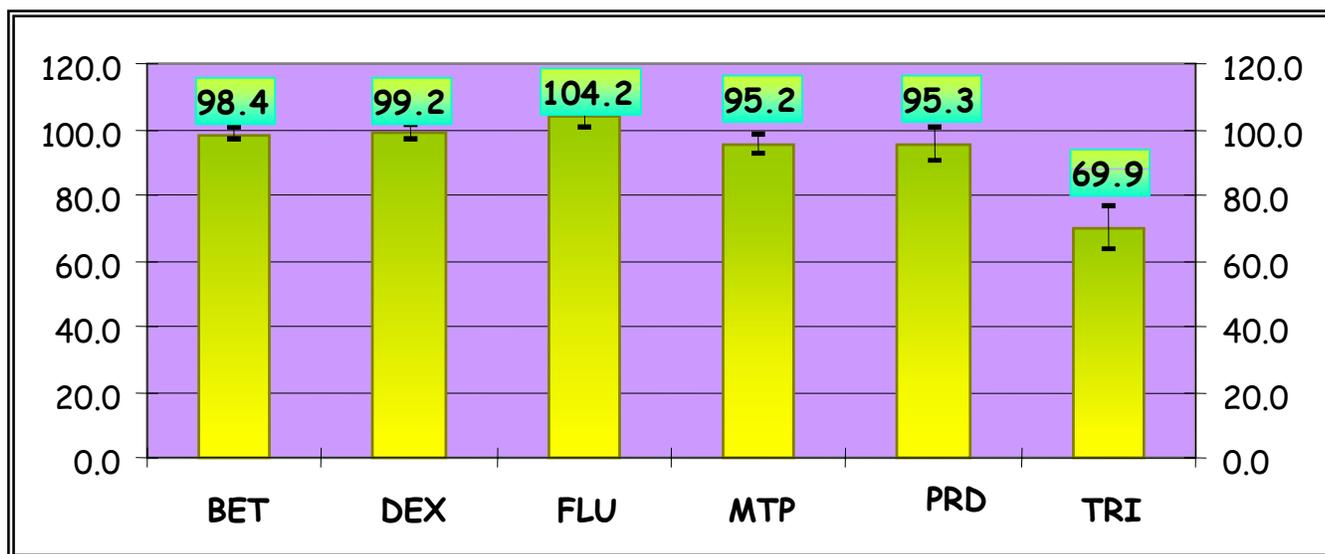
	Rec. en % (1)	Rec. en % (2)	Rec. en % (3)	Media	Desv. Est.
BET	92.50	104.90	103.50	100.3	6.79
DEX	97.06	106.6	106.4	103.4	5.45
FLU	76.9	90.12	88.4	85.1	7.19
MTP	83.9	93.4	90.9	89.4	4.92
PRD	84	96.8	94.7	91.8	6.86
TRI	84.3	98.6	97.6	93.5	7.98



■ % Rec. (n=3)

METODO 3.3-II;

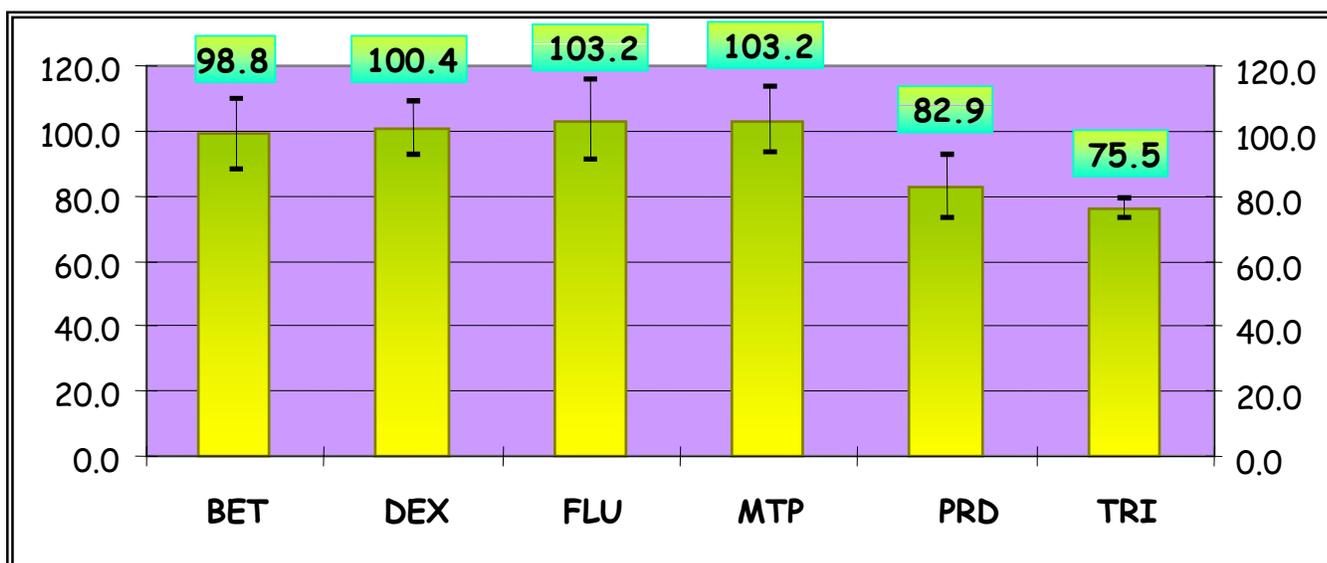
	Rec. en % (1)	Rec. en % (2)	Rec. en % (3)	Media	Desv. Est.
BET	96.60	99.03	99.60	98.41	1.59
DEX	96.6	100.2	100.7	99.17	2.24
FLU	108.7	101.9	102.1	104.23	3.87
MTP	92.0	96.5	97.1	95.2	2.79
PRD	90.6	94.3	100.9	95.27	5.22
TRI	62.7	70.8	76.16	69.89	6.78



■ % Rec. (n=3)

METODO 3.3-III;

	Rec. en % (1)	Rec. en % (2)	Rec. en % (3)	Media	Desv. Est.
BET	99.36	109.24	87.69	98.76	10.79
DEX	100.8	108.51	91.94	100.42	8.29
FLU	103.13	115.78	90.63	103.18	12.58
MTP	105.72	111.74	92.07	103.2	10.08
PRD	93.35	74.26	81.07	82.89	9.67
TRI	77.98	76.75	72.4	75.71	2.93



■ % Rec. (n=3)

3.4.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON CARTUCHOS BOND ELUT CERTITY PARA LA EXTRACCIÓN DE CORTICOSTEROIDES

Los resultados obtenidos para los cuatro métodos se muestran en la **Tabla VII-7**.

Tabla VII-7

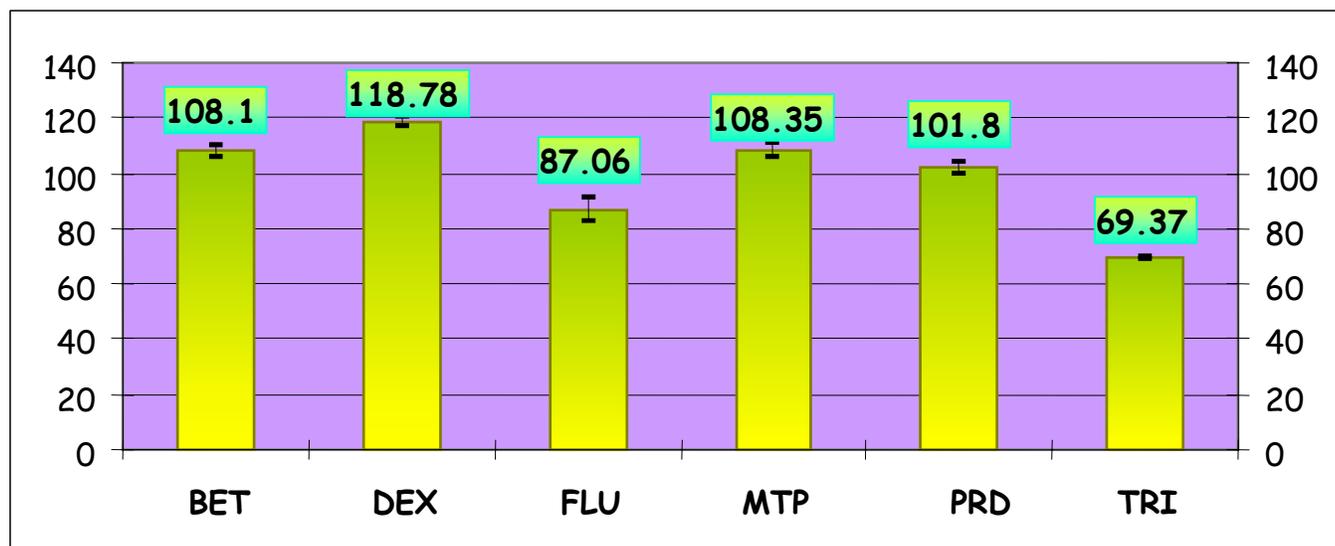
METODO	REC. % (n=3)
3.4-I	0 - 8.3
3.4-II	69.37 - 108.35
3.4-III	69.8 - 93.9
3.4-IV	70.5 - 93.3

En el Método 3.4-I, en las tres pruebas realizadas (n=3), se observa que no se produce elución de los corticosteroides con el CH_2Cl_2 , excepto para la flumetasona que la recuperación es del 8.3 %.

Las recuperaciones en los Métodos 3.4-II, 3.4-III y 3.4-IV son muy similares para todas las sustancias, siendo mayor esta recuperación en el Método 3.4-II, debido a que la cantidad de disolvente orgánico que se usa es del 100%. Se tendrá que evaluar será si al ser todo el eluyente un solvente orgánico la cantidad de impurezas arrastradas son también elevadas.

METODO 3.4-II:

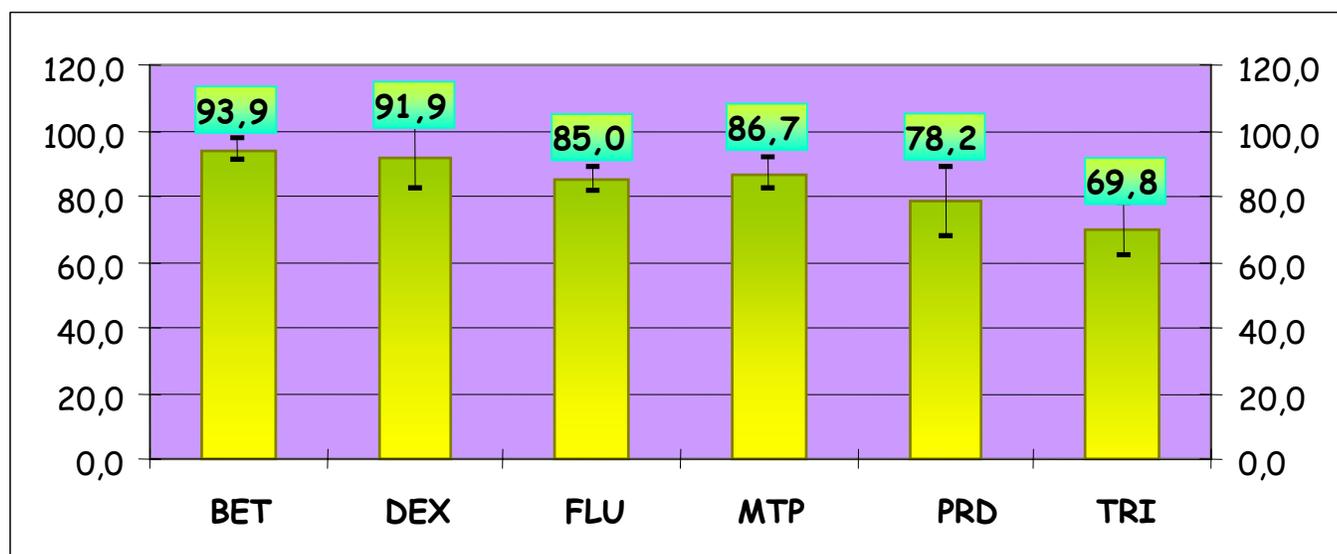
	Rec. en % (1)	Rec. en % (2)	Rec. en % (3)	Media	Desv. Est.
BET	106.6	109.6	108.1	108.10	1.50
DEX	117.5	120.06	118.79	118.78	1.28
FLU	84.06	90.6	86.51	87.06	3.30
MTP	106.8	110.12	108.12	108.35	1.67
PRD	100.30	103.30	101.80	101.80	1.50
TRI	69.68	69.06	69.38	69.37	0.31



■ % Rec. (n=3)

METODO 3.4-III;

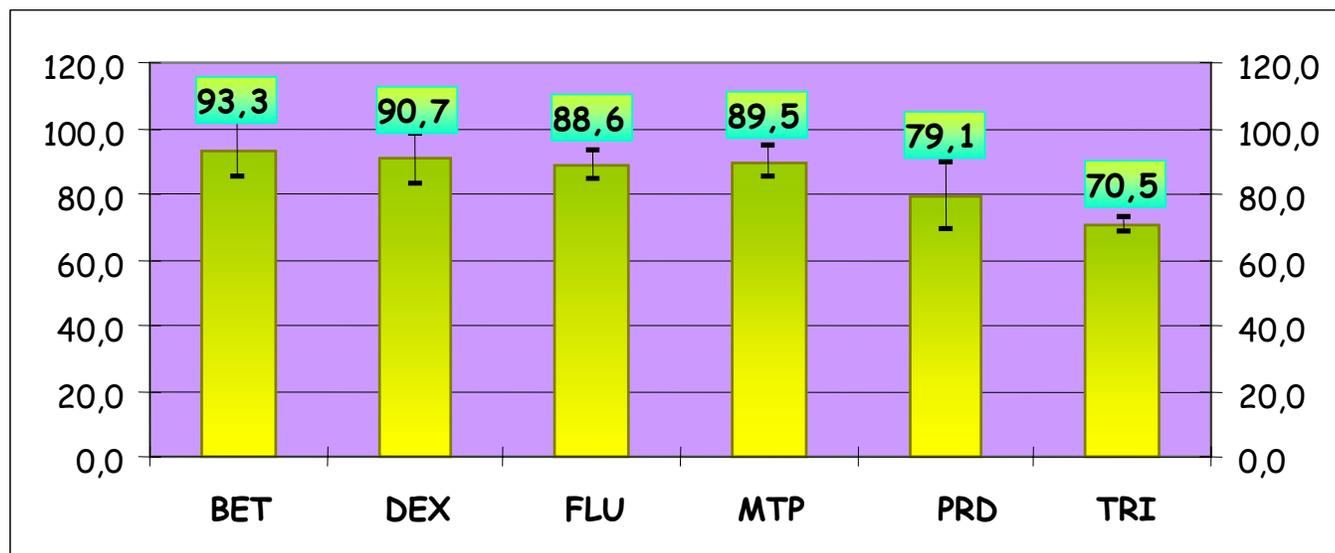
	Rec. en % (1)	Rec. en % (2)	Rec. en % (3)	Media	Desv. Est.
BET	91.75	97.62	92.25	93.87	3.25
DEX	95	99.5	81.25	91.92	9.51
FLU	82.5	89.25	83.25	85.00	3.70
MTP	84.62	92	83.37	86.66	4.66
PRD	80.50	87.50	66.60	78.20	10.64
TRI	70.87	77.12	61.50	69.83	7.86



■ % Rec. (n=3)

METODO 3.4-IV;

	Rec. en % (1)	Rec. en % (2)	Rec. en % (3)	Media	Desv. Est.
BET	85	101.3	93.62	93.31	8.15
DEX	91.1	97.87	83	90.66	7.44
FLU	90.62	91.75	83.5	88.62	4.47
MTP	84	92	92.62	89.54	4.81
PRD	86.12	83.62	67.62	79.12	10.04
TRI	71.37	72.50	67.75	70.54	2.48



■ % Rec. (n=3)

VII.4.- RESULTADOS DE LA DETECCIÓN POR HPTLC

En la **Tabla VII-8** se muestran los distintos valores de Rf para las fases móviles seleccionadas como las mejores. Estos resultados son la media (\bar{X}) de los resultados obtenidos en la aplicación de 3 placas con patrones de corticosteroides (n=3) y de sus ésteres, tanto para la mezcla de cloroformo/MeOH como para la mezcla cloroformo/acetona. La detección se realizó con la Mezcla de revelado 2 (ver apartado VI-VI.2, 2.1.4).

Tabla VII-8

CORTICOSTEROIDES	Rf (n=3)	
	Cloroformo/MeOH (92/8)	Cloroformo/Acetona (90/10)
PREDNISOLONA	0.4	0.01
DEXAMETASONA	0.45	0.021
TRIAMCINOLONA	0.29	0.054
BECLOMETASONA	0.43	0.043
PREDNISONA	0.5	0.043
BETAMETASONA	0.38	0.021
DIACETATO DE TRIAMCINOLONA	0.62	0.13
ACETATO DE METILPREDNISOLONA	0.56	0.1
HIDROCORTISONA	0.39	0.021
ACETATO DE PREDNISOLONA	0.36	0.27
ACAPONATO DE HIDROCORTISONA	0.54	0.17
ACETATO DE FLUDROCORTISONA	0.63	0.027
DEXAMETHASONE ACETATE	0.41	0.2
HEMISUCCINATO DE METILPREDNISOLONA	0.14	0
DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA	0.91	0.34
ACETONIDO DE TRIAMCINOLONA	0.48	0.23
VALERATO DE BETAMETASONA	0.67	0.24
ACETATO DE CORTISONA	0.6	0.18

De los diferentes métodos de detección, usando mezclas de revelado, que se han evaluado para la determinación de los corticosteroides, se ha observado que:

Los resultados obtenidos con el uso de la Mezcla 1 (ver Mezclas 1, 2, 3, y 4 en apartado VI-VI.2-2.1.4) no son satisfactorios debido a que solamente los corticosteroides fluorados se pueden ver con este tipo de revelador y además, con un límite de detección alto (600 ng. mancha⁻¹).

En cuanto a la Mezcla 2, se la considera la más selectiva, ya que, incluso los isómeros dexametasona y betametasona, con Rf similares, pueden ser distinguidos, aunque la sensibilidad no es demasiado buena. Con esta mezcla, los diferentes corticosteroides aparecen de colores diferentes, pudiendo así ser identificados los corticosteroides no sólo por su Rf sino también por el color que presentan.

Menor selectividad aunque mayor sensibilidad presenta la Mezcla 3. Con esta mezcla, la mayoría de los corticosteroides se revelan con un color azul-violáceo, pudiendo así detectar la presencia de corticosteroides aunque no su identificación. La sensibilidad es dos o tres veces mejor que la obtenida con la Mezcla 2.

Con la Mezcla 4, la selectividad que se obtiene comparada con la Mezcla 2 es baja, así como la sensibilidad si la comparamos tanto con la Mezcla 2 como con la 3 (límite de detección de 750 ng. mancha⁻¹).

Todas las placas realizadas para la comparación de las distintas mezclas, se eluyeron con la mezcla de cloroformo/MeOH (95/5).

El resultado obtenido con las Mezclas 2, 3 y 4 después de ser calentadas en la estufa a las temperaturas correspondientes aparecen en la **Tabla VII-9**.

Tabla VII-9

CORTICOSTEROIDES	COLOR			
	REACTIVO 4	REACTIVO 2	REACTIVO 3	REACTIVO 3 F ₂₅₄ (con UV)
PREDNISOLONA	Gris-violeta	Violeta	Marron	-----
DEXAMETASONA	Azul-verdoso	Violeta	Violeta	-----
TRIAMCINOLONA	Agrisado	Violeta	Naranja	-----
BECLOMETASONA	Azul	Violeta	Gris-violaceo	-----
PREDNISONA	Beige	Violeta	Naranja	-----
BETAMETASONA	Azul	Violeta	Violeta	-----
DIACETATO DE TRIAMCINOLONA	Azul-grisaceo	Violeta	Amarillo	-----
ACETATO DE METILPREDNISOLONA	Gris-violaceo	Violeta	Violeta-Rosa	-----
HIDROCORTISONA	Verdoso	Violeta	Verde	
ACETATO DE PREDNISOLONA	Violeta	Violeta	Violeta-Marron	-----
ACAPONATO DE HIDROCORTISONA	Verde oliva	Violeta	Verde	Verde/amarillo
ACETATO DE FLUDROCORTISONA	Rosa	Violeta	Amarronado	Marron/Verde
ACETATO DE DEXAMETASONA	Verde-azulado	Violeta	Violeta-gris	Verde/Violeta
HEMISUCCINATO METILPREDNISOLONA	Violeta	Violeta	Marron	-----
DIPROPIONATO DE BECLOMETASONA	Azul	Violeta	Violeta-Gris	-----
ACETONIDO DE TRIAMCINOLONA	Indigo	Violeta	Naranja	Verde
VALERATO DE BETAMETASONA	Azul	Violeta	Gris	Verde-violeta
ACETATO DE CORTISONA	Amarillo-gris	Violeta	Naranja	Azulado

Tabla VII-10

CORTICOSTEROIDES	REACTIVO 2	REACTIVO 3
DEXAMETASONA	300 ngs	100 ngs
PREDNISOLONA	400 ngs	150 ngs
TRIAMCINOLONA	200 ngs	75 ngs
BECLOMETASONA	60 ngs	40 ngs
PREDNISONA	300 ngs	100 ngs
BETAMETASONA	50 ngs	30 ngs
HIDROCORTISONA	50 ngs	40 ngs

En la **Tabla VII-10** se muestran los límites de detección obtenidos, tanto con el revelado de la placa con la Mezcla 2 como con la 3, de los siete corticosteroides más comunes.

4.1.- RESULTADOS DE ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE HPTLC PARA LOS CORTICOSTEROIDES

Con la Mezcla 2 los anabolizantes esteroideos se mueven con el frente y los colores obtenidos difieren bastante de los obtenidos para los corticosteroides.

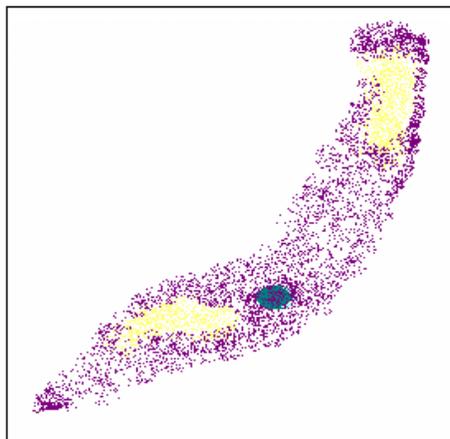
Con la Mezcla 3 la metilt testosterona, acetoxiprogesterona, testosterona y caproxiprogesterona, pueden tener interferencias con la detección de corticosteroides porque presentan un color similar (quizás más grisáceos) a los corticosteroides, sin embargo sus valores de R_f son diferentes. Nortestosterona y trembolona dan unas manchas con colores y R_f s muy similares a algunos corticosteroides.

Los otros fármacos veterinarios analizados no dan interferencias con el análisis de corticosteroides, excepto la tilosina que presentó por capa fina un comportamiento similar a los corticosteroides, en cuanto a R_f y coloración, tanto con la Mezcla 2 como con la 3, existiendo sin embargo una diferencia significativa en tiempo de retención y espectro por HPLC-DAD, sistema por el cual se debe analizar posteriormente este tipo de muestras para confirmar la posible presencia de corticosteroides.

4.2.-RESULTADOS DEL USO DE LA TECNICA DE HPTLC EN EL ANALISIS DE PIENSOS

El resultado de todas las pruebas de extracción realizadas con muestras de piensos, y purificadas con cartuchos C_{18} , para después ser detectados por una técnica de HPTLC para la detección de los corticosteroides, es bastante similar para todos los casos. Después del revelado, se puede observar que aparecen bastantes restos de otros componentes no identificados del pienso ("suciedad" en la placa) y que la detección de los corticosteroides, aunque posible, parece complicada, ya que en algunos casos la mancha producida por los corticosteroides puede estar enmascarada por esta "suciedad". Aún así, el límite de detección, en el caso de la dexametasona, es de 100 ng.g^{-1} .

Figura VII-1



En la **Figura VII-1** se puede ver el resultado de la aplicación de una muestra analizada por el método narrado en el apartado VI-VI.2.1.6, con una extracción con C_{18} por el Método VI-VI.1-1.3.2-3.2-IV.

En el caso de la tercera extracción que combina el uso de extracción con disolventes, con un cartucho Sílica y otro OASIS, el resultado mejora ya que las interferencias son menores.

4.3.- ESTUDIO DE LA APLICABILIDAD DEL METODO EN MUESTRAS REALES

A lo largo de dos años, se analizan un total de 1000 muestras, entre líquidos, polvos y puntos de inyección, por la técnica de HPTLC, con una fase móvil formada por cloroformo/MeOH (98/2) y un revelador compuesto por la Mezcla 2. De todas estas muestras, 121 muestras fueron "sospechosas" a la presencia de corticosteroides y 113 fueron confirmadas como positivas a la presencia de estas sustancias por un posterior análisis por HPLC (VI-VI.2-2.2.4).

Las muestras positivas se distribuyeron de la siguiente forma:

Dexametasona; 90 muestras positivas (48 muestras con presencia sólo de dexametasona, 10 muestras con dexametasona y prednisolona, y 32 muestras con dexametasona e isonicotinato).

Prednisolona; 16 muestras positivas (2 muestras con presencia sólo de prednisolona, 10 positivas a prednisolona y dexametasona, y 4 muestras positivas a prednisolona más hidrocortisona)

Betametasona; 1 muestra positiva.

Hidrocortisona; 5 muestras positivas (1 muestra positiva a hidrocortisona, y 4 muestras positivas a hidrocortisona y prednisolona).

Isonicotinato de dexametasona; 35 muestras positivas (3 muestras positivas sólo a isonicotinato, y 32 a isonicotinato y dexametasona). Se ha comprobado que los productos que contienen isonicotinato cuando son sometidos durante un tiempo a una solución de MeOH, este isonicotinato se hidroliza en dexametasona. Por ello, estas muestras tendrán que ser pesadas, puestas en MeOH y aplicadas en el momento de su análisis para saber el verdadero contenido de isonicotinato o de dexametasona.

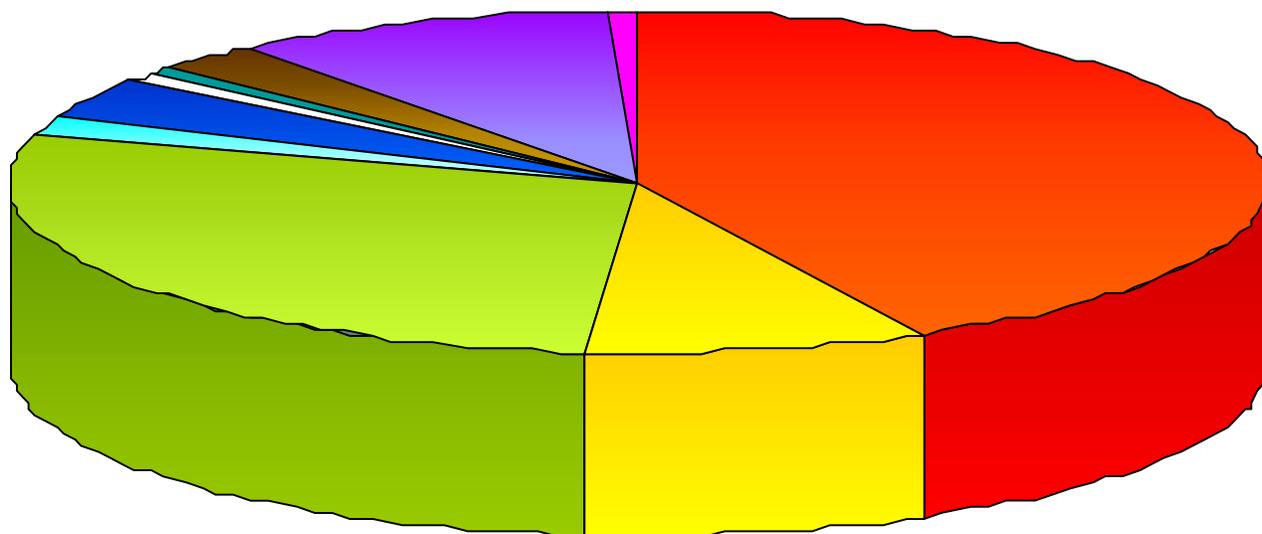
Ester de dexametasona; 11 muestras positivas.

Ester de hidrocortisona; 1 muestra positiva.

Ester de metilprednisolona; 1 muestra positiva.

En la **Figura VII-2** se puede observar la distribución de muestras positivas que aparecieron por la técnica de HPTLC.

Figura VII-2



	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS
 DEXAMETASONA	48
 DEXAMETASONA (+ Prednisolona)	10
 DEXAMETASONA (+ Isonicotinato)	32
 PREDNISOLONA	2
 PREDNISOLONA (+ Hidrocortisona)	4
 BETAMETASONA	1
 HIDROCORTISONA	1
 ISONICOTINATO DE DEXAMETASONA	3
 ESTER DE DEXAMETASONA	11
 ESTER DE METILPREDNISOLONA	1

VII.5.- RESULTADOS DE LA DETECCIÓN POR HPLC

En este estudio se ofrecen los resultados obtenidos en el estudio de la separación de siete corticosteroides en diferentes columnas cromatográficas con variaciones en el pH, temperatura, composición de la fase móvil, etc, evaluando los tiempos de retención en función del tiempo de retención de la dexametasona. Todas las pruebas se realizaron con HPLC-DAD. Los resultados de este estudio pueden ser aplicados al desarrollo de métodos analíticos para la determinación de corticosteroides.

5.1.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS SYMMETRY C₁₈ EN UN SISTEMA HPLC.

Los resultados obtenidos con los distintos parámetros evaluados fueron los siguientes;

Influencia de la proporción de MeOH/H₂O: Cuando se inyectaron los siete corticosteroides con distintas proporciones de MeOH/H₂O: 100/0, 90/10, 85/15, 80/20, y 70/30, se observó que en ninguno de los casos la separación de dexametasona y betametasona es posible, aunque tiene repercusión en los tiempos de retención (Tr.).

Tabla VII-11

PATRONES	MeOH/H₂O (70/30)	MeOH/H₂O (80/20)	MeOH/H₂O (85/15)	MeOH/H₂O (90/10)	MeOH (100)
Dexametasona Tr:	6.18	4.12	3.69	3.43	3.02
Dexametasona Trr:	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Betametasona	0.99	1.00	1.00	1.00	0.99
Prednisolona	0.83	0.93	0.96	0.98	1.00
Triamcinolona	0.53	0.74	1.28	1.09	0.95
Beclometasona	1.07	1.04	1.04	1.02	0.99
Prednisona	1.00	1.00	0.99	0.99	0.96

Hidro cortisona	0.84	0.94	0.97	0.99	1.00
-----------------	------	------	------	------	------

En la **Tabla VII-11** se observa que con una variación del 30% de la proporción de H₂O en la fase móvil con este tipo de columna los Tr. de la dexametasona varían hasta 3 minutos pero aún así la dexametasona y la betametasona no pueden separarse.

*Influencia de la presencia de MeOH o de acetonitrilo en la fase móvil; Se inyectaron tres corticosteroides con dos fases móviles diferentes; MeOH/Fosfato disódico 0.02M pH7 (55/45) y Acetonitrilo/ Fosfato disódico 0.02M pH7 (55/45). Se observó que con el acetonitrilo se obtienen Tr. excesivamente bajos. Así, la dexametasona con la fase móvil que contiene MeOH tiene un Tr. de 11.1 min. mientras que con acetonitrilo su Tr. es de 2.87 min. con mala separación de dexametasona y betametasona en ambos casos, no separándose tampoco del otro corticosteroide inyectado, la prednisolona, y se observa en la **Tabla VII-12**.*

Tabla VII-12

PATRONES	MeOH/Tampón fosfato 0,02M pH7 (45/55)	
Dexametasona Tr:	11.1	2.87
	1.00	1.00
Betametasona	0.99	0.99
Prednisolona	0.65	0.81

El que se utilice tampón fosfato disódico o potásico no influye en nada, al igual que si se utiliza pH 4 ó pH 7, tampoco tiene ninguna influencia en la separación y Tr. de los corticosteroides.

Influencia de la proporción de disolvente orgánico en la mezcla anterior: Cuando se modifica la relación de MeOH/Fosfato disódico 0.02M pH7 (55/45) a (50/50), se produce un retraso de aproximadamente 10 min. en el Tr de algunos de los corticosteroides aunque se separan muy ligeramente la dexametasona, betametasona y metilprednisolona.

Tabla VII-13

PATRONES	MeOH/Tampón fosfato 0,02M pH7 (50/50)	MeOH/Tampón fosfato 0,02M pH7 (55/45)
Dexametasona Tr:	20.80	11.10
Dexametasona Trr:	1.00	1.00
Betametasona	0.98	0.99
Prednisolona	0.57	0.65
Metilprednisolona	1.04	1.08
Flumetasona	0.89	0.9

Influencia del pH del tampón: Si el tampón utilizado en la fase móvil en vez de tener un pH 7 tiene un pH 3, los Tr. no presentan excesiva variación. Por ejemplo, con una fase móvil de MeOH/ Fosfato disódico 0.02M pH7 (55/45) la dexametasona aparece a un Tr. de 11.23 min. y con MeOH/ Fosfato disódico 0.02M pH3 (55/45) el Tr. es de 12.6 min. Por lo tanto variaciones del pH no tienen una gran influencia en el Tr. ni en la separación como se ve en **Tabla VII-14**.

Tabla VII-14

Influencia de la concentración del tampón; Variaciones en la molaridad del tampón no provocan cambios significativos en los Tr. Un cambio de 0.02 M a 0.05 M produce diferencias en el Tr. de la dexametasona de sólo 0.23 segundos como se muestra en

PATRONES	MeOH/Tampón fosfato 0,02M pH 7 (55/45)	MeOH/Tampón fosfato 0,02M (55/45)
Dexametasona Tr:	11.23	12.60
Dexametasona Trr:	1.00	1.00
Betametasona	0.99	0.96
Prednisolona	0.65	0.62
Metilprednisolona	1.08	1.03
Flumetasona	0.89	0.90

la **Tabla VII-15**.

PATRONES	CH3CN/Tampón fosfato 0,02M pH7 (45/55)	CH3CN/Tampón fosfato 0,05M pH7 (45/55)
Dexametasona Tr:	2.87	2.64
Dexametasona Trr:	1.00	1.00
Prednisolona	0.81	0.89

PATRONES	THF/MeOH/Tampón fosfato 0,02M pH7 (10/40/50)	THF/MeOH/Tampón fosfato 0,02M pH7 (5/45/50)
Dexametasona Tr :	14.60	12.21
Dexametasona Trr:	1.00	1.00
Betametasona	0.98	0.95
Prednisolona	0.54	0.59
Metilprednisolona	0.91	0.99
Flumetasona	1.03	1.05

Influencia de la presencia de tetrahidrofurano: La presencia de tetrahidrofurano (THF) en la mezcla de la fase móvil tanto con MeOH como con acetonitrilo, produce cambios en el orden de elución de los corticosteroides aunque la separación entre los mismos no mejora considerablemente, apareciendo en ambos casos la flumetasona en último lugar, como puede verse en la **Tabla VII-16**.

Tabla VII-16

Para separar la dexametasona de la betametasona y metilprednisolona con un tiempo de análisis inferior a 20 min. en una columna Symmetry C_{18} es necesario introducir tetrahidrofurano en la fase móvil en un porcentaje de un 5-25%. Los resultados figuran en la **Tabla VII-17**.

Tabla VII-17

PATRONES	THF/CH₃CN/Tampón fosfato 0,02M pH7 (26/4/70)	THF/CH₃CN/Tampón fosfato 0,02M pH7 (25/5/75)
Dexametasona Tr :	10.92	9.66
Dexametasona Trr:	1.00	1.00
Betametasona	0.93	0.94
Prednisolona	0.53	0.82
Metilprednisolona	0.82	0.56
Flumetasona	1.69	1.45

De los resultados obtenidos con el tipo de columnas Symmetry C₁₈ se considera que la mejor fase móvil para ese tipo de columnas es la siguiente; THF/CH₃CN/Fosfato disódico 0.02M pH7 (25/5/75), ya que con ella es con la que mejor se separan los isómeros dexametasona y betametasona y además el tiempo de análisis no es excesivamente elevado.

5.2.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS SYMMETRY SHIELD C₈ EN UN SISTEMA HPLC.

Los resultados obtenidos, con la fase móvil elegida en el capítulo anterior, con la columna Symmetry Shield C₈ (3.9 x 150) fueron muy similares a los obtenidos con Symmetry C₁₈ y se representan en la **Tabla VII-18**.

Tabla VII-18

PATRONES	THF/CH₃CN/Tampón fosfato 0,02M pH7 (25/5/75)
Dexametasona Tr:	10,02
Dexametasona Trr:	1,00
Betametasona	0,93
Prednisolona	0,55
Metilprednisolona	0,80
Flumetasona	1,56
Triamcinolona	0,38

5.3.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS NOVAPAK C₁₈ EN UN SISTEMA HPLC.

Como alternativa a las columnas Symmetry, que requerían la presencia de tetrahidrofurano en la fase móvil, se eligió una columna igualmente C₁₈, NovaPak C₁₈ pero de mayor longitud (4.6 x 250mm) 4 μ m, realizando un estudio sobre la influencia de la fase orgánica, como se presenta en la **Tabla VII-19**.

Se observó que la variación que existe en los Tr. en los diferentes casos con estas fases móviles es pequeña. Se inyectaron, en este caso, algunos ésteres de

corticosteroides para darnos una idea de con que Tr. aparecen los ésteres debido a

PATRONES	MeOH/THF/H₂O (70/2/28)	MeOH/CH₃CN/H₂O (70/4/26)	CH₃CN/H₂O (40/60)	MeOH/H₂O (70/30)	MeOH/H₂O (80/20)
Dexametasona Tr:	5,42	5,41	5,82	6,25	4,38
Dexametasona Trr:	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Betametasona	0,98	0,99	1,00	1,03	1,00
Prednisolona	0,88	0,88	1,00	0,85	0,94
Triamcinolona	0,70		0,82	0,65	0,80
Beclometasona	1,03	1,03		1,05	1,03
Prednisona	0,8	0,82	1,06	0,77	0,89
Hidrocortisona	0,89	0,90	1,04	0,89	0,95
Valerato de betametasona	0,99	0,98			1,00
Dipropionato de beclometasona	1,04	1,02			1,40
Acetato de cortisona	0,82	0,83	1,11	0,81	0,90
Acetato de fludrocortisona	0,85	0,85	1,06	0,85	0,92

su diferente polaridad y observar si se separaban adecuadamente.

Tabla VII-19

También se comparó este tipo de columna, con patrones de corticosteroides, con columnas de menor tamaño, NovaPak C₁₈ (8 x 100 mm) 4 μ m con compresión radial, con una fase móvil formada por CH₃CN/H₂O (30/70).

Tabla VII-20

PATRONES	NovaPack C ₁₈ 4m (8x100)	NovaPack C ₁₈ 4m (4.6x250)
	CH ₃ CN/H ₂ O (30/70)	CH ₃ CN/H ₂ O (30/70)
Dexametasona Tr:	15,29	14,51
Dexametasona Trr:	1,00	1,00
Betametasona	0,94	0,94
Prednisolona	0,51	0,76
Metilprednisolona	0,83	0,83
Flumetasona	1,06	1,05
Triamcinolona	0,33	0,31

Como se ve en esta tabla, la longitud de la columna no tiene demasiada influencia en los cambios de los Tr. Pero se puede observar que si es posible la separación de los isómeros dexametasona y betametasona, además de la separación del resto de los corticosteroides. La columna Novapack C₁₈ (4.6 x 250mm) 4 μ m proporcionó gran resolución consiguiéndose separar todos los corticosteroides en un tiempo menor de 15 min. con una fase móvil formada por CH₃CN/H₂O (30/70), con un flujo de 1.0 ml./min., sin que sea necesario la adición de ningún modificador a la fase móvil.

5.4.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS PHENOMENEX SYNERGI MAX EN UN SISTEMA HPLC.

La evaluación de la columna Phenomenex Synergi Max 80A C₁₂ (4.6 x 250 mm) 4 μ m, se llevó a cabo con una fase móvil de CH₃CN/H₂O (30/70) ya que en el capítulo anterior se observó que era la que producía mejor separación. Se logró separar perfectamente todos los corticosteroides en un tiempo de 30 min. aproximadamente. Un aumento en la proporción de acetonitrilo del 10% supuso una reducción en el tiempo de análisis de 18 min. pero sin tener una separación hasta línea base de la dexametasona y betametasona. Por ello se concluyó que probablemente una mezcla de 35/65 sería la más adecuada con esta columna, como se muestra en la **Tabla VII-21**.

Tabla VII-21

PATRONES	CH₃CN/H₂O (40/60) Flow: 1ml./min. T^a: 22°C	CH₃CN/H₂O (30/70) Flow: 1ml./min. T^a: 22°C
Dexametasona Tr:	8,62	22,98
Dexametasona Trr:	1,00	1,00

Betametasona	0,98	0,94
Prednisolona	0,64	0,48
Metilprednisolona	0,88	0,83
Flumetasona	1,10	1,12
Triamcinolona	0,47	0,29
Beclometasona		

Un parámetro que se introdujo a la hora de evaluar estas columnas fue la temperatura. Todos los análisis realizados hasta el momento se realizaron a T^a ambiente pero si incrementamos esta T^a hasta 40°C con una fase móvil de CH₃CN/H₂O (30/70), un flujo de 1.2 ml./min. y una columna (4.6 x 250 mm) 4 μm. se reduce el tiempo de análisis de 22.98 min. a 15.94 min. para la dexametasona

manteniéndose una buena separación del resto de los corticosteroides como se

observa

Tabla
22.

PATRONES	CH₃CN/H₂O (30/70) Flow: 1ml./min. T^a: 22°C	CH₃CN/H₂O (30/70) Flow: 1,2 ml./min. T^a: 40°C
Dexametasona Tr:	22,98	15,94
Dexametasona Trr:	1,00	1,00
Betametasona	0,94	0,94
Prednisolona	0,48	0,53
Metilprednisolona	0,83	0,8
Flumetasona	1,12	1,07
Triamcinolona	0,29	0,31

en la
VII-

Tabla VII-22

5.5.- RESULTADO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN COLUMNAS DIOL EN UN SISTEMA HPLC.

Con una fase móvil formada por Hexano/Isopropanol (90/10), una velocidad de flujo de 2.5 ml./min y una columna Lichrosorb Diol (4 x 125) 5 µm, se intentó separar los distintos corticosteroides.

Como puede observarse en la **Tabla VII-23**, con estas condiciones se pudo separar dexametasona de betametasona, aunque la separación de betametasona, prednisolona y beclometasona no fue suficiente. Esto, junto con el elevado gasto de disolventes orgánicos, y el inconveniente que supone el no poder utilizar fases móviles con una base acuosa y las consecuencias que este factor tiene a la hora de compartir instrumental con otras fases móviles, hace de esta columna un sistema poco viable e incómodo para la detección de los corticosteroides.

Tabla VII-23

PATRONES		Hexano/Isopropanol (90/10)
Dexametasona	Tr:	9,76
Dexametasona	Trr:	1,00
Betametasona		1,06
Prednisolona		1,06
Triamcinolona		0,76
Beclometasona		1,08
Prednisona		0,64
Hidrocortisona		0,93
Valerato de betametasona		0,34
Acetónido de triamcinolona		0,60
Diacetato de triamcinolona		0,59
Dipropionato de beclometasona		0,13
Acetato de cortisona		0,27
Acetato de fludrocortisona		0,34
Acetato de metilprednisolona		0,31

Al igual que con las columnas NovaPack, en este caso también se estudiaron los resultados de la inyección en este tipo de columnas de ésteres de corticosteroides. Al ser una columna de fase normal, los ésteres son menos retenidos y aparecen con un Tr. menor en el cromatograma que la mayoría de los corticosteroides.

De los resultados obtenidos con el tipo de columnas Symmetry C₁₈ se considera que la mejor fase móvil para ese tipo de columnas es la siguiente; THF/CH₃CN/Fosfato disódico 0.02M pH7 (25/5/75), ya que con ella es con la que mejor se separan los isómeros dexametasona y betametasona y además el tiempo de análisis no es excesivamente elevado.

5.6.- RESULTADOS EN LA DETERMINACIÓN DE DEXAMETASONA EN PIENSOS POR HPLC

Los resultados de los experimentos realizados expuestos en el apartado VI-VI.2-2.6 se presentan en la **Tabla VII-24**. El coeficiente de correlación obtenido es de $r^2=0.9998$. El espectro de los picos obtenidos fueron comparados con el espectro del patrón de dexametasona. En la **Figura VII-3** se presenta el típico cromatograma de un patrón de dexametasona junto con el cromatograma de un pienso y el cromatograma de ese mismo pienso enriquecido con 440 ng.g^{-1} de dexametasona.

En la **Figura VII-4** se presentan los cromatogramas y el espectro de un patrón de dexametasona y un pienso con presencia de esta sustancia en una cantidad de 780 ng.g^{-1} .

La repetibilidad del método evaluada en las seis muestras de pienso añadidas con 88 ng.g^{-1} de dexametasona, presentan una recuperación media de 46.3% con una desviación standard de 7.4%.

VII.6.- RESULTADOS DE LA DETECCIÓN POR GC-MS

Los patrones de corticosteroides oxidados y analizados por GC-MS con las condiciones que se presentan en el apartado (VI-VI.2-2.3) presentan los cromatogramas y los fragmentos de los iones de masa que se exponen en la **Figura VII-5**.

Fragmentos de los iones de los distintos corticosteroides fueron los siguientes;

Dexametasona: 310, 330, 295.

Betametasona: 310, 330, 295.

Tabla VII-24

Figura VII-3

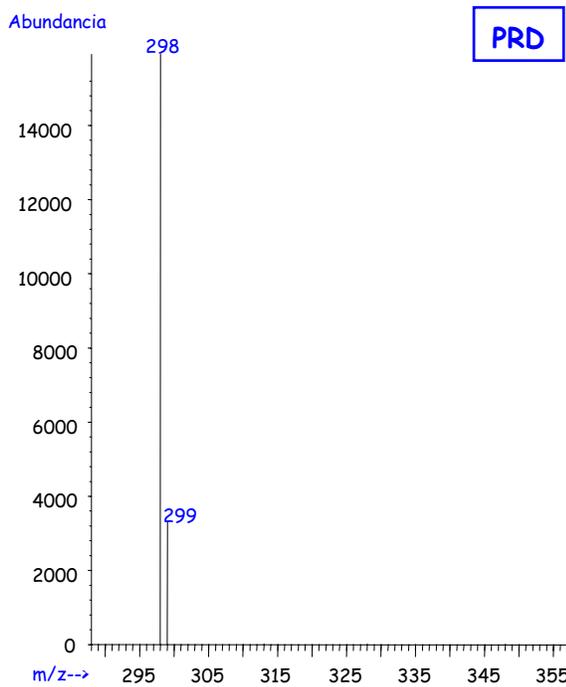
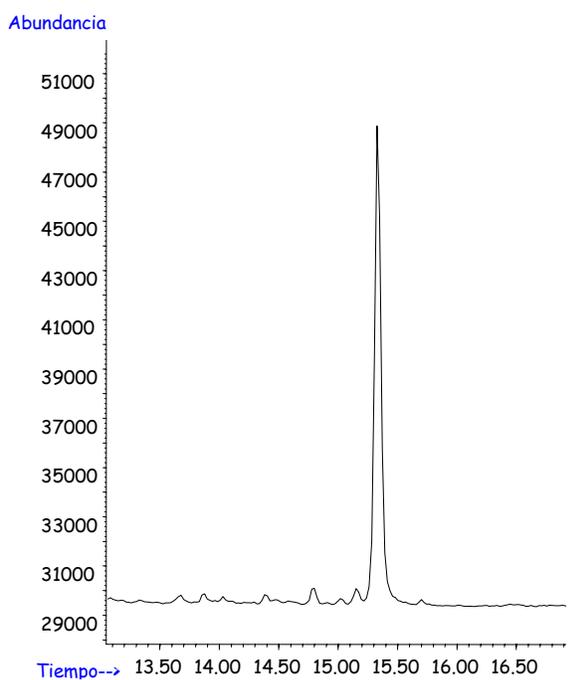
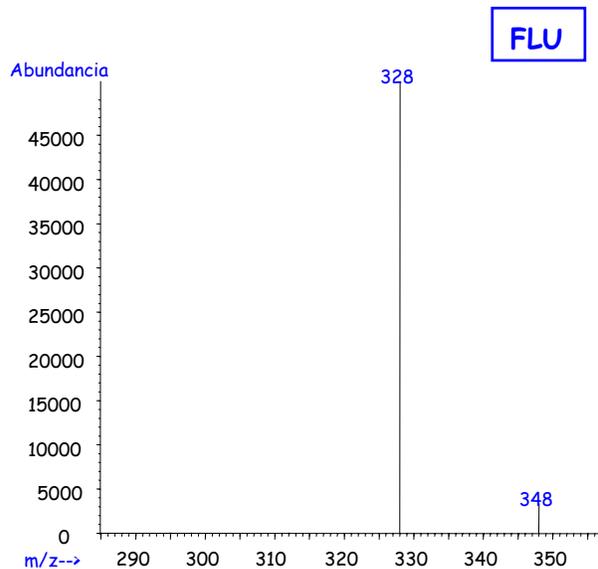
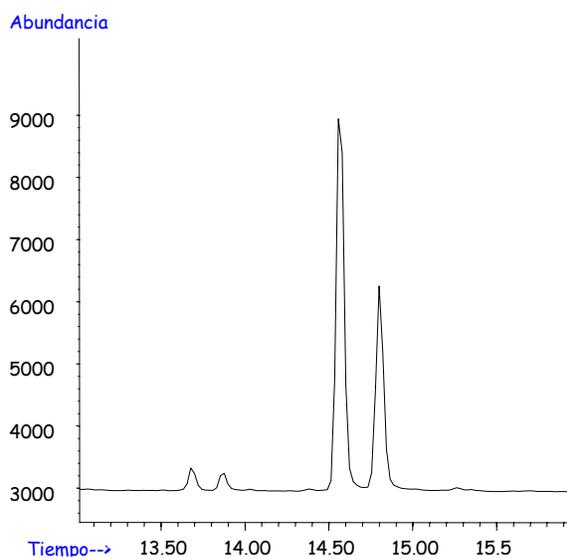
Figura VII-4

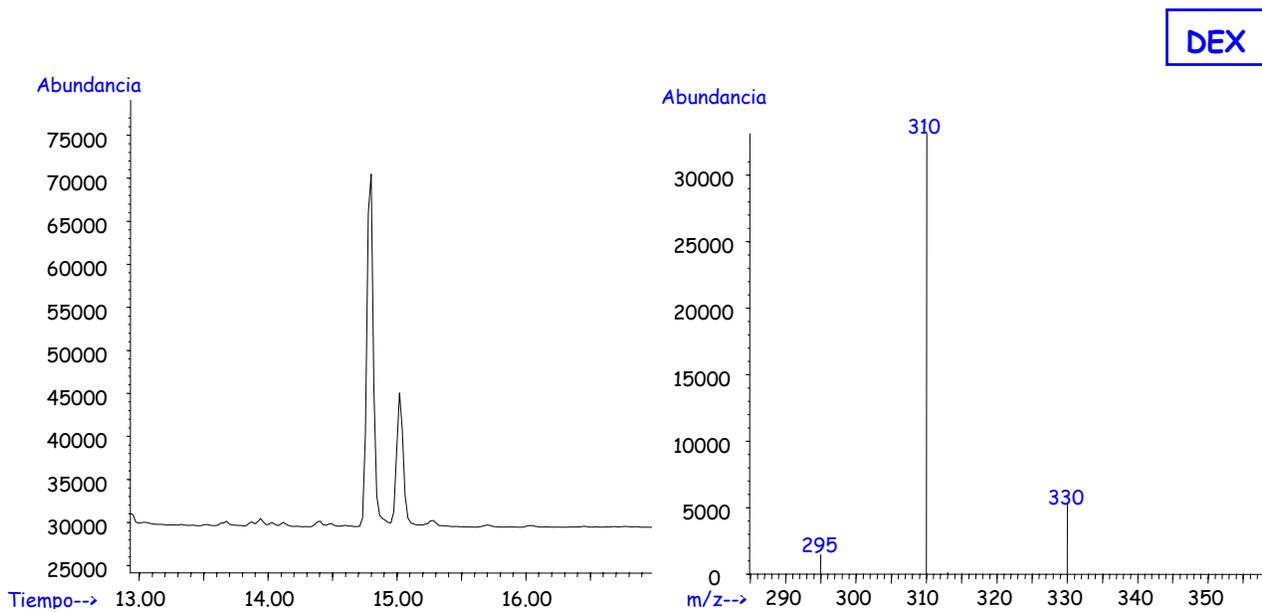
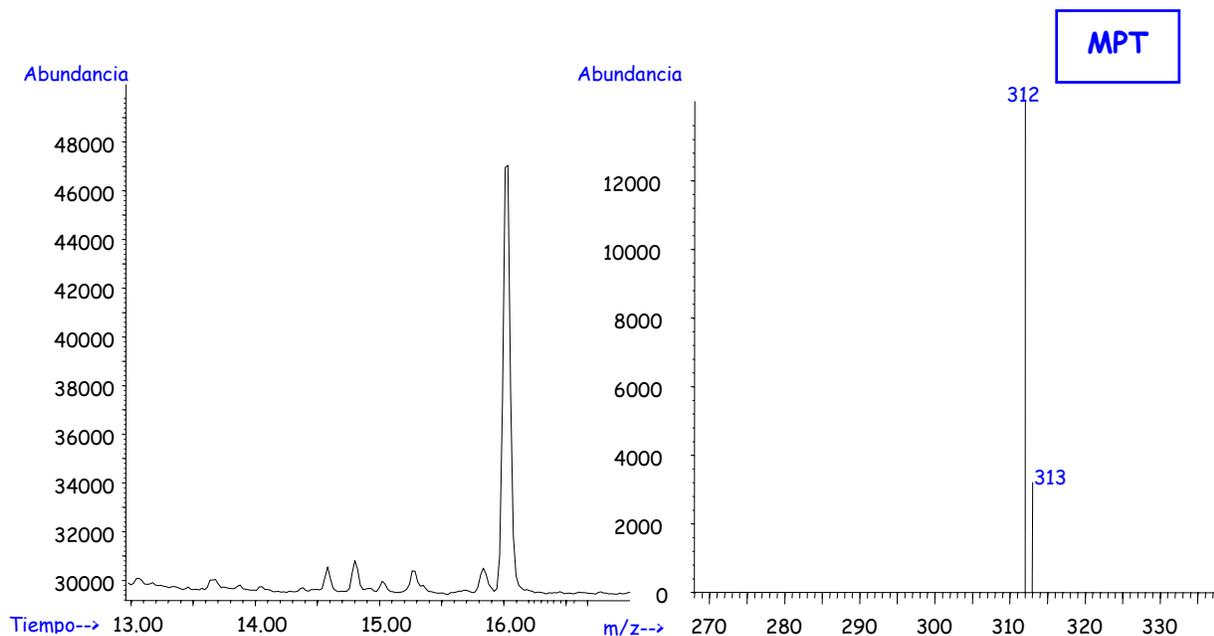
Prednisolona: 298, 299.

Metilprednisolona: 312, 313.

Flumetasona: 328, 348.

Figura VII-5





La dexametasona produce dos isómeros, el 16α y el 16β metil epímeros, que cromatográficamente pueden separarse. Al igual que la dexametasona, la betametasona (que presenta los mismos fragmentos que la dexametasona) y la flumetasona, también presentan dos isómeros.

Esta sensible determinación vía GC-MS después de una oxidación con clorocromato piridina, es aplicable a los más importantes corticosteroides, tales como dexametasona, betametasona, flumetasona, metilprednisolona, etc. Sin embargo la triamcinolona es resistente a este tipo de derivatización. La determinación de triamcinolona llevada a cabo ofreció como resultado lo siguiente: Se observó que tanto la triamcinolona como la triamcinolona acetónido ofrecen los mismos resultados. Las masas de los iones que aparecen fueron 296, 316 y 281 y se representan en la **Figura VII-6**. Si inyectamos la misma cantidad de triamcinolona y de dexametasona derivatizadas, en el caso de la triamcinolona la respuesta obtenida es diez veces menor que la respuesta de la dexametasona.

6.1.- RESULTADOS EN LA DETECCION DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS DE ORINA POR GC-MS.

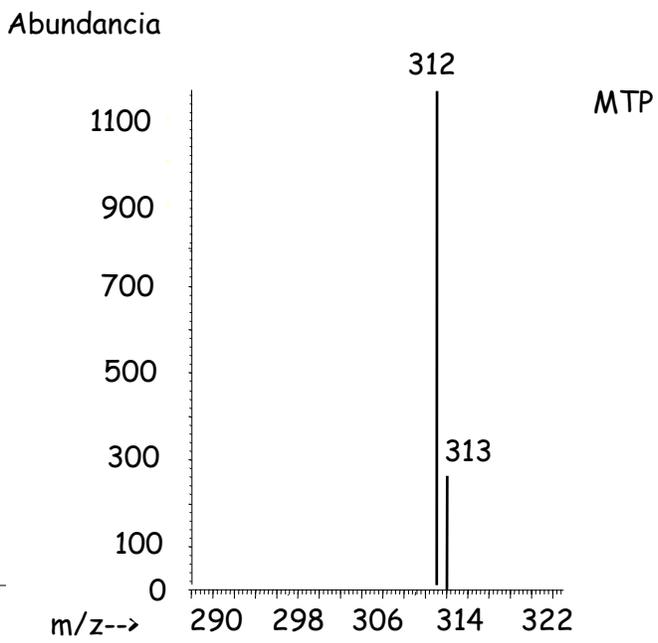
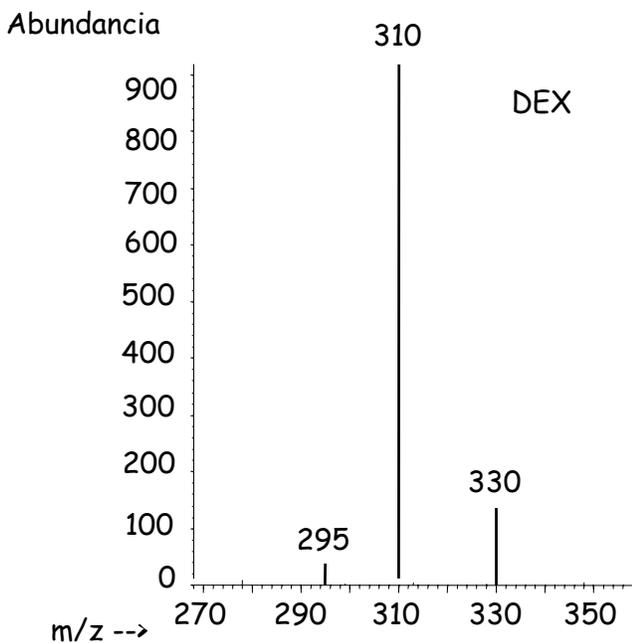
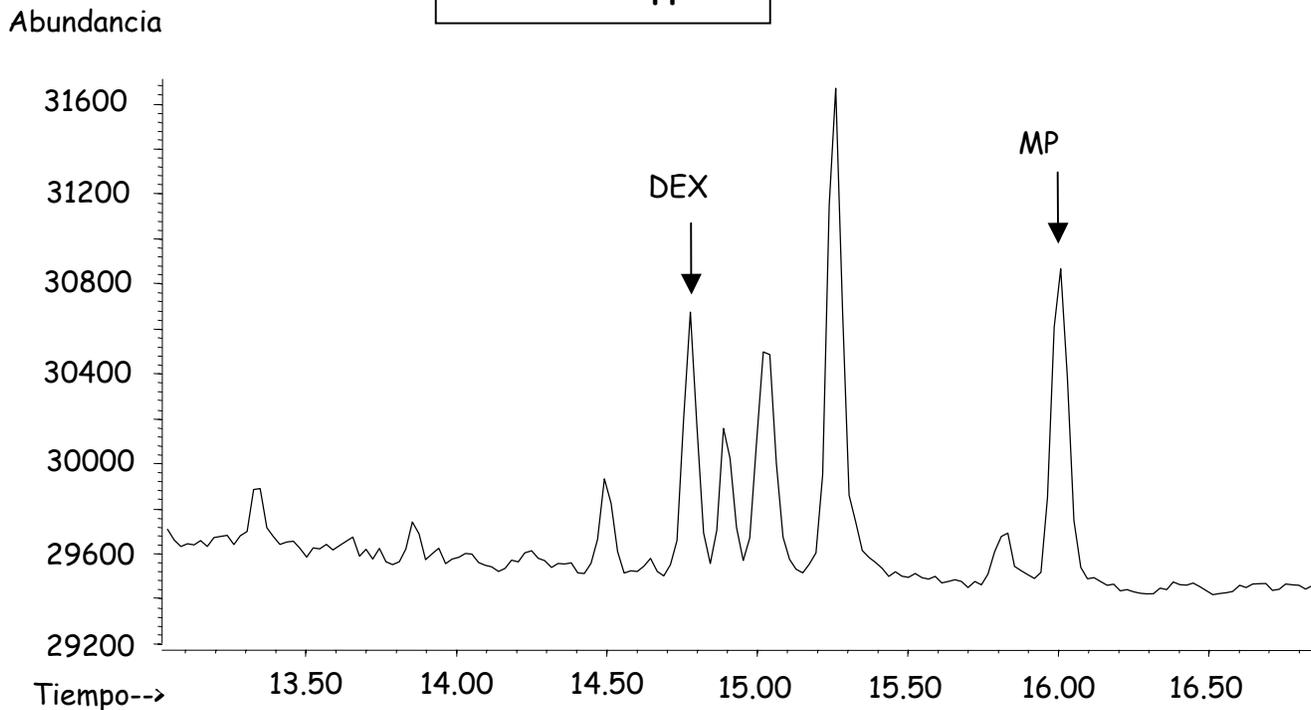
Un ejemplo de los cromatogramas y de los iones obtenidos con una orina añadida con 1 ng.ml.^{-1} de patrón de dexametasona y analizada con el método propuesto, se muestran en el **Figura VII-7**.

Efecto matriz: Cuando se analizaron las muestras de orina con el equipo y las condiciones descritas de GC-MS, se encontró una respuesta muy superior a cuando la misma cantidad de patrón de dexametasona era analizada aisladamente (sin muestra).

Los resultados obtenidos en este experimento son representados en **Figura VII-8** y como puede observarse, mientras mayor es la concentración de orina, mayor es la

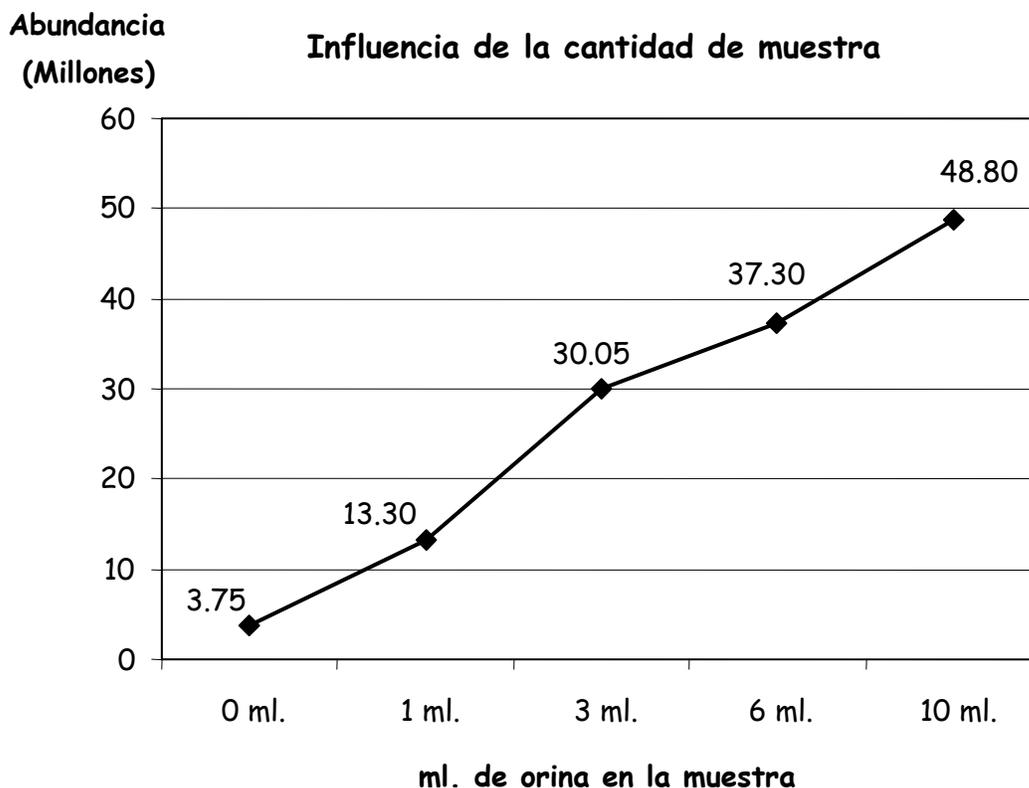
Figura VII-7

Orina + 1ppb



abundancia de los iones, aunque todas las muestras tenían la misma cantidad de dexametasona (20 ng).

Figura VII-8



Los resultados de las abundancias obtenidas son representados en **Tabla VII-24**, donde el extracto de orina derivatizada no tuvo respuesta, el patrón de dexametasona tuvo una respuesta más bien baja, pero la misma cantidad de dexametasona en presencia de este extracto de orina produjo una respuesta diez veces de más alta.

Tabla VII-24

	Extractos derivatizados (30 µl)	Inyección	Abundancias obtenidas
A	Orina negativa	1 µl	< 10
B	0.64 ng patrón DEX.	1 µl	3532
C	A + B (1 + 1)	2 µl	43063
D	1.28 ng patrón DEX.	1 µl	8811
E	A + D (1 + 1)	2 µl	90392

Curvas de calibración, linealidad, repetibilidad y reproducibilidad:

La repetibilidad del factor de respuesta fue determinado y produjo un coeficiente de variación de 14.1 %. Los resultados son presentados en **Tabla VII-25**.

Como puede observarse, según los valores en **Tabla VII-25**, la relación entre la concentración DEX/MTP y la proporción de abundancias produjeron valores diferentes, dependiendo del día y no de la clase de muestra: Los análisis intra-día tienen coeficientes de variación (CV) más bajos del 16%.

Es decir, el valor medio de todos los factores de respuesta obtenidos diariamente producen un coeficiente de variación (CV) muy alto (41.3%).

El coeficiente de correlación (r) de las curvas de calibración es suficientemente bueno:

$$Y = 1.85 x + 0.01 \quad (r = 0.9926)$$

Tabla VII-25

	(m/z) 295/310		(m/z) 330/310	
	Valor medio	CV (%)	Valor medio	CV (%)
Día 1	0.0187	4.8	0.1617	2.1
Día 2	0.0180	2.7	0.1570	2.0
Día 3	0.0200	2.5	0.1700	4.4
Día 4	0.0180	5.0	0.1750	4.1
Día 5	0.0195	6.6	0.1730	3.0
Día 6	0.0170	13.5	0.1880	5.3
Día 7	0.0315	7.3	0.1820	2.3

El repetibilidad y la reproducibilidad de los ratios de las abundancias de los fragmentos de dexametasona obtenidos son altas. La repetibilidad (intra-día) y la reproducibilidad (en días diferentes, "inter-día", en un periodo de tres meses) de los ratios obtenidos en las muestras añadidas en diferentes días se calcularon y son presentadas en la **Tabla VII-26**.

Tabla VII-26

REPETIBILIDAD/REPRODUCIBILIDAD	Factor Respuesta (valor medio)	CV (%)	n
Mismo día, misma muestra de orina (añadida con 0.5 ng ml. ⁻¹)	2.63	14.1	5
Día A, diferentes muestras de orina (añadidas con 0.4-2 ng ml. ⁻¹)	4.29	13.1	5
Día B, diferentes muestras de orina (añadidas con 0.4-2 ng ml. ⁻¹)	1.73	15.5	7
Día C, diferentes muestras de orina (añadidas con 0.4-2 ng ml. ⁻¹)	2.14	13.4	8
Diferentes días, diferentes muestras de orina (añadidas con 0.4-2 ng ml. ⁻¹)	2.52	41.3	5*

*(Valores medios diarios)

Detección de otros corticosteroides (FLU y PRD) en orina:

Los datos expuestos sólo eran para dexametasona, pero como muestra la **Figura VII-9**, otros corticosteroides (FLU y PRD) también pueden ser detectados por este método de detección. Aquí se muestra un cromatograma de una orina enriquecida con dexametasona, flumetasona, prednisolona y metilprednisolona como IS. Junto al cromatograma se pueden ver los iones de cada una de las sustancias.

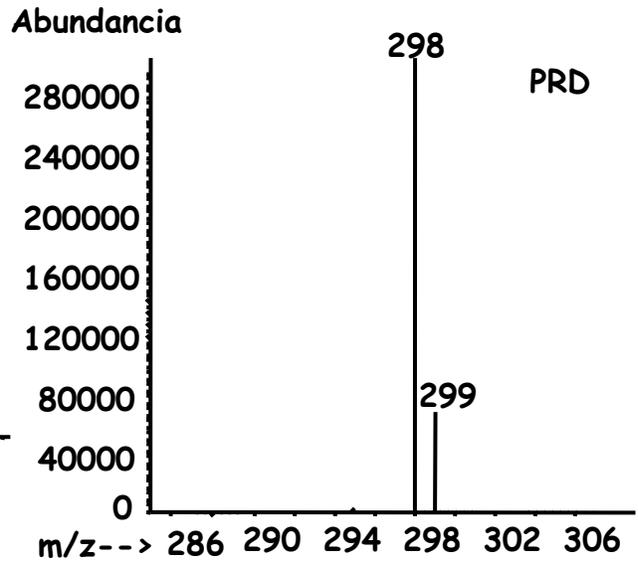
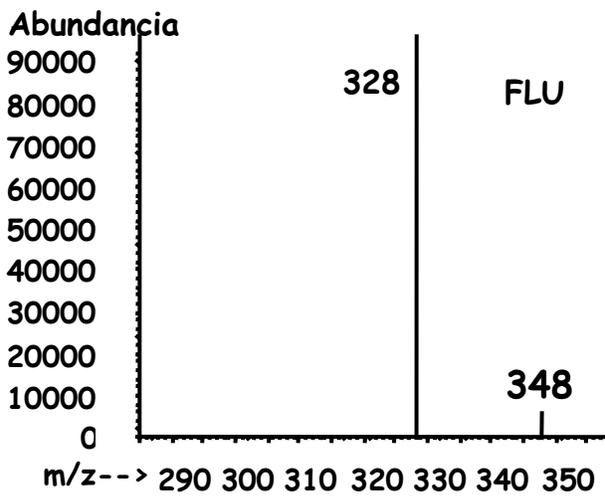
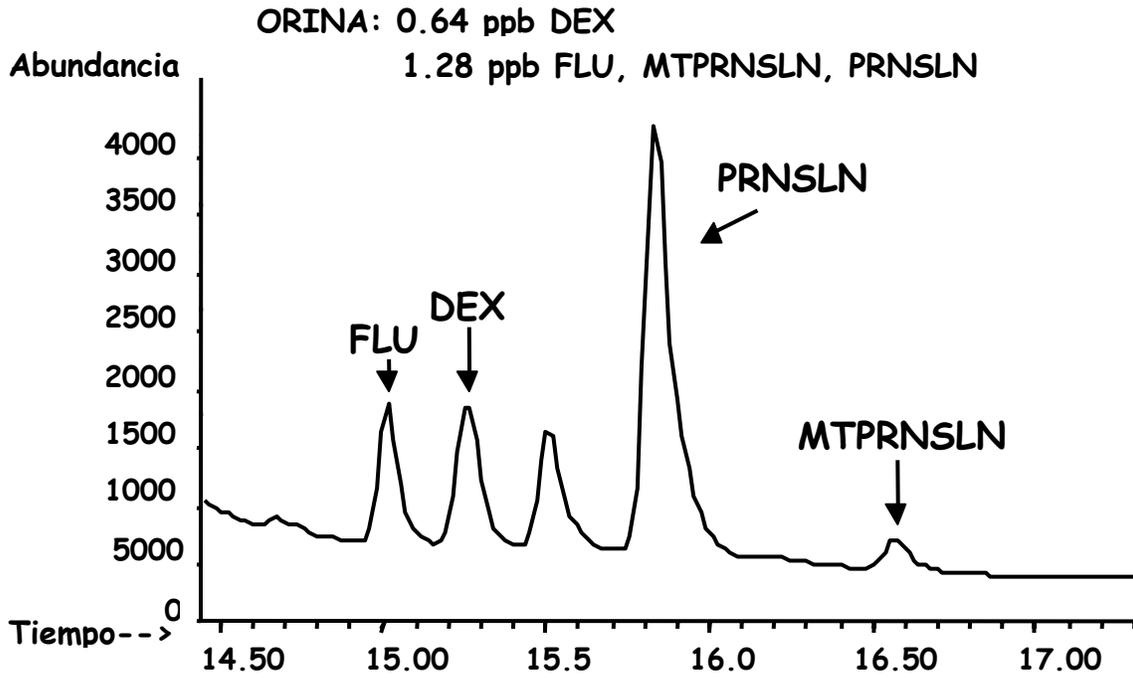
6.2.- RESULTADOS EN LA DETECCIÓN DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS DE HIGADO, RIÑÓN Y PIENSOS POR GC-MS.

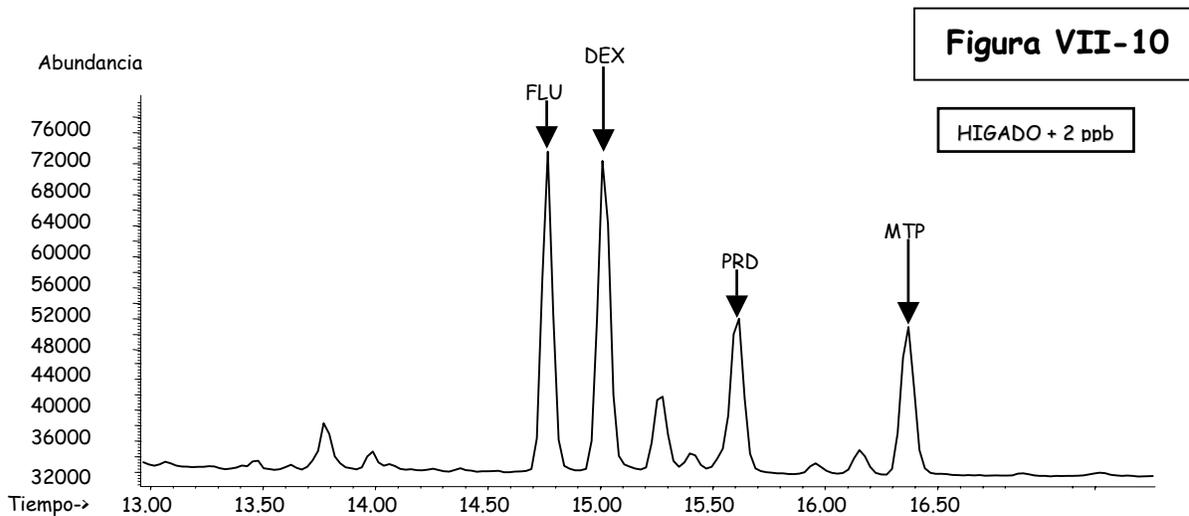
Este método propuesto para orina también puede aplicarse al análisis de muestras de hígado, riñón y pienso, con una ligera modificación en el método de extracción como ya se indicó en apartados anteriores. A título de ejemplo, se presenta en la **Figura VII-10** un cromatograma de una muestra de hígado negativo enriquecido con 2 ppb de dexametasona (2 ppb es el LMR establecido en hígado para la dexametasona), prednisolona, flumetasona y metilprednisolona como IS.

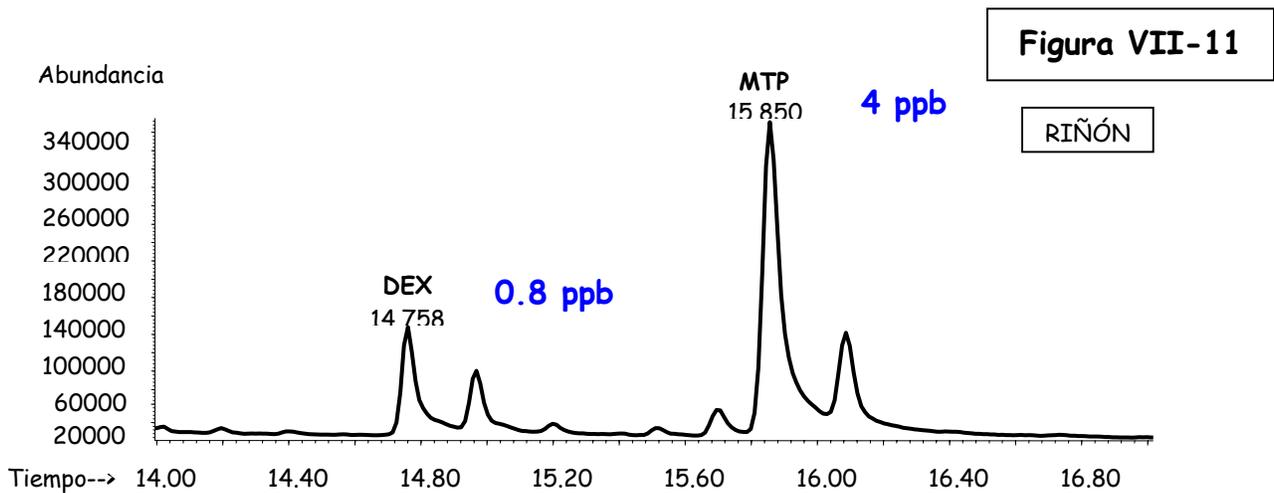
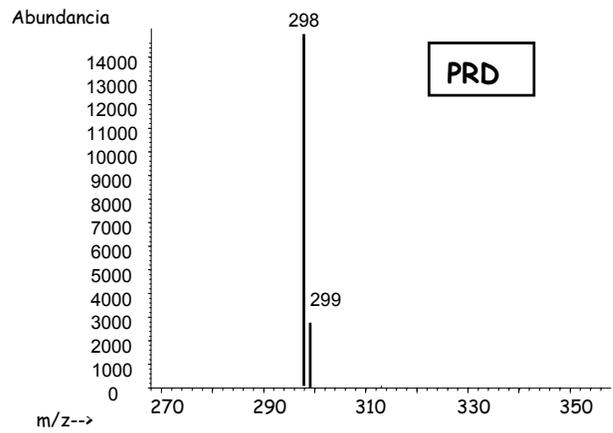
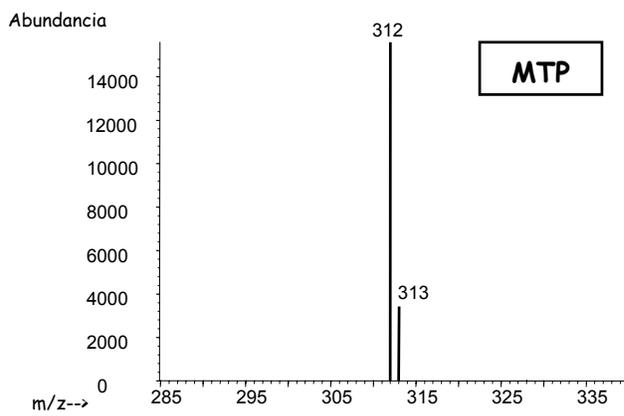
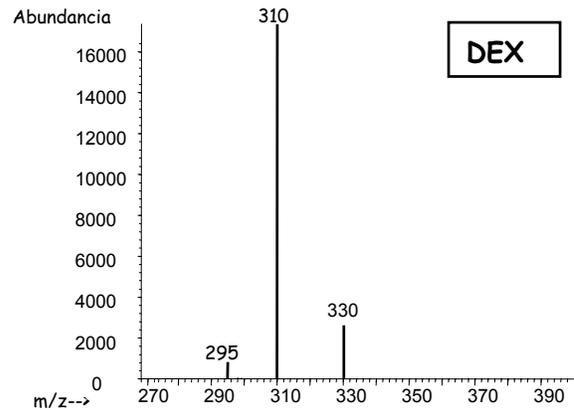
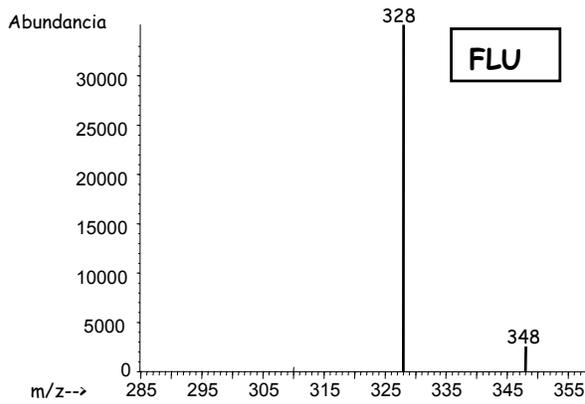
La detección de la presencia de dexametasona en las muestras fue efectuada comprobando la presencia de un pico en el tiempo de retención ($\pm 0.5\%$) del patrón de la dexametasona y la presencia de los iones diagnósticos con masas 310, 330 y 295, al igual que con el resto de los corticosteroides analizados.

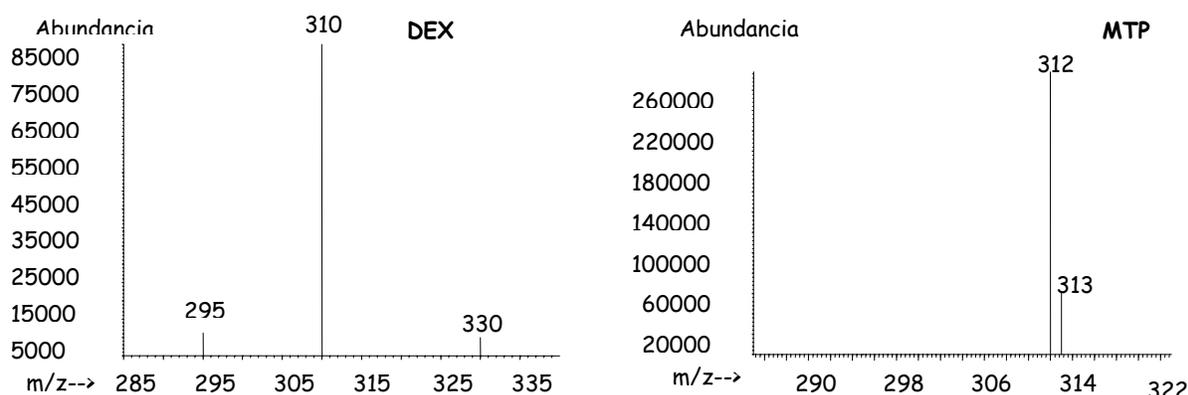
En la **Figura VII-11** se muestra el cromatograma de una muestra de riñón positiva a la presencia de dexametasona (LMR en riñón para dexametasona: 0.75 ppb) analizada con el método expuesto y con 4 ppb de IS añadidos, en el cual se encontraron 0.8 ppb de dexametasona.

Figura VII-9









En cuanto al pienso, en la **Figura VII-12** se puede observar el cromatograma de un pienso enriquecido con 2 ppb de varios corticosteroides (DEX, PRD, FLU, MTD como IS), y a su vez, en la **Figura VII-13** se presenta el cromatograma de un pienso sólo y el mismo pienso añadido con dexametasona, observándose la presencia de dexametasona, en una cantidad de 0.81 ppb de esta sustancia. Este pienso también se enriqueció con IS (MTP) a un nivel de 8 ppb.

Figura VII-12

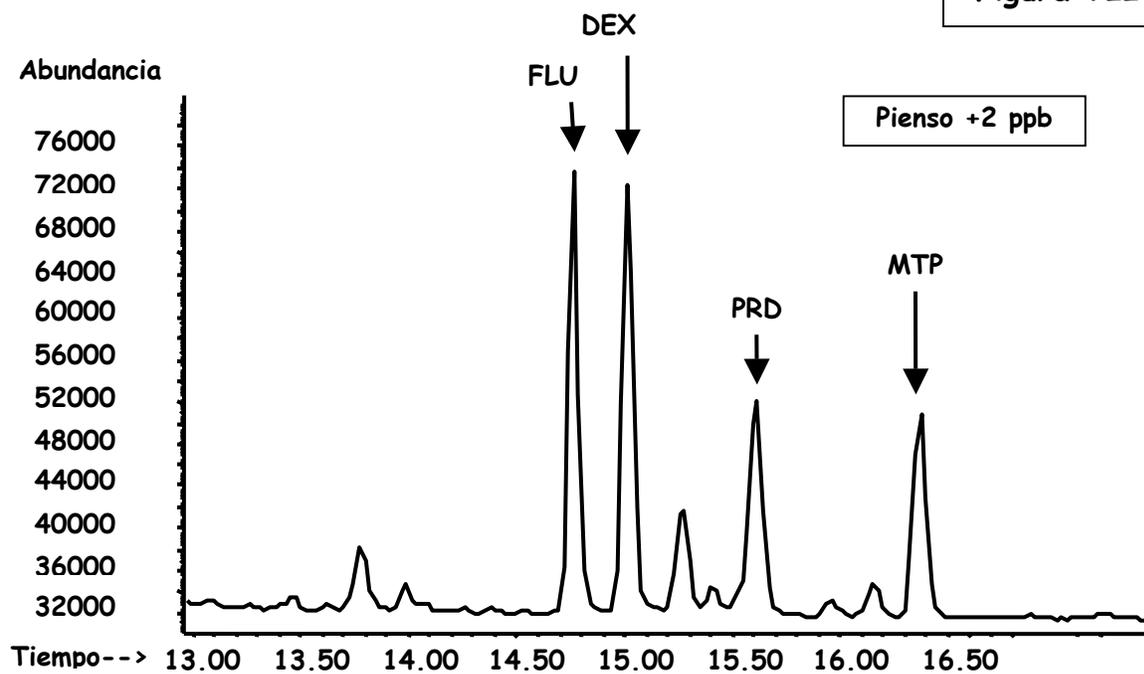
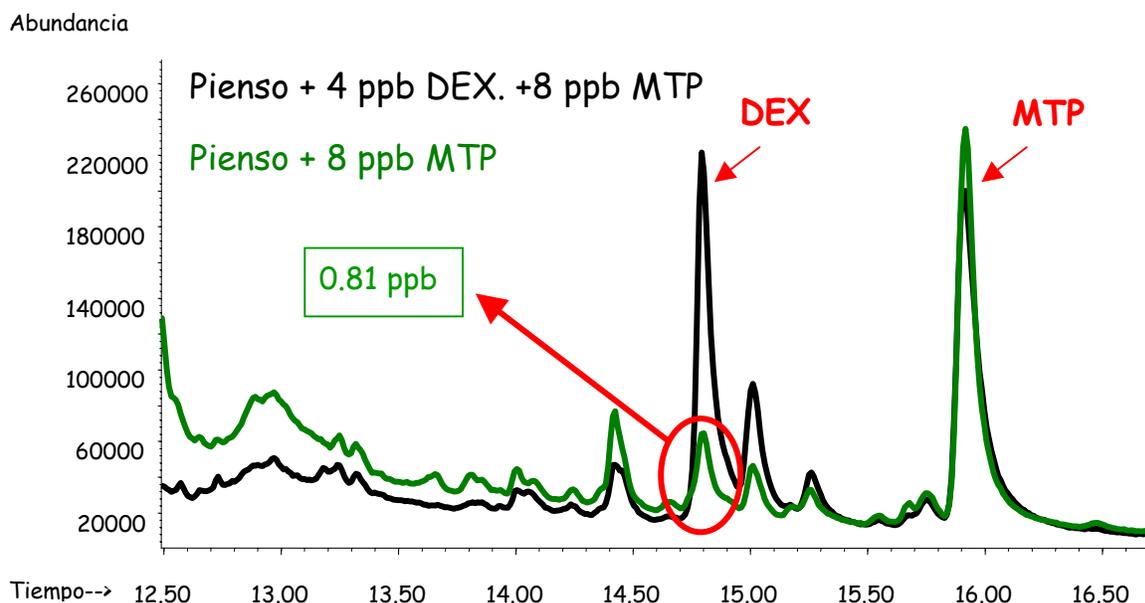


Figura VII-13



6.3.- APLICABILIDAD DEL METODO DE DETECCION POR GC-MS EN MUESTRAS DE ORINA

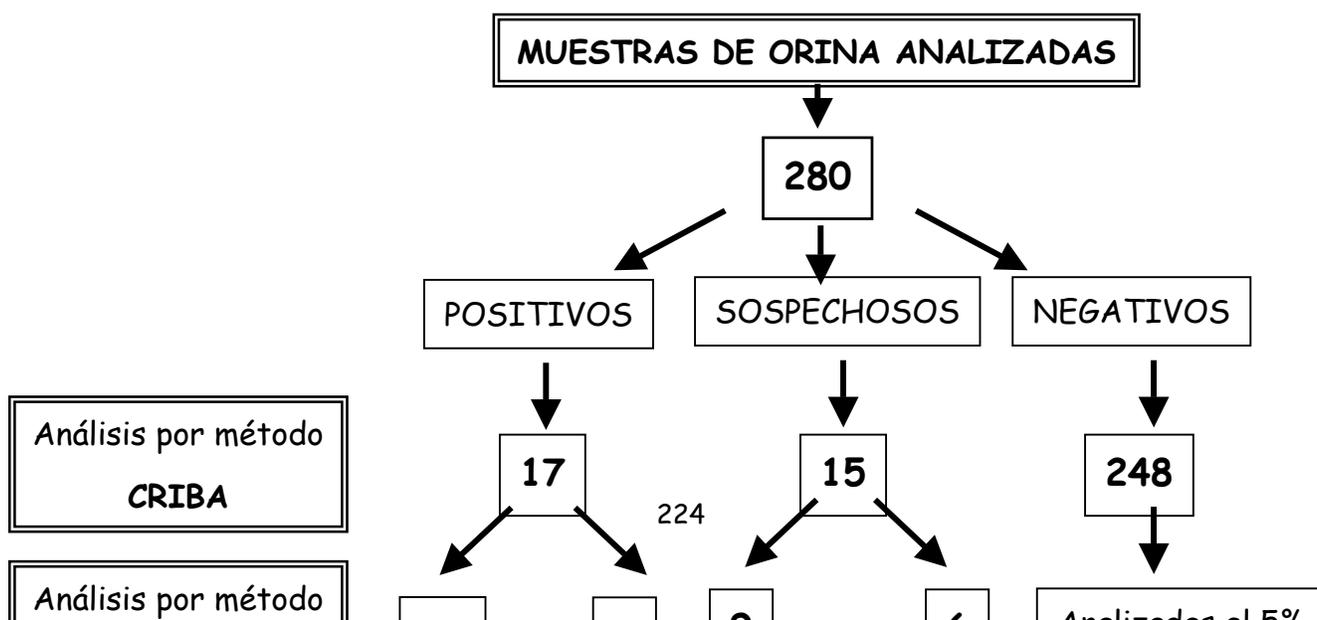
La estrategia y metodología de extracción y purificación aquí expuestas, han sido aplicadas a muestras de orina para la investigación de residuos en la Comunidad Autónoma de Aragón. Durante los años 2000, 2001 y 2002 se han analizado 280 muestras de orina mediante este método pero siendo detectadas con GC-ECD. Las muestras en las que se obtuvieron un resultado positivo o sospechoso con este tipo de detección (con límite de detección de 1 ppb), fueron sometidas al análisis de confirmación en el Laboratorio Nacional de Referencia para estas sustancias (Centro Nacional de Alimentación perteneciente a la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA)), empleando el método basado en la detección e identificación por GC-MS-NCI (Límite de detección; 0.2 ppb).

En la **Tabla VII-27** están representados los resultados de dichas determinaciones. Como se puede observar, el 95 % de las muestras de orina positivas han sido confirmadas por *GC-MS-NCI* como positivas, mientras que en el 60 % de las muestras que dieron un resultado sospechoso, la presencia de dexametasona ha podido ser confirmada por este método. Un resultado "dudoso o sospechoso" puede ser debido a componentes de la propia matriz que pueden producir interferencias en los picos cromatográficos.

Un 5 % del total de muestras negativas se sometieron al análisis de confirmación comprobando en el 100% de las muestras analizadas la ausencia de dexametasona. No obstante, y debido a la diferencia entre los límites de detección del método criba (1 ppb) y del método de confirmación (0.2 ppb), pueden existir muestras con concentraciones de dexametasona inferiores a 1 ppb que no han sido detectadas en el análisis criba.

Mediante este modo de detección (ECD), solamente se podrá detectar la presencia del pico sospechoso por tiempos de retención, debiéndose confirmar el resultado mediante una de las técnicas anteriormente citadas (*GC-MS* o *LC-MS*) cumpliendo la Normativa Europea para estas sustancias (Anónimo, 2002).

Tabla VII-27



VIII.- DISCUSIÓN

VIII.1.- DECONJUGACION DE LOS CORTICOSTEROIDES

La β -glucuronidasa es la enzima más citada habitualmente en la bibliografía. Sin embargo, el intervalo de tiempo de incubación de las muestras con este enzima según distintos autores es muy amplio (2 a 48 hrs). Quizás éste sea el parámetro que más influencia pueda tener en cuanto a la variabilidad de la cantidad de corticosteroides encontrados en una muestra después del proceso de deconjugación. A la vista de los resultados obtenidos para los distintos tiempos de incubación en orina, el tiempo óptimo corresponde a 24 horas. En cambio, para el hígado parece que existe un óptimo de deconjugación entre 2 y 4 horas, descendiendo con el tiempo la cantidad de dexametasona detectada. Por ello, se realizó un estudio más detallado de la incubación de tejidos entre 0 y 4 horas, con las mismas condiciones, optimizando el tiempo de incubación en tejidos como el hígado o el riñón en 4 horas.

En cuanto a la temperatura de incubación, la mayoría de los autores (Courtheyn et al, 1994; Delahaut et al, 1993) consideran los 38°C como la de elección en la deconjugación de los corticosteroides. Por ello, se toma esta temperatura como la óptima para realizar los estudios de la deconjugación. Aunque este resultado difiere del obtenido por Antignac (Antignac, 2001).

Le Bized et al. (1996) utilizan condiciones para la hidrólisis de los esteroides que difieren con los resultados del estudio realizado, en los tres parámetros evaluados, pH 5.2, tiempo de incubación 16 horas y 52°C, pero si comparamos sus resultados con los obtenidos en el presente trabajo y con las pruebas realizadas a 50°C, comprobamos que no es necesario utilizar temperatura superior a 38°C, ni 16 horas en el caso de los tejidos, incluso siendo escaso tiempo si se trata de orina y con

respecto al pH al aumentarlo, disminuye la cantidad de corticosteroides liberados, ya que como se observa en la **Gráfica VII-1**, la deconjugación de corticosteroides, en el caso de pH 4.8, es casi tres veces mayor que si se utiliza un pH 6.0

En cuanto a la cantidad de enzima añadida, la opción elegida de 30 ml. coincide con la mayoría de los autores (Le Bizec et al. 1996; Ferchaud et al; 2000).

A pesar de que la β -glucuronidasa, es el enzima mas utilizado, se pensó que el uso de la subtilisina podría liberar los corticosteroides conjugados ya que se produce una hidrólisis de las proteínas, pero los resultados obtenidos son claramente peores que los obtenidos con la enzima β -glucuronidasa, por ello, se desestima el uso de subtilisina para la deconjugación de los corticosteroides.

Por tanto y a tenor de los resultados obtenidos podemos proponer el siguiente proceso en la deconjugación de los corticosteroides:

- En un tubo de ensayo verter 10 ml. de orina de un animal (presuntamente tratado con la dexametasona), ó 2.5 gr en el caso de tejidos (hígado, riñón). En este segundo caso añadir 10 ml. de agua.
- Añadir 1 ml. de tampón acetato 1 M a pH 4.8.
- Añadir 30 μ L de enzima de *Helix Pomatia*.
- Incubar las muestras a $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$ durante 4 horas si se trata de un tejido (hígado o riñón) ó 24 horas si lo que estamos analizando es una orina.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min. las orinas y 20 min. en el caso de los tejidos.
- Recuperar el sobrenadante. Extraer y purificar mediante los métodos que se presentan posteriormente.

VIII.2. - EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

Basándose en las características químicas (polaridad, tiempo de evaporación, etc) y a su mayor frecuencia de uso en los laboratorios para la extracción de sustancias farmacológicas, por ser con los que mejores resultados se obtienen, se seleccionaron cinco solventes, tert-butilmetileter, n-hexano, diclorometano, éter dietílico y acetato de etilo.

Nuestros resultados coinciden con los de Rodchenkov et al (1988) y Yap, considerando el éter dietílico como el mejor disolvente para la extracción de los corticosteroides a pH 3 y 7. mientras que a pH 11, el disolvente óptimo sería el acetato de etilo, al igual que lo expuesto por Bailey (Bailey et al, 1964).

Las recuperaciones para estos disolventes (éter dietílico y acetato de etilo) son buenas, con valores superiores al 90% para la mayoría de los corticosteroides ensayados, a excepción hecha de la triamcinolona que presenta unos datos de recuperabilidad muy bajos (<30%). Estos datos hacen referencia a muestras preparadas con la adición de patrones, ya que si trabajamos con muestras reales, estos dos disolventes arrastran muchos otros componentes, proporcionando a la hora de su detección con muchas interferencias por lo que se pueden calificar de "cromatogramas sucios". Por ello, su uso requiere una extracción previa tipo extracción en fase sólida (SPE) o derivatización con posterior extracción

Por otro lado hay que señalar que debido a las características de termolabilidad de estos solventes, es necesario conocer las posibles pérdidas por evaporación que sufren, con objeto de adecuar lo mas posible los posteriores cálculos en dicha recuperación. En este sentido queda patente que es el diclorometano el disolvente en el que mayores pérdidas se observan, siendo la betametasona junto con la triamcinolona los corticosteroides más afectados en este proceso. Además, el

diclorometano (Aguilera et al., 1997) presenta una elevada toxicidad para los técnicos por lo que ni siquiera se debería considerar su empleo en este tipo de extracciones.

Por todo ello se deberá tener presente e intentar evitar las elevadas temperaturas y los tiempos largos de evaporación, cuando se diseñen métodos de análisis en los que este implicado este disolvente, puesto que como acabamos de exponer tampoco es el que mejores porcentajes de extracción presenta

VIII.3.- EXTRACCIÓN POR FASE SÓLIDA (SPE)

En la extracción de fase sólida se pueden utilizar diferentes tipos de cartuchos, con las características definidas en el apartado correspondiente y a su vez para cada tipo de cartucho se pueden emplear diferentes tipos de eluyentes o en proporciones distintas. Por ello se han evaluado distintas posibilidades dentro de los métodos descritos en la literatura a fin de definir cual es el que reúne las mejores condiciones para nuestros objetivos (Courtheyn et al, 1992; Santos Montes A. et al 1993; Marcos et al, 1989).

De los distintos tipos de cartuchos, la extracción con C18 es la más usada corrientemente como se puede observar en los artículos que aparecen en la bibliografía sobre la purificación de corticosteroides por SPE (Calvarese et al 1994; Courtheyn et al 1994; Furuta et al 1998; Negriolli 1998; Santos Montes et al 1994). No obstante debido a los distintos tipos de matrices a partir de las cuales se pueden extraer los corticosteroides y de cara a una mejor purificación de la muestra, se han comparado los resultados con diferentes tipos de rellenos.

Así, en los estudios realizados con cartuchos de tipo Sílica, empleados para la extracción de analitos polares con solventes orgánicos no polares, se observó que pequeñas variaciones en la mezcla de elución ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$), producen grandes

cambios en el porcentaje de recuperación de los corticosteroides. Como era de esperar para un relleno polar, con la utilización de CH_2Cl_2 al 100 % se obtiene un rendimiento de elución nulo (0%) y aunque aumentemos la proporción de MeOH a 98/2, 95/5 y 80/20, también obtenemos bajas recuperaciones, ya que los compuestos más polares quedan fuertemente retenidos. Solamente cuando la proporción de MeOH en el eluato alcanza porcentajes del 10%, se consigue aumentar la recuperación de los corticosteroides hasta el 93%, pero si se supera esta relación, nuevamente decae dicha recuperación.

Los resultados obtenidos con SPE C18, concuerdan con la mayoría de los estudios realizados con los corticosteroides por otros autores, que utilizan para la elución eter dietílico o MeOH (Courtheyn et al., 1994; Diamandis et al., 1988; Fenske et al., 1995; Negrioli, 1997; Santos Montes et al., 1994) mientras que el acetato de etilo (Furuta et al 1998) es raramente utilizado. De los diferentes métodos testados, el descrito como 3.2-II es el que obtiene un rendimiento mejor, aunque lejos de los obtenidos con otro tipo de cartucho como los de sílica (93%), o los OASIS y BOND ELUT CERTIFY que se describen a continuación.

Un lavado con agua ultrapura, en este tipo de cartuchos C18, permite eliminar los compuestos más hidrófilos, iónicos y las sales, mientras que el lavado con sustancias de baja polaridad como por ejemplo hexano, permite eliminar los compuestos más polares y lipófilos. Es importante aplicar un vacío bastante fuerte para el lavado, a fin de eliminar toda traza de agua o de hexano que podía llevar consigo fenómenos de interferencias y hacer más difícil la evaporación del producto extraído.

Con los cartuchos OASIS, de los diferentes protocolos seguidos, es con el Método 3.3-I con el que se obtiene mayor recuperación, si bien cuando estos métodos son evaluados con muestras reales, se observa que el Método 3.3-III produce

cromatogramas con menos interferencias (más "limpios"), por ello se selecciona este método como el mejor de los tres.

Con los cartuchos Bond Elut Certify se han utilizado el CH_2Cl_2 y el MeOH en los Métodos 3.4-I y 3.4-II para comprobar con cual de ellos existe la fuerza suficiente para eluir los corticosteroides del cartucho y si no es así, poderlo utilizar como disolvente de lavado y conseguir arrastrar más sustancias que den posibles interferencias. Como consecuencia del resultado obtenido, el CH_2Cl_2 se ha incluido como paso de lavado, con pequeñas pérdidas de flumetasona como en el resto de los métodos.

La elución con distintas proporciones de la mezcla de acetonitrilo y agua que se presentan en el Método 3.4-III y 3.4-IV se podría considerar como una pequeña variante del Método 3.4-II, ya que el objetivo es el mismo, pero en este caso, al añadir agua, se arrastra una menor cantidad de impurezas en la elución (a mayor cantidad de disolvente orgánico, mayor cantidad de sustancias se solubilizan en él) y la polaridad es mayor que en el Método 3.4-II, pudiendo variar las proporciones de disolvente orgánico y agua hasta llegar a una solución de compromiso entre la limpieza de la muestra y el tanto por ciento de recuperación del analito buscado.

Para los cartuchos tipo OASIS y BOND ELUT CERTIFY, la triamcinolona se comporta de manera distinta al resto de corticosteroides, por lo que si se sospecha de la presencia exclusiva de este fármaco se podrían elegir métodos distintos Así el 3.3-I en OASIS el que ofrece un mejor rendimiento.

En general, como se ha podido observar a lo largo de este estudio, los distintos tipos de extracciones con los diferentes cartuchos de SPE, dan recuperaciones más que satisfactorias cuando se utilizan con patrones de corticosteroides. El problema surge cuando estos métodos son aplicados a las muestras reales de orina, hígado,

riñón, pienso, etc, porque métodos con recuperaciones excelentes, a la hora de utilizarlos con muestras, nos proporcionan cromatogramas con un alto número de interferencias ("sucios") que nos impiden poder obtener un buen resultado e incluso ni siquiera detectarlos si están en cantidades traza.

Concretamente los procesos de extracción con C18 no ofrecen una limpieza suficiente de la muestra, ya que al utilizarlo con muestra real aparecen muchas interferencias, como ocurre con el método utilizado por Marcos (Marcos et al, 1989) con cuyo método se obtuvieron cromatogramas "sucios", siendo el Método 3.2-IV con el que se obtienen cromatogramas con menos interferencias (más limpios), pero siendo la recuperación más baja aunque suficiente, por ello, es el método de extracción para C18 que se selecciona. Si bien al compararlo con el resto y observar los cromatogramas obtenidos con los cartuchos OASIS, con menor aparición de interferencias y con un método más sencillo, seleccionamos este tipo de cartuchos para la purificación de los corticosteroides, difiriendo de los métodos utilizados por Santos Montes et al (1993) o por Marcos (1989), o con los métodos propuestos por Courtheyn (1993), los cuales son métodos largos y tediosos, teniendo además que secar el cartucho, aumentando el tiempo del análisis y siendo este paso de secado un punto en el cual, dependiendo de si el cartucho se seca más o menos tiempo, puede influir en la buena elución de los corticosteroides.

Con el método con OASIS, se proporciona un método novedoso en la purificación de los corticosteroides ya que en la bibliografía, hasta el momento, no aparecían referencias sobre el uso de este tipo de cartuchos para este fin. El método de extracción finalmente desarrollado es sencillo y rápido, porque no utiliza mezclas de disolventes, y con una buena eficacia.

Después de evaluar todos estos métodos en muestras reales consideramos que el mejor método de extracción para los corticosteroides es el realizado con cartuchos de fase reversa modificada (OASIS) con un proceso de extracción-purificación como el que se muestra en el apartado VII.3.3-(Método 3.3-III).

VIII.4.- DETECCIÓN POR HPTLC

En las técnicas de cromatografía en capa fina, hay una serie de parámetros que son interesantes desde el punto de vista de identificación de compuestos, uno es el R_f cuya importancia es sobradamente conocida, límites de detección y color de revelado. Por tanto a la hora de definir cual de las técnicas utilizadas es la mas adecuado para la separación e identificación de los diferentes tipos de corticosteroides que se pueden encontrar en las muestras que se remitan a un laboratorio, debemos considerar estos parámetros o la combinación de los mismos a fin de elegir aquella que nos de mayor calidad en la detección e identificación aunque por separado haya mezclas de reveladores que sean mejores en un aspecto concreto (mejor R_f o mejor color) pero para un producto aislado y no muestras problema.

Por ello el definir la mezcla de solventes ideal para separar los corticosteroides, no es sencillo. Ninguno de los sistemas evaluados se considerara como el óptimo para la separación de los corticosteroides, ya que con algunas mezclas evaluadas los corticosteroides eluyen con el frente, con otras no eluyen o si lo hacen no presentan una buena separación de estas sustancias.

Para la separación simultánea de los corticosteroides y sus ésteres, las mezclas que se mostraron mas eficaces fueron cloroformo/MeOH (92/8) y cloroformo/acetona (90/10), aunque al final se seleccionó la mezcla formada por cloroformo/MeOH (92/8) por su mayor sensibilidad junto a una buena separación de

los diferentes corticosteroides. Esta mezcla consigue separar incluso isómeros como dexametasona y la betametasona y es considerada también por otros autores como Vanoosthuyze, Szepesi o Windhorst como la óptima para la separación de los corticosteroides en placa.

Tal y como hemos comentado al comienzo del apartado, a pesar de que la Mezcla 3 presenta mejores límites de detección que la Mezcla 2, (Tabla VII-10), es preferible utilizar la segunda para el revelado de los corticosteroides y de sus ésteres debido a la diferencia de color que se produce entre los distintos corticosteroides al revelar con esta mezcla y su facilidad para diferenciarlos, incluso isómeros (dexametasona y betametasona), siendo suficiente la sensibilidad mostrada para su uso como método de *screening*.

Otros autores utilizan mezclas a base de ácido sulfúrico y MeOH, como Vanoosthuyze, pero el límite de detección de 750 ng. por mancha para dexametasona, es superior al obtenido por nosotros con la Mezcla 2. También se pueden utilizar técnicas de densitometría para hacer valoraciones cuantitativas de las manchas producidas por los corticosteroides, pero no es el objetivo que se persigue con las pruebas de *screening*, puesto que para dicha cuantificación se dispone de técnicas más precisas.

No obstante algunas sustancias de alta polaridad, como la fluocinolona acetónido, son difíciles de detectar con cualquier tipo de mezcla de revelado.

La Mezcla 1 prácticamente se desecha ya que solo es capaz de detectar corticosteroides de tipo fluorado y a altas concentraciones, por tener un límite de detección superior a 600 ng por mancha.

Con objeto de simular lo más posible las condiciones experimentales a las que se dan en la realidad y teniendo en cuenta que en las matrices de las muestras que

lleguen a un laboratorio pueden encontrarse además de corticosteroides otras sustancias químicas que pueden interferir en las pruebas de detección de los corticosteroides por cromatografía de capa fina, se ha estudiado el comportamiento de algunos productos zosanitarios.

En este sentido, muestras aparentemente positivas a corticosteroides no pudieron ser confirmadas por cromatografía líquida (HPLC), por lo que cabía la posibilidad de que otras estructuras químicas semejantes a los mismos e incluso otro tipo de compuestos químicos, podrían dar falsos positivos por esta técnica.

Por ello, se evaluaron las posibles interferencias procedentes de otras sustancias, comparando los tiempos de retención con las sustancias patrón de los corticosteroides, así como la reacción de color que producen.

Los anabolizantes esteroideos son obviamente elegidos debido a su gran similitud en la estructura química, ya que su compuesto precursor es el ciclopentanoperhidrofenantreno y también porque se presentan, al igual que los corticosteroides, en los cócteles ilegales, pudiendo dar interferencias que llevaran a un error de diagnóstico. También se evaluaron otros fármacos veterinarios como son raptopamina, oxalato de verde malaquita, tilosina, ivermectina, azaperona, o carazolol. Los fármacos y medicamentos veterinarios analizados con el eluyente de cloroformo/MeOH (98/2) y la Mezcla 2 y 3, no interfieren en el análisis de los corticosteroides ya que con la mezcla 2 los colores son diferentes y con la mezcla 3 si bien tienen colores mas parecidos (grisáceos) los valores de Rf son distintos. Por tanto no deberían producir resultados erróneos, a excepción de la tilosina que presenta una mancha alargada del mismo color y Rf que algunos corticosteroides., aunque los métodos de detección como HPLC-DAD o GC-MS pueden servir de herramienta para solventar esta carencia de especificidad del método de *screening*.

Otro de los aspectos negativos de este tipo de técnicas, cuando se emplean como método de *screening*, para el análisis de muestras de piensos, es que se debe utilizar una placa para cada muestra y además los procesos de extracción y purificación son bastante tediosos, por lo que no resulta rentable ni económica ni desde un punto de vista práctico su empleo. Tal y como se describe en los resultados de aplicabilidad en piensos y muestras reales (VII- 4.2 y VII- 4.3) aparecen bastantes restos de componentes no identificados, que complica la detección y eleva notablemente los límites de detección. El método necesita confirmación posterior con HPLC ya que la presencia de isonicotinato sometido a metanol puede dar falsos positivos a isonicotinato de dexametasona, u otro tipo de interferencia por la "suciedad" de los cromatogramas.

VII.5. - DETECCIÓN POR HPLC

Para poder evaluar las condiciones de un método cromatográfico que nos permitiera obtener el máximo rendimiento de esta técnica, se han llevado a cabo más de 25 combinaciones de diferentes parámetros que pueden influir en la misma, como es la temperatura de las columnas, la fuerza iónica, el pH, la presencia de modificadores orgánicos en la fase móvil, etc, sobre diversas columnas cromatográficas, tanto de tipo apolar como polar.

Mediante la combinación de diferentes valores en los parámetros seleccionados, se pretende aumentar el conocimiento sobre el comportamiento cromatográfico de los corticosteroides, con el fin de establecer un protocolo que permita la separación de los mismos en condiciones isocráticas, de manera que por un lado nos permita su más fácil identificación y posterior cuantificación y por otro que esta separación se pueda

utilizar como paso previo a su detección por espectrometría de masas (LC-MS), ya que esta técnica puede resultar de gran utilidad en el análisis de los corticosteroides.

Evaluaremos por tanto sobre las diferentes fases estacionarias, la influencia de diferentes composiciones de las fases móviles y otros factores como temperatura, pH, etc, ya que si bien la fase estacionaria tiene un papel fundamental en el desarrollo de un método, por sus muy diversas características fisico-químicas, no se puede dissociar de las condiciones elegidas para una fase móvil y las proporciones de solventes orgánicos que se establezcan para una obtención de tiempos de retención lo mas adecuados a los fines previstos.

Las columna Phenomenex Synergi Max RP 80A C₁₂ y NovaPak C₁₈ (4.6 x 250mm) 4 μm, presentaron los mejores resultados, en ambos casos con una fase móvil compuesta por acetonitrilo/agua (30/70), ya que en estas condiciones se consigue la separación de los isómeros dexametasona y betametasona sin la necesidad de aplicar un sistema de gradiente. El uso de una columna Phenomenex Synergi Max RP 80A C₁₂ supone una novedad en el análisis de corticosteroides ya que hasta que no se empezó a trabajar con LC-MS no se utilizaron en el análisis de estos compuestos.

Con columnas NovaPak C₁₈ (8 x 100 mm) 4μm con compresión radial se realizó un estudio sobre la influencia de la fase orgánica, evaluando distintas fases móviles como son; MeOH/THF/H₂O (70/2/28), MeOH/CH₃CN/H₂O (70/4/26), CH₃CN/H₂O (40/60), CH₃CN/H₂O (30/70), MeOH/H₂O (70/30), MeOH/H₂O (80/20). Se observó que la variación que existe en los Tr. en los diferentes casos es pequeña. También se comparó este tipo de columna con patrones de corticosteroides con columnas de diferente tamaño, Novapack C₁₈ (4.6 x 250mm) 4μm, con una fase móvil formada por CH₃CN/H₂O (30/70), proporcionando gran resolución y consiguiéndose separar todos los corticosteroides en un tiempo de 15 min. con una fase móvil formada por

CH₃CN/H₂O (30/70), con un flujo de 1.0 ml./min., sin que sea necesario la adición de ningún modificador a la fase móvil y puede ser considerado como una alternativa al uso de columnas Phenomenex Synergi Max RP 80A C₁₂ con la que se obtuvieron los mejores resultados de todas las pruebas realizadas.

Por tanto, ni variaciones en el pH, ni la proporción de disolvente orgánico y acuoso en la fase móvil, producen diferencias considerables en la separación, pero si existen variaciones cuando se varía la longitud y el tamaño de la columna.

Para las columnas Symmetry C₁₈ se considera que la mejor fase móvil debe contener tetrahidrofurano en una proporción entre 5 y 25%. Concretamente, con la siguiente proporción; THF/CH₃CN/Fosfato disódico 0.02M pH7 (25/5/75), se consigue separar la dexametasona de la betametasona y metilprednisolona en un tiempo de análisis inferior a 20 min. Con proporciones del 5% de tetrahidrofurano, la dexametasona y la betametasona se separan pero la metilprednisolona presenta el mismo tiempo de retención que la dexametasona. Si se incrementa a un 25%, se cambia el orden de elución de la metilprednisolona, apareciendo en el cromatograma antes que la betametasona y hace retrasar a la flumetasona al último lugar de elución.

Esta separación y en estos tiempos no se consigue con ninguna de las distintas combinaciones con CH₃CN, como utiliza Magali (1997) o Delahaut (1993), con MeOH como usa por ejemplo Courtheyn y tampón.

Con la presencia de MeOH en la fase móvil, en vez de CH₃CN, en este tipo de columnas, se consigue incrementar considerablemente los tiempos de retención y mejorar la separación de los diferentes corticosteroides. Así la Dexametasona con una fase móvil de fosfato disódico y CH₃CN (F. Disódico 0.02 M pH7/CH₃CN (45/55)) presenta un tiempo de retención de 2.87 min. , mientras que si sustituimos

por MeOH (F. Disódico 0.02 M pH7/MeOH (45/55) a (50/50)), el tiempo se alarga hasta los 11.1 min.

En el caso de la prednisolona pasa de 7.25 a 11.88 min. La betametasona y dexametasona aparecen a unos 20 min. con (50/50), ligeramente separadas pero a su vez cerca de la metilprednisolona.

Por otro lado el pH y las concentraciones del tampón, no tienen casi influencia en los tiempos de retención ni en la mejora de la separación.

Las columnas Symmetry Shield C₈. son muy similares a la Symmetry C₁₈, por eso se evaluó la fase móvil que mejores resultados había proporcionado en las primeras (THF/CH₃CN/Fosfato disódico 0.02M pH7 (25/5/75)) , con objeto de estudiar como afectaba el tipo de columna en la separación de los corticosteroides, pero los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la baja influencia ejercida por este tipo de columna ya que prácticamente resultaron idénticos.

Una vez evaluadas la influencia de las diferentes fases móviles sobre las fases estacionarias, se procedió a introducir nuevos factores. En este sentido, se probó la influencia de la temperatura sobre las columnas tipo Phenomenex.

Se realizaron pruebas incrementando esta T^a hasta 40°C con una fase móvil que mejor había resultado (CH₃CN/H₂O (30/70)), en la mejor fase estacionaria ((4.6 x 250 mm) de 4 μm). Los mejores resultados pusieron de manifiesto que una elevación de la temperatura de la columna mejora la separación de dexametasona y betametasona.

Por último se evaluaron columnas de tipo polar, como las Diol. Si bien con ellas es posible separar la dexametasona y la betametasona, el consumo de disolventes orgánicos como fase móvil es elevado. Además presentan otro inconveniente como es el no poder utilizar fases móviles acuosas con este tipo de columnas. Por ello, pocos

son los autores (Simova et al 1996; Treiber et al, 1995) que utilizan este tipo de columnas ya que la mayoría prefieren columnas de fase reversa en las que se pueden realizar más fácilmente cambios en las fases móviles (Santos Montes, Hariharan, Lai...). Sin embargo, son una alternativa a considerar.

En la **Tabla VIII-1** se presenta las columnas estudiadas más adecuadas para el análisis de corticosteroides, después de la evaluación de las diferentes pruebas realizadas con las distintas columnas:

Tabla VIII-1

COLUMNA	FASE MOVIL	FLUJO
Symmetry	THF/CH ₃ CN/Tampón Fosfato 0.02M pH 7 (26/4/70)	1 ml./min
Symmetry Shield	THF/CH ₃ CN/Tampón Fosfato 0.02M pH 7 (25/5/75)	1 ml./min
Novapack C18 (40°C)	CH ₃ CN/H ₂ O (30/70)	1.2 ml./min
Synergi (40°C)	CH ₃ CN/H ₂ O (30/70)	1.2 ml./min
Diol	Hexano/Isopropanol (90/10)	2.5 ml./min

Actualmente el HPLC para detección de corticosteroides sólo se utiliza para aquellos productos sospechosos detectados por HPTLC que deben diferenciarse de otros compuestos.

La optimización de una columna que separe adecuadamente los corticosteroides es muy importante para poder ser aplicado con aquellos métodos de detección con LC-MS, sistema con el cual pueden detectarse todos los corticosteroides con los límites adecuados aunque el coste del equipo es bastante superior al de un equipo de GC-MS.

Detección de corticosteroides en piensos por HPLC

Como en las fases anteriores, consideramos necesario la obtención de un método de análisis sensible y específico para detectar los corticosteroides en piensos, ya que se ha comprobado que la dexametasona se ha aplicado, sola o en combinación con otras sustancias, como es el clenbuterol, en dichos piensos como promotores de crecimiento del ganado.

A pesar de ello son pocos los métodos que están disponibles en la bibliografía para la detección de corticosteroides en piensos. Courtheyn y colaboradores (1999) publicaron un método basado en una extracción con disolventes orgánicos (agua, acetonitrilo, hexano y diclorometano) obteniendo 3 fases de las cuales se extraerá una de ellas y una posterior purificación con extracción en fase sólida con cartuchos C_{18} y fraccionamiento por HPLC con una columna C_{18} y una fase móvil constituida por MeOH/H₂O (65/35). Este método es largo y tedioso, especialmente el proceso de purificación, donde las diferencias entre la composición de los distintos piensos puede tener una gran influencia en el proceso de extracción.

Los piensos tienen un alto contenido en grasa y proteínas, incluso con presencia de compuestos desconocidos, que pueden influir en la eficiencia de la extracción de

los corticosteroides. La alta desviación Standard (RSD) que se observa en el análisis de piensos con este tipo de detección, se debe probablemente a la influencia de las diferencias de composición de las distintas muestras de piensos utilizadas. Sin embargo, como método de rutina, estos métodos están capacitados para detectar dexametasona y otros corticosteroides (con tiempos de retención diferentes) con un límite de detección de 50 ng.g^{-1} . Incluso dexametasona y betametasona pueden ser diferenciados debido a la diferencia del tiempo de retención en 0.5 min. (más alto para la betametasona).

VIII.6. - DETECCIÓN POR GC-MS

De los pocos artículos que existen en la bibliografía sobre la detección de los corticosteroides con la técnica de GC-MS, la mayoría de ellos y los que mejores resultados nos ofrecen, son aquellos que utilizan ionización química negativa (NCI) (Courtheyn et al, 1994; Stanley et al, 1993; Delahaut et al, 1997; Bagnati et al, 1996b; Igbal et al, 2001). Por este motivo, el método seleccionado se basa en este tipo de detección. A su vez, se han evaluado los resultados bibliográficos del uso de los distintos derivatizantes, seleccionando un derivado de la piridina (clorocromato de piridina) como el más apropiado para la derivatización de los corticosteroides que es utilizado por algunos autores (Courtheyn et al, 1994; Delahaut et al, 1997; Vannosthuyze et al, 1996).

Por ello, el método seguido para la detección de los corticosteroides con este tipo de técnica, se basa en la derivatización que realiza Courtheyn (1994) con clorocromato de piridina. También se evaluó el método rápido que presenta este autor (Courtheyn et al. 1998), pero no se considera el adecuado, ya que aunque presenta un método, en teoría más rápido, el proceso se hace más largo y tedioso por incorporar extracciones, pudiendo a su vez afectar a la recuperación.

El proceso de derivatización no puede ser utilizado para la triamcinolona, ya que este corticosteroide no se derivatiza mediante este sistema. Por ello, esta técnica es limitada para esta sustancia. Es decir, en una muestra de orina, por ejemplo, se podrían detectar varios corticosteroides (DEX, BET, FLU, MTP) pero sería necesario utilizar otra muestra de orina para ser sometida al proceso de derivatización que necesita la triamcinolona, para poder ser detectada.

Cuando se analizaron las muestras con el equipo y las condiciones descritas de GC-MS, se encontró una respuesta muy superior a cuando la misma cantidad de patrón de dexametasona era analizada aisladamente (sin muestra). Este efecto de la matriz, ya descrito para otras sustancias, como por ejemplo en el análisis de pesticidas (Huetos et al, 2003a), puede ser debida a una pérdida del patrón de dexametasona, cuando se analiza sin presencia de muestra, durante el paso de la extracción o en la oxidación. También puede tener su origen en el sistema de GC-MS, ya que con un detector de masas, la presencia de orina aumenta considerablemente la respuesta de dexametasona.

Como puede observarse en **Tabla VII-25**, la relación entre la concentración DEX/MTP y la proporción de abundancias produjeron valores diferentes, dependiendo del día y no de la clase de muestra. Es decir, los análisis "intra-día" tienen coeficientes de variación más bajos del 16%. En cambio, el valor medio de todos los factores de respuesta obtenidos diariamente producen un coeficiente de variación (CV) muy alto (41.3%). Por ello, se dedujo que la variación entre los días del factor de respuesta puede depender de la estabilidad y el calibrado del equipo de GC-MS ese día. Por ello, la presencia de un IS es realmente necesaria y la metilprednisolona (MTP) fue la seleccionada para este fin. Sin embargo, la metilprednisolona puede ser un corticosteroide utilizado en el alimento del ganado y por tanto, la cuantificación

de dexametasona daría resultados inferiores. En ese caso, podría ser utilizado otro corticosteroide como IS, sabiendo de antemano que no forma parte de dicha muestra. Esta sería una de las limitaciones que presentaría esta técnica de detección.

Otro inconveniente que presenta esta técnica es la detección de prednisolona. El derivado que se forma al derivatizar este corticosteroide, produce los mismos iones, de masa 298 y 299, que producen los corticosteroides naturales cortisona y cortisol. Por ello, no es posible diferenciar si ese pico cromatográfico representa a un corticosteroide natural del animal o a uno sintético administrado al mismo. Igual ocurre con el corticosteroide prednisona (muy similar a la prednisolona).

Para propósitos cuantitativos, el análisis de cada serie de muestras desconocidas siempre tiene que incluir tres muestras de orina negativa añadidas con patrón de corticosteroides junto con IS para poder realizar la curva de calibración "intra-día", así podrá ser calculado el factor de respuesta diario.

El uso de un espectrómetro de masas, después de una extracción, purificación y derivatización adecuada, permite la detección de corticosteroides en orina, hígado, riñón y piensos a nivel de ppb. La capacidad de detección fue estimada en 0.2 ng.ml.^{-1} para orina, y en 1 ng.ml.^{-1} para hígado, riñón y piensos, ya que las muestras añadidas a ese nivel podían ser detectadas y confirmadas. Este $CC\beta$ (Comisión Decisión 2002/657/EC) no pudo ser calculado matemáticamente, debido al efecto matriz. Sin embargo, todas las orinas añadidas a este nivel de 0.2 ng.ml.^{-1} podrían ser detectados y confirmados ($CC\beta$).

La repetibilidad en los tiempos de retención es bastante buena (sólo variaciones de ± 0.20 segundos).

La reproducibilidad del factor de respuesta en un período de tiempo (3 meses en este estudio) produjo un coeficiente de variación (CV) alto. Los factores de

respuesta pueden experimentar variación debido, por el ejemplo, a la limpieza de la fuente del detector de masas.

La especificidad se consideró satisfactoria, ya que no se encontraron interferencias que afectasen al diagnóstico de estas sustancias en los cromatogramas. Un problema podría ser la presencia de betametasona, ya que tiene la misma estructura que la dexametasona, excepto por la posición 16β del grupo CH_3 . Ambos compuestos producen dos productos idénticos de oxidación, los α - y β -epímeros, los cuales son bien separados en la cromatografía de gases. Sin embargo, la diferencia entre dexametasona y betametasona recae sobre la relación de los isómeros: En el caso de la dexametasona, el α - isómero es más abundante que el β y en la betametasona esta relación está invertida. Sin embargo, esta diferencia entre dexametasona y betametasona se ha observado que puede variar de un día a otro cuando inyectamos una misma muestra (contenida en el mismo vial) en días diferentes. Los ratios entre la abundancia de los fragmentos m/z 310 y 330 también produjeron valores diferentes en la betametasona para el α - y β - epímero: El primero tiene una proporción de aproximadamente el 15 % y para el β - epímero la proporción observada es del 1.8 %. Estas diferencias también fueron también encontradas por De Wasch (De Wasch et al, 2001) quien encontró proporciones diferentes en mezclas de patrones (30 y 8%). Estudios acerca de las diferencias entre ambos corticosteroides también han sido efectuados por otros autores (Bagnati et al, 1996; Antignac et al, 2002).

Por tanto, dexametasona y betametasona pueden ser distinguidos, pero una mezcla de ambos, puede que no cumpla los criterios de identificación.

La identificación se lleva a cabo comprobado que al tiempo de retención de la dexametasona se detecta la presencia de un pico cromatográfico. Se calcula la

concentración de la supuesta dexametasona mediante la comparación del área del pico sospechoso con el área del pico de la dexametasona patrón extraída o de la muestra enriquecida con dexametasona. Cuando la concentración es superior al límite de decisión o de la mitad del límite máximo de residuos (LMR de dexametasona en hígado: 2ppb), se procederá a la identificación del pico con ayuda de un método de confirmación, que debe basarse en GC-MS o LC-MS(-MS). La identificación de picos de dexametasona también fue llevada a cabo comparando los ratios obtenidos con los ratios correspondientes a las muestras enriquecidas con patrón. La tolerancia máxima recomendadas (aún no es obligatorio) para las intensidades relativas del ion es de $\pm 25\%$ para las proporciones entre 20-50%, y de $\pm 30\%$ para las proporciones entre 10-20% (ambos para GC- MS-NCI).

VIII. - CONCLUSIONES

1.- DECONJUGACIÓN:

La β -glucuronidasa (*Helix Pomatia*) es la enzima de elección para la deconjugación de los corticosteroides en muestras biológicas. El tiempo de incubación fijado para las muestras de orina con esta enzima es de 24 horas, mientras que para muestras de hígado y riñón es de 4 horas, la temperatura $38^{\circ} C \pm 2^{\circ} C$ y el pH 4.8.

2.- EXTRACCION CON SOLVENTES:

Los solventes con los que mejor se extraen los corticosteroides son el éter dietílico en el caso de pH 3 y 7 y el acetato de etilo en el caso de pH 11 para los siete corticosteroides evaluados.

3.- EXTRACCION EN FASE SÓLIDA:

La extracción en fase sólida (SPE) tanto de fase normal como de fase reversa, obtiene el mejor rendimiento con los cartuchos tipo OASIS, lavando con 3 ml. MeOH/ NaOH 0.2 M (4/6) (x2) y 3 ml. de H₂O y eluyendo con 3 ml. MeOH.

4.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTO RENDIMIENTO (HPTLC):

4.1.- El eluyente óptimo por su selectividad y sensibilidad consiste en una mezcla de Cloroformo/MeOH (92/8) como fase móvil y un reactivo formado por una solución de 2,4-dihidroxibenzaldehído (0.25g) en ácido acético glacial (50 ml.) y una mezcla de ácido sulfúrico (95-97%) y ácido acético glacial (12.5 ml./37.5 ml.), sometiendo la placa durante 10 min. a una T^a de 95°C.

4.2.- Con la técnica criba por HPTLC existe la posibilidad de dar falsos positivos para corticosteroides en el caso de la tilosina, dada la similitud en el R_f y coloración de estos compuestos, pero se puede solucionar mediante HPLC-Diode Array.

5.- CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC):

La columna Phenomenex Synergi Max 80A C₁₂ (4.6 x 250 mm) 4 μm, con una fase móvil de CH₃CN/H₂O (30/70) y una T^a de 40°C y flujo de 1.2 ml./min. Es la que mejor separa los diferentes corticoides incluido los isómeros. No obstante los resultados con muestras biológicas son difíciles de interpretar, por lo que no se considera viable para la detección de corticosteroides a los límites de detección necesarios

7.- CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS):

7.1.- El método de cromatografía de gases con un detector de masas propuesto ofrece una reproducibilidad suficientemente buena, alta sensibilidad, especificidad, repetibilidad en los tiempos de retención y una capacidad de análisis suficiente para la detección del uso ilegal de los corticosteroides, ya que :

- Es un método fácil y rápido disponible para la mayoría de los laboratorios implicados en la investigación de residuos.
- Tiene buena sensibilidad (0.2 ppb en orina y 1 ppb en hígado) para la mayoría de los corticosteroides.
- Permite la identificación mediante ratios entre fragmentos, abundancias o áreas con una buena reproducibilidad

7.2.- Betametasona y dexametasona producen el mismo derivado pero pueden ser distinguidos por los diferentes ratios entre sus isómeros (El ión m/z 330 es un 30% del 310 en el caso de la dexametasona y del 8% en el caso de la betametasona).

7.3.- Los inconvenientes que plantea este método son la difícil cuantificación por el efecto matriz, que hace necesario el uso de patrón interno y la necesidad de un mayor tiempo de incubación y oxidación para la triamcinolona.

No obstante, se considera la detección por GC-MS para los corticosteroides como un buen método de confirmación para la presencia de los corticosteroides.

IX. - RESUMEN

En este trabajo se ha evaluado el comportamiento cromatográfico de los corticosteroides y se han optimizado cuales son las condiciones adecuadas para la extracción y purificación de los corticosteroides de muestras biológicas.

Se comparan distintos tipos de cartuchos de extracción por fase sólida (C_{18} , Sílica, OASIS, Bond Elut) con diferentes condiciones de lavado y de elución y se presentan los resultados de las distintas recuperaciones obtenidas con patrones en cada caso. Los mejores resultados se obtuvieron con cartuchos OASIS con recuperaciones por encima del 90% para los corticosteroides estudiados. A su vez, también se ha realizado un estudio de cual es el disolvente con el cual se extraen mejor los corticosteroides. Se llegó a la conclusión de que el éter dietílico es el mejor disolvente para la extracción de los corticosteroides a pH 3 y 7. En cambio a pH 11, el disolvente óptimo sería el acetato de etilo.

Por otro lado, en este trabajo también se ofrecen los resultados obtenidos en el estudio de la separación de los corticosteroides en diferentes columnas cromatográficas con variaciones en el pH, temperatura, composición de la fase móvil, etc, evaluando los tiempos de retención en función del tiempo de la dexametasona. Los mejores resultados se obtuvieron con una columna Phenomenex Synergi Max RP 80A C_{12} a 40°C y con una columna NovaPak C_{18} (4.6 x 250mm) 4 μ m, en ambos casos con una fase móvil compuesta por acetonitrilo/agua (30/70), ya que en estas condiciones se consigue la separación de los isómeros dexametasona y betametasona sin la necesidad de aplicar un sistema de gradiente.

El tiempo de incubación de las orinas, hígado y riñón para la reconjugación de los corticosteroides se optimizó en 24 horas para la orina y 4 horas para los tejidos, a

pH 4.8 y a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Esta hidrólisis se realiza con la enzima *Helix Pomatia*.

Los resultados de este estudio pueden ser aplicados al desarrollo de métodos analíticos para la determinación de corticosteroides. También se han optimizado técnicas de detección como son HPTLC como método criba, HPLC y GC-MS como método de confirmación para la detección de los corticosteroides.

Para HPTLC se optimizó un método de separación de corticosteroides en placa mediante una fase móvil formada por cloroformo/MeOH (98/2) y un revelador formado por una solución de 2,4-dihidroxibenzaldehído (0.25 g) en ácido acético glacial (50 ml.) y una mezcla de ácido sulfúrico (95-97%) y ácido acético glacial (12.5 ml./37.5 ml.), sometiendo la placa durante 10 min. a una T° de 95°C en un horno.

Para GC-MS se desarrolló un método de detección que incluye una derivatización con clorocromatopiridina. La detección, identificación y cuantificación de los residuos de los corticosteroides, se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases con detector de masas en ionización química negativa, permitiendo la determinación de los corticosteroides a niveles de 0.2 ppb para orina y 1 ppb para hígado y riñón.

En resumen, los métodos propuestos ofrecen una extracción y purificación de la muestra bastante rápida y nueva, con una reproducibilidad suficientemente buena, alta sensibilidad, especificidad, repetibilidad y una capacidad de detección que permite la detección del uso ilegal de los corticosteroides en las muestras biológicas, a los niveles exigidos.

IX. - BIBLIOGRAFIA

AGUILERA R., BECCHI M., MATEUS L., POPOT M.A., BONNAIRE Y., CASABLANCA H., HATTON C.K. Detection of exogenous hydrocortisone in horse urine by gas chromatography-combustion-carbon isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 1997, 702, (85-91).

ANDERSON N.H., GRAY M.R., HINDS C.J. Diode array detection of low level co-eluting species in HPLC. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. 1990, Vol. 8, (853-857).

ANNELI M., DE PAOLIS., GABRIELLE SCHNABEL., ROSEN J.D. Determination of dexamethasone in milk by High Pressure Liquid Chromatography. *Journal of the AOAC*, 1977, Vol. 70, nº1, (210-212).

ANONIMO (1970). Directiva 70/524/CEE del Consejo de 23 de Noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal. DOCE L270/1 (14-12-1970).

ANONIMO (1981). Directiva 81/602/CEE del Consejo de 21 de Julio de 1981, referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático. DOCE L222/32, (78-81).

ANONIMO (1985). Directiva 85/358/CEE del Consejo por la que se establecen normas de detección y control de sustancias de efecto hormonal y tireostático. DOCE L191/46 de 23-7-1985 Directiva cuya última modificación la constituye el Acta de adhesión de 1994 (DO.nº C52 de 19-2-94).

ANONIMO (1986). Directiva 86/469/CEE del Consejo por la cual se estableció normas de vigilancia de un determinado número de residuos de sustancias de acción farmacológica o de contaminantes del medio natural en los animales de explotación y en las carnes frescas procedentes de estos animales. DOCE L275/36 de 26 de Septiembre de 1986. Directiva cuya última modificación la constituye el Acta de adhesión de 1994.

ANONIMO (1987a). Decisión 87/410/CEE de la Comisión de 14 de julio de 1987 por la que se establecen los métodos que deberán utilizarse para la detección de los residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático. DOCE L223/18 (11-8-1987).

ANONIMO (1987b). Real Decreto 1423/87 de 22 de Noviembre de 1987 por el que se dan normas sobre sustancias de acción hormonal y tireostática de uso en los animales. BOE 23 de Noviembre de 1987 Pag. 34796.

ANONIMO (1988). Decisión 88/201/CEE de la Comisión de 18 de febrero e 1988, por la que se aprueba el programa para la detección de los residuos de hormonas presentado por España. DOCE L94/27 de 12-4-88.

ANONIMO (1989a). Real Decreto 1262/1989, de 20 de Octubre de 1989, por el que se aprueba el Plan Nacional de Investigación de Residuos en los Animales y en las carnes frescas. BOE nº 257, Pag. 33767.

ANONIMO (1989b). Decisión 89/610/CEE de la Comisión de 14 de Noviembre de 1989, por la que se establecen los métodos de referencia y la lista de los

laboratorios nacionales de referencia para la detección de residuos. DOCE L351/39 (2-12-1989).

ANONIMO (1990a). Ley 25/1990 de 20 de diciembre de 1990, del medicamento. BOE 306, de 22-12-1990. Pag. 38228.

ANONIMO (1990b). Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo, de 26 de Junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, fijó en sus anexos, límites para determinación de medicamentos veterinarios, L224/1 de 18-8-1990. Reglamento cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 282/96 de la Comisión L37/12 de 15 de 2 de 1996.

ANONIMO (1991). Código Alimentario. Colección Textos Legales. Ed: Boletín Oficial del Estado, Madrid.

ANONIMO (1991). Decisión 91/664/CEE de 11 de Diciembre de 1991 por la que se designan los laboratorios comunitarios de referencia para la detección de residuos de determinadas sustancias. DOCE L368/17 (31-12-91).

ANONIMO (1993a). Decisión de la Comisión 93/256/CEE de 1 de Abril de 1993 por la que se establecen los métodos que deberán utilizarse para la detección de residuos de sustancias de efecto hormonal y sustancias de efecto tireostático. DOCE L118/64 (14-5-1993).

ANONIMO (1993b). Decisión de la Comisión 93/257/CEE de 15 de Abril de 1993 por la que se establecen los métodos de referencia y la lista de laboratorios nacionales de referencia para la detección de residuos. DOCE L118/75 (14-5-1993).

ANONIMO (1993c). Directiva 93/99/CEE de 29 de Octubre de 1993 sobre medidas adicionales relativas al control oficial de productos alimenticios. DOCE L290/14 (24-11-1993).

ANONIMO (1995a). Real Decreto 109/1995 de 27 de Enero de 1995, sobre medicamentos veterinarios. BOE 53, (3-3-1995) Pag. 7353.

ANONIMO (1995b). Ley Orgánica 10/1995 de 23 de Noviembre de 1995, Código Penal. BOE 281 (24-11-1995) Pag. 33987.

ANONIMO (1995c). Real decreto 1397/1995 de 4 de Agosto de 1995, por el que se aprueban medidas adicionales relativas al control oficial de productos alimenticios. Boletín Oficial del Estado 246, (14-10-1995) Pag; 30135.

ANONIMO (1996a). Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de Abril de 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. DOCE L125/10 (23-5-96).

ANONIMO (1996b). Directiva 96/22/CE del Consejo del 29 de Abril de 1996 por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y

sustancias b-agonistas en la cría del ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE. DOCE L125/3 (23-5-96).

ANONIMO (1997a). Reglamento (CE) 434/97 del Consejo, de 3 de Marzo de 1997, por el que se modifica el Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo. DOCE L67/1 (7-3-1997).

ANONIMO (1997b) Documento WT/DS26/R/USA y WT/DS48/R/CAN referente a las medidas del contenido de hormonas por la CE concernientes a la carne y a los productos cárnicos. World Trade Organization, Génova, 18 de Agosto de 1997.

ANONIMO (1998a) Real Decreto 1749/1998 de 31 de Julio de 1998, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y a sus residuos en los animales vivos y en sus productos. BOE 7 de Agosto de 1998. Pag. 26910.

ANONIMO (1998b). Decisión 98/536/CE de 3 de Septiembre de 1998 por la que se establece la lista de los laboratorios nacionales de referencia para la detección de residuos. DOCE L251/39 (11-9-1998). Derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE.

ANONIMO (1999). Reglamento (CE) nº 1308/1999 del Consejo de 1 de Junio de 1999 que modifica el Reglamento (CEE) nº 2377/90 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DOCE L156/1 (23-6-1999).

ANONIMO (2002). Decisión 657/2002/CE de la Comisión de 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. (17-8-02).

ANTIGNAC J.P. Dosage et étude du métabolisme des corticostéroïdes dans l'espece bovine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. 2001, Universite de Nantes, Faculte des Sciences et des Techniques.

ANTIGNAC J.P., LE BIZEC B., MONTEAU F., ANDRE F. Journal Mass Spectrometry, 2003, 37, (69).

ASHOK K., GORDON B., HEWETSON D. Screening of steroids in horse urine and plasma by using electron impact and chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1989, 479, (233-242).

BAGNATI R., BELLINI A., AIROLDI L., RAMAZZA V., FANELLI R. Analysis of prednisolone in urine by immunoaffinty chromatography and GC-MS. Euroresidue III, 1996b, (218-222).

BAGNATI R., RAMAZZA V., ZUCCHI M., SIMONELLA A., LEONE F., BELLINI A., FANELLI R. Analysis of dexamethasone and betamethasone in bovine urine by purification with an on-line immunoaffinity chromatography high performance liquid chromatography system and determination by gas chromatography mass spectrometry. Analytical Biochemistry, 1996, Vol. 235(2), (119-126).

BAILEY E. The use of gas-liquid chromatography in the assay of some corticosteroids in urine. *Journal of Endocrinology*. 1964, 28, (131-138).

BARON S.F., HYLEMON P.B. Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones. *Gastrointestinal Microbiology*. 1997, 1, (470-510).

BAUER K., GROS L., SAUER W. *Cromatografía de Capa Fina- Una Introducción-*.

BEAN K.A., HENION J.D. Direct determination of anabolic steroid conjugates in human urine by combined high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 1997, 690, (65-75).

BRADBURY MJ., AKANA SF., CASCIO CS., LEVIN N. J. Regulation of basal ACTH secretion by corticosterone is mediated by both type I (MR) and type II (GR) receptors in rat brain. *Steroid Biochem Mol Biol*. 1991, 40, (105-111).

BRADBURY MJ., AKANA SF., DALLMAN MF. Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology* 1994, 134, (1286-1296).

BRAMBILLA G. II Jornadas sobre control de residuos en carnes. *Analítica e Inspección*. 1997, Facultad de Veterinaria, Lugo.

BRITTON. S. W., SILVETTE. H., Some effect of cortico-adrenal extract and other substances on adrenalectomized animals. *Am. J. Physiology.*, 1931, 99, (15-32).

BROOKE SM., HASS-JONHSON AM., KAPLAN JR., SAPOLSKY RM. Characterization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor in primate brain. *Brain Res.* 1994, 637 (303-307).

CALDERON V. Tesis Doctoral: Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos. 2000, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

CALVARESE S., RUBINI P., URBANI G, FERRI N., RAMAZZA V., ZUCCHI M. Experimental administration of 19-Nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices. *Analyst.* 1994, 119, (2611-2615).

CODEX ALIMENTARIUS (1996). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. 2ª edición revisada 1995. Volumen 3. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (1-46) FAO/OMS. Roma (Italia).

CODEX ALIMENTARIUS (1999). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Manual de procedimiento. Décima Edición. FAO/OMS. Roma (Italia).

COURTHEYN D., VERCAMMEN J., DE BRABANDER H., VANDERREYNT I., BATJOENS P., VANOOSTHUYZE K., VAN PETEGHEM C. Determination of dexamethasone in urine and faeces of treated cattle with negative chemical ionization-mass spectrometry. *Analyst*. 1994, Vol. 119, (2557-2564).

COURTHEYN D., VERCAMMEN J., LOGGHE M., SEGHERS H., DE WASCH K., DE BRABANDER H. Determination of betamethasone and triamcinilone acetone by GC-NCI-MS in excreta of treated animals and development of a fast oxidation procedure for derivatisation of corticosteroids. *Analyst*. 1998, Vol. 123, (2409-2414).

COURTHEYN D., VERHEYE N., BAKERROOT V., DAL V., SCHILT R., HOOIJERINK H., VAN BENNEKOM E.O., HAASNOOT W., STOUTEN P., HUF F.A. Detection of corticosteroids in animal feed and premixes: a new category of growth promoters. *Euroresidue II*, 1993(b), (251-256).

COURTHEYN D., VERHEYE N., DAL V., TAYLOR M.R., WESTWOOD S.A. Determination of dexametasone in feeds with HPTLC. Benelux Economische Unie Document 1992, Vol 11 Proceedings of the International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis. *Journal of Planar Chromatography*, 1993(a), Vol 6, n° 5, (415-418).

CREASER C.S., FEELY S.J., HOUGHTON E., SEYMOUR M., TEALE P. On-line immunoaffinity chromatography-high-performance liquid chromatography-mass

spectrometry for the determination of dexamethasone. *Analytical Communications*. 1996, 33, (5-8).

CUSHING, H., The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations. *Bull, Johns Hopkins Hosp.*, 1932, 50, (137-195).

DAESELEIRE E., VANOOSTHUYZE K., VAN PETEGHEM C. Application of high-performance thin-layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry to the detection of new anabolic steroids used as growth promoters in cattle fattening. *Journal of Chromatography A*, 1994, Vol 674 (247-253).

DAMKJOER M., BINDER C., STARUP J. Urinary excretion of different corticosteroid-metabolites in oral contraception and pregnancy. *Acta Endocrinologica*. 1969, 60, (473-485).

DE WASCH K., DE BRABENDER H.F., VAN DE WIELE M., VERCAMMEN J., COURTHEYN D., IMPENS S., Differentiation between dexamethasone and betamethasone in a mixture using multiple mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2001, 926, (79-86).

DELAHAUT P.H., COLEMONT S., DUBOIS M. Development of a radioimmunoassay of dexamethasone and application to treated cattle. *Euroresidue II*. 1993, (262-266).

DELAHAUT P.H., JACQUEMIN P., COLEMONT S., DUBOIS M., DE GRAEVE J., DELUYKER H. Quantitative determination of several synthetic corticosteroids by gas chromatography-mass spectrometry after purification by immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1997, Vol. 696, (203-215).

DÖPPENSCHMITT S.A., SCHEIDEL B., HARRISON F., SURMANN J.P. Simultaneous determination of prednisolone, prednisolone acetate, and hydrocortisone, in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1995, Vol. 674, (237-246).

DROZD J. Chemical derivatization in gas chromatography. *Journal of Chromatography Library*, Vol. 19. 1981, Elsevier Scientific Publishing Company.

FÁBREGAS. X, Junio 1995, I^{as} Jornadas sobre control de Residuos en carnes. *Análítica e inspección*.

FENSKE M. Improved detection of steroids on NH₂ layers. *Chromatographia*, 1995, Vol 41, n° 3/4, (175-177).

FENSKE M. Determination of cortisol in Guinea Pig urine by high performance thin-layer chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 1997, Vol 44, n° 1/2, (50-54).

FIORI M., PIERDOMINICI E., LONGO F., BRAMBILLA G. Identification of main corticosteroids as illegal feed additives in milk replacers by liquid chromatography-

atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1998, Vol. 807, (219-227).

FOKKENS W.J., GODTHELP T., HOLM A.F., KLEIN JAN A. Local corticosteroid treatment: the effect on cells and cytokines in nasal allergic inflammation. *American Journal of Rhinoallergy*. 1998, 12(1), (21-26).

FUNK W., KERLER R., BOLL E., DAMMANN V. High-performance thin-layer chromatographic determination of fluorescence-labelled cortisol [hydrocortisone]. *Chromatographia*, 1981, 217, (349-355).

FURUTA T., NAMEKAWA T., SHIBASAKI H., KASUYA Y. Simultaneous determination of tetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone in human plasma and urine by stable isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1998, 706, (181-190).

GAIGNAULT J.C., BIDET D., GAILLARD M., PERRONNET J. Stéroïds et stéroïdes. *Elipses*. 1997, (336).

GAYAN RAMIREZ G., DECRAMER M. The effect of corticotherapy on respiratory muscles. *Rev. Mal. Respir.* 1998, 15(1), (33-41).

GIMENEZ ARNAU. A. M, Corticosteroides tópicos (I): Desarrollo, mecanismo e acción y farmacología. *Temas dermatológicos monográficos comentados, Actualidad Dermatológica*, 1997; 7, Pag. (495-508) Internet.

GIUDETTI A.M., GNONI G.V. Short-term effect of dexamethasone on fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochemistry and Molecular Biology Interactions*. 1998, 44(3), (515-521).

GONZALO LUMBRERAS R., SANTOS MONTES A., GARCIA MORENO E., IZQUIERDO HORNILLOS R. High-performance liquid chromatographic separation of corticoid alcohols and their derivatives: A hydrolysis study including application to pharmaceuticals. *Journal of Chromatography Science*, 1997, Vol. 35, (439-445).

GOODMAN A., GOODMAN L., GILMAN A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (1982), 1445, Editorial Médica Panamericana (Sexta Edición).

GRAHAM R.E., BIEHL E.R., KENNER C.T. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1978, Vol. 67, nº6, June (792-795).

GROOT M., SCHILT R., HAASNOOT W., RAMAZZA V., COURTHEYN .., VERCAMMEN J., LOGGHE M. Veal calves treated with a low dosage of prednisolone histological and analitical data. *Euroresidue III*, 1996, Vol. 1, (440-445).

HARIHARAN M., SUNDARNAGA., NOORD T.V., KINDT E. Simultaneous assay of corticosterone and cortisol in plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Clinical Chemical*, 1992, Vol. 38, 3, (346-352).

HARROT, G. A., SOFFER, L. J., ELLSWORTH, R., TRESCHER, J.H., Studies on the suprarenal cortex. III. Plasma electrolytes and electrolyte excretion during suprarenal insufficiency in the dog. *J. Exp. Med.*, 1993, 58, (17-38).

HAUGHEY D.B., JUSKO W.J., Receptor-mediated methylprednisolone pharmacodynamics in rat; steroids-induced receptor down-regulation. *Journal of Pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 1992, 20(4), (333-355).

HAY M., MORMEDE P. Improved determination of urinary cortisol and cortisone, or corticosterone and 11-dehydrocorticosterone by HPLC with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*. 1997, Vol. 702, (833-39).

HELLAL LEVY C., COUETTE B., FAGART J., SOUQUE A., GOMEZ SANCHEZ C., RAFESTIN OBLIN M. Specific hydroxylation by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Letters*. 1999, 464(1-2), (9-13), (en Antignac 2001).

HENCH, P. S., KENDALL, E.C., SLOCUMB, C.H. POLLEY, H.F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1949, 24, (181-197).

HIRAI T., MATSUMOTO S., KISHI I. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by HPLC with normal solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*. 1997, Vol. 692, (375-388).

HOEBUS J., DANEELS E., ROETS E, HOOGMARTENS J. Identification of corticosteroids hormones by thin layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography*, 1993, Vol 6 July/August (269-273).

HOLLAND H.L., The mechanism of the microbial hydroxylation of steroids. *Chemical Society Reviews*. 1982, 11, (371-395).

HOUGHTON E., TEALE P., DUMASIA M.C., WELLBY J.K. The use of capillary column gas chromatography and negative ion chemical ionization mass spectrometry to confirm the administration of synthetic corticosteroids to horses. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1982, 9 (11), (459-465).

HUANG W.L., DUNLOP S.A., HARPER C.G. Effect of exogenous corticosterids on the developing central nervous system: a review. *Obstretical & Gynecological Survey*. 1999, 54(5), (336-342).

HUETOS O., GELLA L., JIMÉNEZ M., REUVERS T. Método criba para la determinación de dexametasona e orina e hígado. *Alimentaria* . 2003b, Vol. 342, (115-122).

HUETOS O., JIMENEZ M., AJENJO E., SAN ANDRÉS M., REUVERS T. Determination of dexamethasone in urine by GC-MS-NCI. *Journal of Chromatography B*, 2003a, Vol. 788, (137-146).

HUETOS O., RAMOS M., MARTIN DE POZUELO M., SAN ANDRES M., REUVERS T. Determination of dexamethasone in feed by TLC and HPLC. 1999, *Analyst*, 124, (1583-1587).

HUETOS O., REUVERS T., SANCHEZ J.J. Comparative study of the Thin-Layer Chromatographic detection of different corticosteroids. *Journal of Planar Chromatography*, 1998, Vol 11, July/August (305-308).

IGLESIAS I., FENTE C., MAYO S., VÁZQUEZ B., FRANCO C., CEPEDA A. Determination of corticosteroids by chemiluminiscence detection in liver. *Euroresidue IV*, 2000, Vol. 2, (613-621).

INDRAYANTO G., WAHYUNINGSIH L., SALIM R.J. Simultaneous densitometric determination of betamethasone valerate and clioquinol in cream, and its validation. *Journal of Planar Chromatography A*, 1997, Vol 10, May/June (204-207).

INOVE S., INOKUMA M., HARADA T., SHIBUTANI Y., YOSHITAKE T., CHARLES B., ISHIDA J., YAMAGUCHI M. Simultaneous HPLC determination of 6 β -hydroxycortisol and cortisol in urine with fluorescence detection and its application for estimating hepatic drug-metabolizing enzyme induction. *Journal of Chromatography B*. 1994, Vol. 661, (15-23).

IQBAL Z., MIDGELY J.M., WATSON D.G. The quantification of endogenous steroids in bovine aqueous humour and vitreous humour using isotope dilution GC-

NCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, Vol. 24, (535-543).

ISHIMURA K. The mechanisms of corticoids biosynthesis revealed by immunohistochemistry and in situ hybridation. *Kaibogaku Zasshi* 1998, 73(2), 111-118, (en Antignac 2001).

ISTASSE L., DE HAAN V., VAN EENAEME C., BUTS B., BALDWIN P., GIELEN M., DEMEYER D., BIENFAIT J.M. Effect of dexamethasone injections on performances in a pair of monozygotic cattle twins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1989, 62, (150-158).

JAMIESON P.M., CHAPMAN K.E., SECKL J.R. Tissue- and temporal-specific regulation of 11b-hydroxyteroid dehydrogenase type 1 by glucocorticoids in vivo. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1999, 68, (245-250).

JARAIZ. M^ªV, Medicamentos de uso veterinario: Riesgos, límites máximos de residuos y tiempos de espera. II^{as} Jornadas sobre control de residuos en carnes. *Análítica e Inspección*. (Junio 1997).

JENKINS C.A., BRUERA E. Difficulties in diagnosing neuropsychiatric complications of corticosteroids in advanced cancer patients; two cases reports. *Journal of Pain Symptom Management*, 2000, 19 (4), (309-317).

JOËLS M., VREUGDENHIL E. Corticosteroids in the brain. Cellular and molecular actions. *Molecular Neurobiology*. 1998, 17(1-3), (87-108).

JORK H., FUNK W., FISHER W., WIMMER H. "Thin-Layer Chromatography-Reagents and Detection Methods", 1994, VCM, Weinheim, Vol. 1b, (27).

JUSKO W.J., PYSZCZYNSKI N.A., BUSHWAY M.S., AMBROSIO R.D., MIS S.M. Fifteen years of operation of a high-performance liquid chromatographic assay for prednisolone, cortisol, and prednisolone in plasma. *Journal of Chromatography B*, 1994, Vol. 658, (47-54).

KAJAL D., SAROJ K. D. Identification and quantitation of corticosteroids and their esters in pharmaceutical preparations of creams and ointments by thin-layer chromatography and densitometry. *Journal of AOAC International*, 1994, Vol 77 n° 6 (1435-1438).

KAJAL D., SAROJ K.D. Densitometric quantification of corticosteroid sodium phosphate salts in parenteral preparations or eye and ear drops after reversed phase ion pair TLC. *Journal of Planar of Chromatography*, 1993, Vol 6, May/June (204-207).

KASUYA Y., SHIBASAKI H., FURUTA T. The use of deuterium-labeled cortisol for in vivo evaluation of renal 11b-HSD activity in man: urinary excretion of cortisol, cortisone and their A-ring reduced metabolites. *Steroids* 2000, 65, (89-97).

KESSLER M.J. Analysis of steroids from normal and tumor tissue by HPLC. *Clinica Chimica Acta*. 1982, 125, (21-30).

KIRCHNER J.G. *Thin Layer Chromatography*, John Wiley and Sons, New York 1978, *Techniques in Chemistry*, vol XIV.

KLAUS R; FISCHER W; HAUCK H.E. Analysis and chromatographic separation of some steroid hormones on NH₂ layers. *Chromatographia*, 1994, Vol 39 n° 1/2 (97-102).

KOUPAI-ABYAZANI M.R., YU N., ESAW B., LAVILETTE B. Determination of triamcinolone acetonide in equine serum and urine by liquid chromatography - atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1995, 19(3), (182-186).

LAI C.K., LEE T., AU K.M., YAN-WO CHAN A. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clinical Chemistry*, 1997, Vol. 43, 2, (312-325).

LENSMEYER G.L., ONSAGER C., CARLSON I.H., WIEBE D.A . Use of particle-loaded membranes to extract steroids for high-performance liquid chromatographic analysis. Improved analyte stability and detection. *Journal of Chromatography A*. 1995, Vol. 691, (239-246).

LIVINGSTONE D.E., JONES G.C., SMITH K., JAMIESON P.M., ANDREW R., KENYON C.J., WALKER B.R. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissues-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology*. 2000, 141(2), (560-563).

LONG, C. N. H., KATZIN, B., FRY, E. G., Adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinology*, 1940, 26, (309-344).

LUNDBERG I., KRATZ A.K., ALEXANDERSON H., PATARROYO M. Decreased expression of interleukin-1alpha, interleukin-1beta, and cell adhesion molecules in muscle tissues following corticosteroid treatment in patient with polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis and Rheumatism*. 2000, 43(2), (336-348).

MCLAUGHIN L.G., HENION J.D. Determination of dexamethasone in bovine tissues by coupled-column normal-phase high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography - mass spectrometry. *Journal Chromatography*. 1990,529,(1-19).

MAJORI M., VACHIER I., GODARD P., FARCE M., BOUSQUET J., CHANEZ P. Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. *The European Respiratory Journal*. 1998, 11(1), (133-138).

MARCOS. V., REUVERS. TH., JIMÉNEZ. R. *Información Veterinaria* 96, 1989, (42-44).

MARTÍN. J, Junio 1997, II^{as} Jornadas sobre control de Residuos en carnes. Analítica e Inspección.

MARWAH A., MARWAH P., LARDY H. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analysis of corticosterone in rat plasma using selected ion monitoring. *Journal of Chromatography A*. 2001, Vol. 757, (333-342).

MATYSZAK M.Z., CITTERIO S., RESCIGNO M., RICCIARDI CASTAGNOLI P. Diferencial effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*. 2000, 30(4), (1233-1242).

MCEWEN BS., BRINTON R. *Progress in Brain Research*. 1987. Vol 72. (11-26).

MINAGAWA K., KASUYA Y., BABA S. Determination of dexamethasone in human plasma and urine by electron-impact mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1985, 343, (231-237).

NEGRIOLLI J. Etude analytique des corticostéroïdes utilisés dans l'espèce bovine - Nouvelle dérivation utilisant la réaction avec le N,N-diméthylformamide diméthylacétal. Thèse de doctorat de chimie, Université de Nantes, 1997, (283).

NEGRIOLLI J., MAUME D., LE BIZEC B., MONTRADE M.P., MONTEAU F., ROY C., ANDRE F. A potential new derivative agent for corticosteroids analysis : action of N,N-diméthylformamide diméthylacétal on dexamethasone. *Euroresidue III*, 1996, Vol. 2, (750-754).

NEUFELD E., CHAYEN R., STERN N. Fluorescence derivatisation of urinary corticosteroids for high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*. 1998, Vol. 718, (273-277).

PARK S-J., KIM Y-J., PYO H-S. Analysis of corticosteroids in urine by HPLC and thermospray. *Journal of Analytical Toxicology*. 1990, Vol. 14, (102-108).

PASSINGHAM B.J., BARTON R.N. Application of high-performance liquid chromatography to the measurement of cortisol secretion rate. *Journal of Chromatography*. 1987, 416, (25-35).

Pharmaceutical Applications Notebook. WATERS OASIS Sample Extraction Products. WATERS Corporation.

PIEKOSZEWSKI W., CHOW F.S., JUSKO W.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effect of coadministration of methylprednisolone d tacrolimus in rabbits. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994, 269(1), (103-109).

Proceedings of the EU-Workshop organised at RIVM, Bilthoven, The Netherlands, October 1998.

RATKA A., SUTANTO W., BLOEMERS M. On the role of mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*. 1989, 50, (117-123).

RIZEA S., SILVESTRO L., HAAG A., SÖRGEL F. A confirmatory HPLC-MS/MS method for ten synthetic corticosteroids in bovine urines. *Journal of Mass Spectrometry*. 1996, Vol. 31, (1351-1363).

RODCHENKOV G.M., URALETS V.P., SEMENOV V.A., LECLERCQ P.A. Analysis of dexamethasone, triamcinolone, and their metabolite in human urine by microcolumn liquid and capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 1988, 11, (283-288).

RODCHENKOV G.M., URALETS V.P., SEMENOV V.A., LECLERCQ P.A. Analysis of dexamethasone, triamcinolone, and their metabolite in human urine by microcolumn liquid and capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*. 1988, 11, (283-288).

ROGERSON F.M., FULLER P.J., Mineralocorticoids . *Steroids*. 2000, 65, (61-73).

ROZYLO J.K., ZABINSKA A. Selectivity of mixture separation with multi-component mobile phases in planar chromatography. *Acta-Chromatogr*. 1998, 8, (13-31).

RULE G.S., HENION J.D. Determination of drugs from urine by on-line immunoaffinity chromatography-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1992, 582, (103-112).

SAMBROOK P.N. Corticosteroid osteoporosis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2000, 59(1), 45-47. (en Antignac 2001).

SANTOS MONTES A., GASCO LOPEZ A.I., IZQUIERDO HORNILLOS R. Optimization of the high-performance liquid chromatographic separation of a mixture of natural and synthetic corticosteroids. *Journal of Chromatography A*, 1993, Vol. 620, (15-23).

SANTOS MONTES A., GONZALO LUMBRERAS R., GASCO LÓPEZ A.I., IZQUIERDO HORNILLOS R. Solvent and solid-phase extraction of natural and synthetic corticoids in human urine. *Journal of Chromatography B*, 1994, 652, (83-89).

SANTOS MONTES A; GASCO LOPEZ A.J; IZQUIERDO HORNILLOS R. Simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in pharmaceuticals by reversed-phase HPLC. *Chromatographia*, 1994, Vol. 39, 9-10, (539-542).

SCHELCHER F., PICARD-HAGEN N., LAROUTE V., GAYRARD V., POPOT M.A., ANDREOLETTI O., TOUTAIN P.L. Corticoid concentrations are increased in the plasma and urine of ewes with naturally occurring scrapie. *Endocrinology*. 1999, 140(5), (2422-2425).

SCHILT R., LOMMEN A., VAN BENNEKOM E.Q., HOOIJERINK H., BROUWER L., DE JONG J., LELOUX M.S. Detection and structure elucidation of anabolic steroids

and corticosteroids in cocktails by LC-Diode array and H-NMR. Euroresidue IV. 2000, Vol. 2, (982-987).

SCUDELETTI M., LANZA L., ACO E., MONETTI M., PUPPO F., FILACI G., INDIVERI F. Immune regulatory properties of corticosteroids: prednisone induces apoptosis of human T lymphocytes following the CD3 down-regulation. Ann. N Y Acad. Sci. 1999, 876, (164-179).

SHEARAN P., O'KEEFE M., SMYTH M. Determination of dexamethasone in tissues by high performance liquid chromatography. Euroresidue I. 1990, (336).

SHIBASAKI H., FURUTA T., KASUYA Y. Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution. Journal of Chromatography B, 1997, 692, (7-14).

SIMOVA M., DIMOV N. Retention on diol column. A case of study. Chromatographia, 1996, 4, Vol. 43, 7-8, (436-438).

SKRABALAK D.S., COVEY T.R., HENION J.D. Qualitative detection of corticosteroids in equine biological fluids and the comparison of relative dexamethasone metabolit/dexamethasone concentration in equine urine by micro-liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1984, 315, (359-372).

SKRABALAK D.S., MAYLIN G.A. Dexamethasone metabolism in the horse. *Steroids*. 1982, 39(3), (233-244).

SKRABALAK D.S., MAYLIN G.A. The extraction and isolation of dexamethasone-related compounds. *Journal of Pharmaceutical Methods*. 1982, 8, (291-297).

SMETS F., DE BRABANDER H.F., BLOOM P.J., POTTIE G. HPTLC of anabolic compounds in injection sites. *Journal of Planar of Chromatography*, 1991, Vol 4 May/June (207-212).

SMETS F., GASPARD P., DE BRABANDER H.F., BATJOENS P., HENDRIKS L., COURTHEYN D., LANCIVAL B., DELAHAUT P. By-products of steroids synthesis: a case of interferences in thin-layer chromatography residue analysis. *Analyst*. 1994 Vol 119, (2571-2575).

SORKNESS C.A. Establishing a therapeutic index for the inhaled corticosteroids: Part II. Comparison of systemic activity and safety among different inhaled corticosteroids. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998, 102(4).

STAHL E. *Thin Layer Chromatography- A Laboratory Handbook*, 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlín 1969.

STANLEY S.M.R., WILHELMI B.S., RODGERS J.P. Comparison of immunoaffinity chromatography combined with gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry and radioimmunoassay for screening dexamethasone in

equine urine. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. 1993a, Vol. 620, (250-253).

STANLEY S.M.R., WILHELMI B.S., RODGERS J.P. Immunoaffinity chromatography combined with gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry for the confirmation of flumethasone abuse in the equine. *Journal of Chromatography*. 1993b, 614, (77-86).

STOUTEN P., HAASNOOT W., CAZEMIER G., BERENDE P.L.M., KEUKENS H. Immunochemical detection of corticosteroids in milk, liver, kidney and muscle. *Euroresidue III*. 1996, Vol. 2, (902-907).

SZEPESI L.R., GAZDAG M., SHERMA J., FRIED B. 1991, *Handbook of Thin Layer Chromatography (Chromatography Science Series, Vol 55)*, dekker, New York, (907).

TANG P.W., CRONE D.L. A new method for hydrolysing sulfate and glucuronyl conjugates of steroids. *Analytical Biochemistry*. 1989, 182, (289-294).

TAYLOR M.R., WESTWOOD S.A. An investigation of drug detection in equine urine samples by modern TLC. *Journal of Planar Chromatography*. 1993, 6(5), (415-418).

TOMLINSON E.S., MAGGS J.L.- PARK B.K., BACK D.J. dexamethasone metabolism in vitro; species differences. *Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology*. 1997, 62(4), (345-352).

TOUNAIN P., SCHNEITER P., HENRY S., DELARUE J., TAPPY L. Effect of dexamethasone on hepatic glucose production and fructose metabolism in healthy human. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 1997, 36, (315-320).

TREIBER L.R. Normal-phase high-performance liquid chromatography with relay gradient elution. Description of the method. *Journal of Chromatography A*, 1995, Vol. 696, (193-199).

UNE (1991). Norma UNE 66-01-91-EN 45001. Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo.

UNE (1995). Norma UNE-EN-ISO 8402. Gestión de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario. Ed: AENOR (Madrid).

VALENTA C., JANOUT H. Corticosteroids analysis by HPLC with increased sensitivity by use of precolumn concentration. *Journal of Liquid Chromatography*, 1994, Vol. 17, (1141-1146).

VALVO L., PARIS A., SAVELLA A.L., GALLINELLA B., CIRANNI E., SIGNORETTI. General high-performance liquid chromatographic procedures for the rapid screening of natural and synthetic corticosteroids. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. 1994, Vol. 2, n°6, (805-810).

VANOOSTHUYZE K., DAESELEIRE E., COURTHEYN D., VERCAMMEN., VAN PETEGHEM C. Screening of liver samples for the presence of dexamethasone by

ELISA followed by HPLC-ELISA and HPLC/GC-MS confirmation. Euroresidue III, 1996, Vol. 2, (953-957).

VANOOSTHUYZE K.E., VAN POUCKE L.S.G., DELOOF A.C.A., VAN PETEGHEM C.H. Determination of corticosteroids in injection sites by means of HPTLC. Laboratory of Food Analysis, University of Gent, Gent, Belgium.

VANOOSTHUYZE K.E.; VAN-POUCKE L.S.G.; DELOOF A.C.A.; VAN PETEGHEM C.H. Development of a high-performance thin-layer chromatographic method for the multi-screening analysis of corticosteroids. Proceedings of the International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue, Analysis, 1993, Vol 275 n° 1/2 (117-182).

VETERINDUSTRIA (2000). Guía de productos zosanitarios. 7ª Edición. Veterindustria. Madrid, 2000.

VIOLIN P. Simple and specific reversed-phase liquid chromatographic method with diode-array detection for simultaneous determination of serum hydroxychloroquine, chloroquine and some corticosteroids. Journal of Chromatography B. 1995, Vol. 666, (347-353).

VOLMER D.A., HUI J.P.M. Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Communications Mass Spectrometry. 1997, Vol. 11, (1926-1934).

VREE T.B., LAGERWERF A.J., VERWEY-VAN WISSEN C.P.W.G.M., JONGEN P.J.H. High-performance liquid chromatography analysis, preliminary pharmacokinetics, metabolism and renal excretion of methylprednisolone with its C6 and C20 hydroxy metabolites in multiple sclerosis patients receiving high-dose pulse therapy. *Journal of Chromatography B*. 1999, 732, (337-348).

VREE T.B., LAGERWERF A.J., VERWEY-VAN WISSEN C.P.W.G.M., JONGEN P.J.H. High-performance liquid chromatography analysis, preliminary pharmacokinetics, metabolism and renal excretion of methylprednisolone with its C6 and C20 hydroxy metabolites in multiple sclerosis patients receiving high-dose pulse therapy. *Journal of chromatography B*. 1999a, 732, (337-348).

VREE T.B., VERWEY-VAN WISSEN C.P.W.G.M., LAGERWERF A.J., SWOLFS A., MAES R.A.A., VAN OOIJEN R.D., VAN EIKEMA HOMMES O.R., JONGEN P.J.H. Isolation and identification of the C6-hydroxy and C20-hydroxy metabolites and glucuronide conjugate of methylprednisolone by preparative high-performance liquid chromatography from urine of patients receiving high-dose pulse therapy. *Journal of Chromatography B*. 1999b, 726, (157-168).

WADE S.E., HAEGELE A.D. Corticosteroids analysis by HPLC-UV facilitated by use of an injector-mounted extraction column. *Journal of Chromatography A*. 1991, Vol. 14, 7, (1257-1266).

WHITFIELD HJ., BRADY LS., SMITH MA., FOX R. Optimazion of cRNA probe in situ hybridization methodology for localization of glucocorticoid receptor mRNA in rat brain: a detailed study. *Cell Mol Neurobiol*. 1990, 10, (145-157).

WINDHORST G., KELDER J., KLEIJN J.P. Journal of Planar Chromatography, 1990, Vol 3, (300).

YAP B.K., JOHNSTON G.A.R., KAZLAUSKAS R. Routine screening and quantitation of urinary cortiosteroids using bench-top gas chromatography-mass-selective detection. Journal of Chromatography B, 1992, Vol. 573, (183-190).

YAU J.L., KELLY P.A., SHARKEY J. Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration decreases glucocorticoid and mineralocorticoid receptor, but increases 5-hydroxytryptamine 1C receptor gene expresion in the rat hippocampus. Neuroscience. 1992, 61, (31-40).

YERGEY A.L., TEFFERA Y., ESTEBAN N.V., ABRAMSON F.P. Direct determination of human urinary cortisol metabolites by HPLC/CRIMS. Steroids. 1995, 60, (295-298).

YOSHIKO Y., HIRAO K., MAEDA N. Dexamethasone regulates the actions of endogenous insulin like growth factor-II during myogenic differentiation. Life Sciences. 1998, 63(2), (77-85).

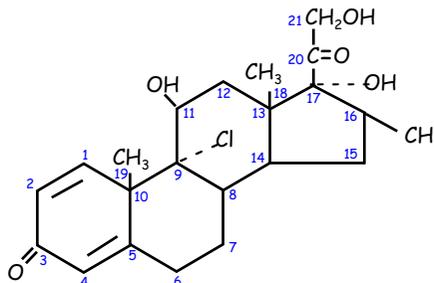
ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES CORTICOSTEROIDES

1.- MOLÉCULA; **BECLOMETASONA**

DENOMINACION QUÍMICA; 9-cloro-11 β , 17, 21-trihidroxi-16 β -metilpregna-1,4-diene-3, 20-diona

FORMULA; $C_{22}H_{29}ClO_5$

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 408.92

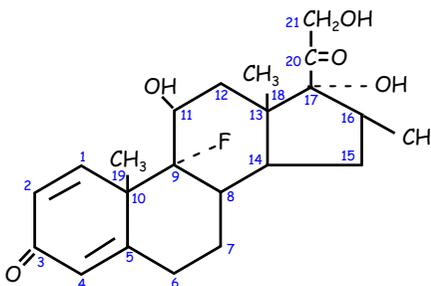
OBSERVACIONES; Posee un sólo halógeno, el cloro en la posición C9 y se asemeja a la flumetasona. Se emplea como dipropionato generalmente.

2.- MOLÉCULA; **BETAMETASONA**

DENOMINACION QUÍMICA; 9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 β -metilpregna-1,4- diene-3,20-diona

FORMULA; $C_{22}H_{29}FO_5$

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 392.47

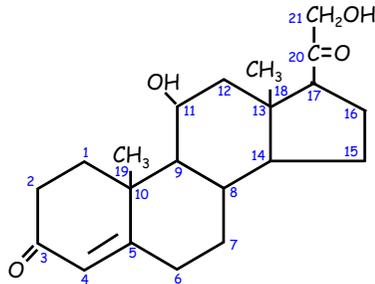
OBSERVACIONES; Posee un grupo metilo en el C16 que está en posición β , un flúor en el C9, dos dobles enlaces entre C1 y C2 y también entre C4 y C5, grupos hidroxilo en las posiciones 2 y 17 y una cadena lateral de hidroxiacetona. Semejante actividad a la dexametasona, pero es más cara. Se emplea generalmente como tal y como acetato, fosfato sódico y valerato.

3.-MOLÉCULA; **CORTICOSTERONA**

DENOMINACION QUÍMICA; 11 β ,21-dihidroxi-pregna-4-ene-3, 20-diona

FORMULA; C₂₁H₃₀O₄

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 346.47

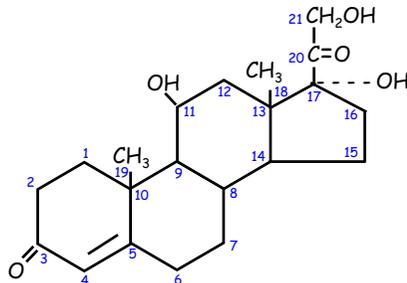
OBSERVACIONES; Es un corticosteroide natural. Efectos antiinflamatorios y pocos efectos secundarios.

4.-MOLÉCULA; **CORTISOL O HIDROCORTISONA**

DENOMINACION QUÍMICA; 11 β ,17,21-trihidroxi-pregna-4-ene-3,20-diona

FORMULA; C₂₁H₃₀O₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 362.47

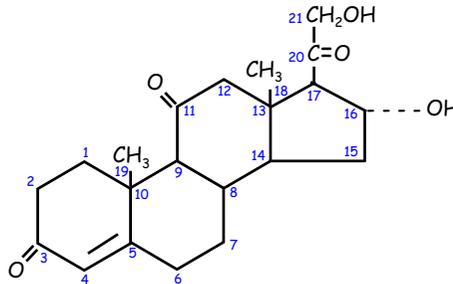
OBSERVACIONES; Es un corticosteroide natural. Se sustituye el oxígeno del C₁₁ por un grupo hidroxilo. Mayor actividad antiinflamatoria que la corticosterona pero con menos efectos secundarios. Se puede usar también como acetato de hidrocortisona y como hidrocortisona succinato sódico, con el fin de atenuar los inconvenientes y aumentar la actividad antiinflamatoria

5.- MOLÉCULA; CORTISONA

DENOMINACION QUÍMICA; 17 α ,21-dihidroxi-pregna-4-ene-3,11,20-triona

FORMULA; C₂₁H₂₈O₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 360.45

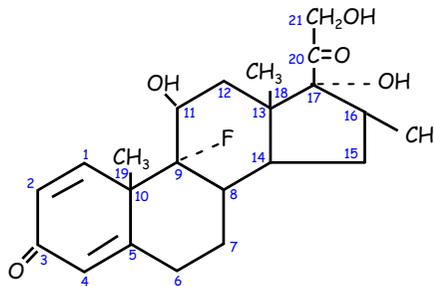
OBSERVACIONES; Es un corticosteroide natural. Efectos secundarios múltiples: alteraciones del equilibrio electrolítico, hiperglucemia, síndrome de úlcera gástrica, hipertensión aumento de la eliminación del nitrógeno, trastornos óseos, síndromes cushingoides, etc.

6.- MOLÉCULA; DEXAMETASONA

DENOMINACION QUÍMICA; 9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-diene-3,20-diona

FORMULA; C₂₂H₂₉FO₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 392.47

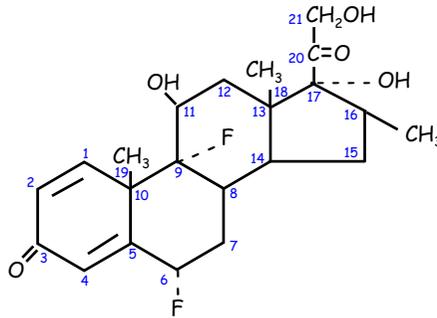
OBSERVACIONES; Posee un grupo metilo en el C16 que está en posición α , un flúor en el C9, dos dobles enlaces entre C1 y C2 y también entre C4 y C5, grupos hidroxilo en las posiciones 2 y 17 y una cadena lateral de hidroxiacetona. Es el más potente glucocorticoide y ha desplazado casi por completo a los otros glucocorticoides, debido a su amplio índice terapéutico. Se emplea como tal, como fosfato sódico, como acetato, fosfato sódico y como valerato.

7.-MOLÉCULA; FLUMETASONA

DENOMINACION QUÍMICA; 6 α ,9-difluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-diene-3,20-diona.

FORMULA; C₂₂H₂₈F₂O₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 410.46

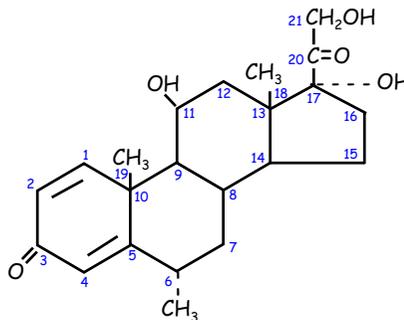
OBSERVACIONES; Se diferencia de la dexametasona por tener un flúor en posición C6. Tiene un hidroxilo en posición C17, con lo que la potencia se asemeja a la dexametasona y su acción es prolongada.

8.-MOLÉCULA; METILPREDNISOLONA

DENOMINACION QUÍMICA; 11 β ,17,21-trihidroxi-6 α -metilpregna-1,4-diene-3,20-diona

FORMULA; C₂₂H₃₀O₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 394.44

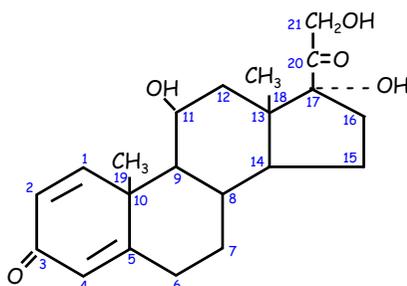
OBSERVACIONES; Introducción de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 en la hidrocortisona. Alta actividad gluconeogénica y antiinflamatoria, y disminuye la actividad mineralocorticoide. Se emplea como tal o como ésteres de acetato que por poseer una larga cadena lateral se metaboliza más lentamente en el organismo, siendo su acción más prolongada.

9.-MOLÉCULA; PREDNISOLONA

DENOMINACION QUÍMICA; 11 β ,17,21-trihidroxipregna-1,4-diene-3,20-diona

FORMULA; C₂₁H₂₈O₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 360.45

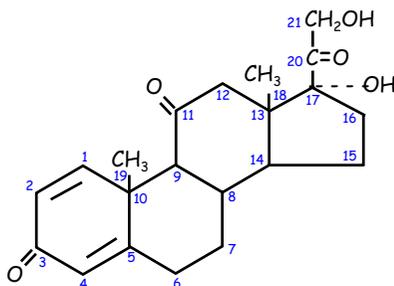
OBSERVACIONES; Introducción de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 en la hidrocortisona. Alta actividad gluconeogénica y antiinflamatoria, y disminuye la actividad mineralocorticoide. Se emplea como tal o como ésteres de acetato que por poseer una larga cadena lateral se metaboliza más lentamente en el organismo, siendo su acción más prolongada.

10.-MOLÉCULA; PREDNISONA

DENOMINACION QUÍMICA; 17,21-dihidroxipregna-1,4-diene-3,11,20-triona

FORMULA; C₂₁H₂₆O₅

ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 358.43

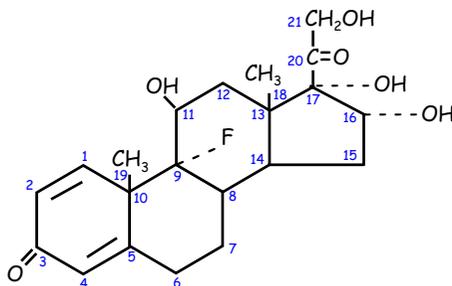
OBSERVACIONES; Introducción de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 en la cortisona. Alta actividad gluconeogénica y antiinflamatoria, y disminuye la actividad mineralocorticoide.

11.- MOLÉCULA; **TRIAMCINOLONA**

DENOMINACION QUÍMICA; 9-fluoro-11 β ,16 α ,17,21-tetrahidroxipregna-1,4-diene-3,20- diona

FORMULA; C₂₁H₂₇FO₆

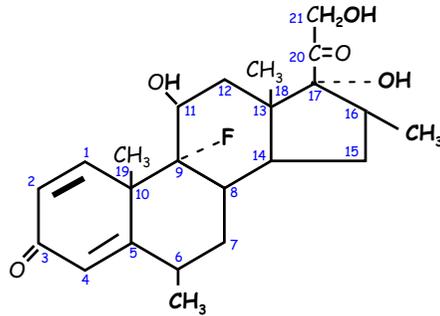
ESTRUCTURA;



PM (g/mol); 394.44

OBSERVACIONES; Presencia de flúor en el carbono 9. Tiene una alta potencia y carece de reacciones secundarias, pero al tener un grupo hidroxilo en el C16, tiene un efecto muy pequeño de actividad glucocorticoide, aunque si reduce notablemente la retención de sodio. Se emplea como tal, o como acetónido, diacetato, o hexacetónido.

Figura 3



Relación estructura-actividad de los adrenocorticoides: Las líneas y letras finas indican rasgos estructurales comunes a los compuestos que tienen acción antiinflamatoria. Las letras y líneas gruesas indican modificaciones que aumentan o suprimen las actividades características.

(Goodman et al., 1982)

Figura 2

