

# Proyecto “IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EMERGENTES: DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS O GASES”

## TC1102.1 Informe final

COORDINACIÓN TRATAMIENTO Y CALIDAD DEL AGUA  
SUBCOORDINACIÓN CALIDAD DEL AGUA

MANUEL SÁNCHEZ Z.  
MARTHA AVILÉS F.  
LUIS A. GONZÁLEZ E.  
NORMA RAMÍREZ S.



SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE Y  
RECURSOS NATURALES



1. Índice .....	1
2. Resumen ejecutivo.....	3
3. Objetivos.....	3
4. Antecedentes.....	4
4. Antecedentes .....	5
4.1 Hormonas y compuestos disruptores endocrinos.....	5
4.1.1 Clasificación de compuestos disruptores endocrinos.....	5
4.1.2 Hormonas naturales y sintéticas (estrógenos del sexo).....	6
4.1.3 Estrógenos sintéticos.....	6
4.1.4 Características fisicoquímicas de los estrógenos naturales y sintéticos.....	7
4.1.5 Efecto de las concentraciones de hormonas en el ambiente.....	9
4.1.6 Presencia de las Hormonas en aguas residuales.....	10
5. Metodología.....	11
6. Resultados.....	11
6.1.1 Implementación de las metodologías (17 $\beta$ -ESTRADIOL Y el 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL, Acetato de 17 $\beta$ -estradiol y Estrona).....	11
6.1.2 Identificación y determinación de tiempos de retención cromatográficos de los compuestos orgánicos.....	12
6.1.3 Generación de los métodos instrumentales (condiciones instrumentales de análisis).....	14
6.1.4 Estandarización de métodos de análisis mediante extracción en fase sólida (bajo consumo de disolventes, es rápida y económica).....	16
6.1.5 Determinación del porcentaje de recuperación de los compuestos orgánicos por extracción en fase sólida.....	17
6.1.6 Validación de métodos de análisis cromatográficos de compuestos orgánicos de interés y cálculo de precisión exactitud, límite de detección, cuantificación y coeficiente de variación.....	17
6.1.7 Discusión de Resultados.....	19
6.1.8 Elaboración de los procedimientos de amoxicilina, diclofenaco y hormonas.....	20
7.1 Conclusiones.....	20
8.1 Bibliografía.....	21
6.2 Desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la determinación de diclofenaco y amoxicilina.....	24
6.2.1 Introducción.....	24
6.2.2.1 Diclofenaco.....	26
6.2.2.1.1 Mecanismo de acción del Diclofenaco.....	26
6.2.3.2 Metodología de análisis.....	26
6.2.3.2.1 Material y reactivos.....	26
6.2.3.2.2 Equipos e instrumentos.....	27
6.2.3.2.5 Método analítico.....	27

6.2.3.2.5.1 Preparación de soluciones.....	27
6.2.3.3 Procedimiento de Extracción de la Muestra.....	29
6.2.5 Plan de prueba para validación.....	30
6.2.6.1 Eficiencia de la columna.....	35
6.2.6.2 Aptitud del Sistema.....	35
6.2.6.3 Linealidad del Sistema.....	36
6.2.6.4 Presición del Sistema.....	37
6.2.6.5 Linealidad del método y porcentaje de recobro.....	38
6.2.6.6 Precisión del Método.....	40
6.2.6.7 Estabilidad analítica de la muestra.....	40
6.2.6.8 Límite de Cuantificación.....	41
6.2.6.9 Robustez.....	41
6.2.6.10 Tolerancia.....	42
7.2 Conclusiones.....	42
8.2 Bibliografía.....	44
6.3.Amoxicilina.....	45
6.3.1 Antibiótico.....	45
Metodología.....	45
6.3.2 Selección del método por HPLC para la determinación de amoxicilina.....	46
6.3.3 Linealidad del sistema.....	46
6.3.5 Optimización del método de extracción ( % de recuperación).....	48
6.3.6.4 Limite de detección y cuantificación.....	56
6.3.6.5 Precisión del sistema.....	56
6.3.6.6 Optimización del método de extracción.....	57
Discusión de Resultados.....	58
7.3 Conclusiones.....	58
8.3 bibliografía.....	

## 7. Conclusiones

7.1 Conclusiones Hormonas.....	20
7.2 Conclusiones Diclofenaco.....	42
7. 3 Conclusiones Amoxicilina.....	58

## 8. Bibliografía

8.1 Bibliografía Hormonas.....	21
8.2 Bibliografía Diclofenaco.....	44
8.3 Bibliografía Amoxicilina.....	59

## 9. Anexos

Anexo A .....	62
---------------	----

## 2. Resumen ejecutivo.

Las sustancias activas de los fármacos son una clase nueva de los así llamados contaminantes emergentes que se han incrementado en los últimos años. Las drogas veterinarias y humanas son continuamente liberadas en el ambiente como resultado de los procesos de fabricación, la disposición de productos no usados o expirados y en las excretas. La cantidad de fármacos y sus metabolitos bioactivos esta siendo introducida al ambiente en pequeñas cantidades; sin embargo su continua introducción puede conducir a altas concentraciones a largo plazo y de forma continua, pero los efectos adversos no han pasado inadvertidos en los organismos acuáticos y terrestres.

El incremento en el uso de estas drogas en el ganado, en la producción de aves, granjas porcícolas y granjas piscícolas durante las últimas cinco décadas ha causado una selección genética de bacterias dañinas, que es materia de gran preocupación. Sin embargo, otros compuestos farmacéuticos, especialmente polares, tales como las drogas ácidas anti-inflamatorias y reguladoras de lípidos también requieren atención. La eliminación de fármacos en las Plantas de Tratamiento de Agua Residual se ha encontrado ser mínima y consecuentemente los efluentes de plantas de tratamiento son una de las principales fuentes de estos compuestos y sus metabolitos recalcitrantes.

Debido a sus propiedades fisicoquímicas (alta solubilidad y poca degradabilidad en agua) son capaces de penetrar en todos los pasos de filtración natural y entrar a los grandes cuerpos de agua así como al agua potable.

Dado la potencial peligrosidad de los fármacos en el medio ambiente, se requiere de metodologías analíticas capaces de determinar dichos compuestos a niveles traza, razón por la cual en el presente trabajo se implementa y valida la determinación de los fármacos amoxicilina, diclofenaco mediante cromatografía de líquidos y hormonas tales como  $17\beta$ -ESTRADIOL Y el  $17\alpha$ -ETINILESTRADIOL, Acetato de  $17\beta$ -Estradiol y Estrona en agua potable y agua residual mediante cromatografía de gases y extracción en fase sólida.

Los parámetros de validación son linealidad del sistema, linealidad del método, límites de detección, límites de cuantificación, precisión y exactitud, así como los porcentajes de recuperación obtenidos mediante la extracción en fase sólida de cada uno de los compuestos emergentes.

En el anexo de este informe se presentan en forma resumida los resultados de validación así como los procedimientos de análisis de cada uno de estos compuestos para agua potable y residual.

## 3. Obtejivos

Identificar compuestos orgánicos emergentes, desarrollar e implementar metodologías para análisis de compuestos por cromatografía de líquidos o gases.

#### 4. Antecedentes

Durante décadas la comunidad científica ha realizado estudios de diversos contaminantes químicos cuya presencia en el medio ambiente está regulada por distintas legislaciones, contaminantes como los compuestos perfluorados sulfonados (PFOs), hidrocarburos aromáticos, pesticidas, dioxinas entre otros (Becker *et al.*, 2008; Bandala *et al.*, 2006; Pressman *et al.*, 2004). Sin embargo, el desarrollo de nuevos y sensibles métodos de análisis ha permitido alertar la presencia de otros contaminantes potencialmente peligrosos, denominados globalmente como emergentes. La agencia de protección ambiental de Estados Unidos de América (EPA) se refiere a los contaminantes emergentes (CE) como materiales o productos químicos caracterizados por ser una amenaza para la salud humana y para el ambiente, los cuales son relativamente nuevos y no se tiene un amplio conocimiento de su impacto en el ambiente y en el hombre, ni hay todavía una normativa que los regule (EPA, 2008;). Los CE son de distinto origen y naturaleza química (Barceló y López, 2007; Smital, 2008). El término “emergente” es usado no solo para el agente contaminante, si no como una nueva “preocupación emergente” por el efecto que desencadena la presencia de estos contaminantes detectados recientemente en el agua residual (Daughton, 2001). Todavía no se tienen datos suficientes para una valoración apropiada de su impacto (Barceló y Petrovic, 2006). La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Dentro de ellos se encuentran:

- Toxinas de cianobacterias y algas
  - Compuestos bromados retardantes de llama
  - Subproductos de desinfección
  - Aditivos de gasolina
  - Hormonas y otros compuestos disruptores endocrinos
  - Compuestos organometalicos
  - Compuestos organofosforados retardantes de llama y plastificantes
  - Compuestos perfluorados
  - Productos de cuidado personal y fármacos
  - Pesticidas polares y sus productos de degradación / transformación
- Surfactantes y sus metabolitos

Está demostrada la presencia de productos farmacológicamente activos en las aguas residuales, así como su baja remoción en los procesos de depuración convencionales (Clara *et al.*, 2006; Joss *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2004; Paxeus, 2004; Petrovic *et al.*, 2003; Strenn *et al.*, 2003). Así mismo, muchos de estos compuestos se han detectado en las aguas superficiales y subterráneas (Drewes *et al.*, 2003; Bernhard *et al.*, 2006), existiendo estudios sobre los efectos acumulativos y tóxicos en los peces. Aún no están claras las consecuencias de la presencia de muchos fármacos en el agua residual y su efecto en el medio ambiente (Poseidon, 2004).

Las aguas superficiales y las aguas subterráneas son actualmente la mayor fuente de producción de agua potable en todo el mundo, sin embargo estudios han revelado

recientemente la presencia de fármacos en ellas, tal es el caso de ciudades como Alemania, Italia, US, Canada, algunos de los fármacos mencionados son : Ácido clofibrico (270 ng/L), bezafibrato (27 ng/L), gemfibrozil (70 ng/L), carbamazepina (258 ng/L), diclofenaco (6 ng/L), penazona (400 ng/L), provocando un alta preocupación al presentarse en agua potable, (Zwiener, 2007; Yi Hua et al., 2006; Quintana y Reemtsma, ; Gross et al., 2007; Farre et al., 2007; Drewes et al., 2003).

Los fármacos llegan al medio ambiente por medio de su metabolización y excreción por el hombre. El fármaco administrado puede ser excretado sin ningún cambio, en forma de conjugados de glucurónidos o sulfatos, como metabolito principal o como una mezcla de muchos metabolitos (Strenn et al., 2004). En general, en el organismo los fármacos son metabolizados por diversos mecanismos, luego son excretados en forma de derivados más polares y solubles en agua, que presentan una actividad farmacológica reducida respecto al compuesto original (Flores et al., 2008; Bellido, 2006).

Por lo anteriormente expuesto se hace necesario identificar y cuantificar estos compuestos emergentes por lo que en el área de cromatografía se desarrollará, implemetará y validará técnicas analíticas para este tipo de compuestos, como son la amoxicilina, diclofenaco y hormonas.

#### **4.1 Hormonas y compuestos disruptores endocrinos.**

Recientemente, se ha puesto atención a un grupo de contaminantes presentes en las aguas municipales, los compuestos disruptores endocrinos (CDEs). Estos compuestos tienen la capacidad de interferir con la función normal del sistema endocrino de los seres humanos y de la fauna. Los CDE son compuestos químicos que interfieren con la actividad normal de las hormonas. La disrupción endocrina puede ser a través de los productos químicos sintéticos que actúan o bloquean la actividad hormonal normal o a través de la exposición de altas dosis de las hormonas naturales producidas en el cuerpo.

Estos compuestos pueden causar efectos reproductivos y de salud irreversibles en seres humanos y fauna.

##### **4.1.1 Clasificación de compuestos disruptores endocrinos.**

Los compuestos disruptores endocrinos se clasifican en cuatro categorías principales: hormonas naturales y sintéticas (estrógenos del sexo) (Thorpe et al., 2003; Colborn y Clemet 1992); metabolitos de los detergentes (Zinder et al., 2000); plastificantes (Sheanan et al., 2002; Purdom et al., 1994), y biocidas (Zinder et al., 2000).

Estos compuestos tienen la capacidad de afectar directa o indirectamente el sistema endocrino de los seres vivos.

Los CDE que se encuentran en el ambiente incluyen: el dicloro difenil tricloetano (DDT) (Sumpter y Jobling, 1995), bifenilos policlorados (Sumpter y Jobling 1995), fenoles (Routledge et al., 1999), Organoclorados (Estrada y García, 2004), ésteres de ftalato (Routledge et al., 1999), etoxilatos alquilfenólicos (Ferguson et al., 2001), y hormonas naturales y sintéticas (estrógenos) (Braga et al., 2005; Aerni et al., 2004; Andersen et al., 2003; D'Ascenzo et al., 2003; Baronti et al., 2000; Larson et al., 1999; Ternes et al., 1999a).

Las hormonas o estrógenos y los etoxilatos alquilfenólicos son los compuestos que han recibido más atención, debido a que su presencia en las aguas residuales han mostrado un mayor impacto en el medio ambiente (Thorpe et al., 2003; Huang y Sedlak, 2001; Korner et al., 2000; Ternes et al., 1999b). De estos dos grupos, los estrógenos naturales y sintéticos presentan una mayor actividad estrogénica en las aguas residuales (Snyder et al., 2001; Korner et al., 2000).

Los principales estrógenos que generan un mayor efecto disruptivo sobre los seres vivos y los cuales se encuentran en las aguas residuales no tratadas y tratadas en concentraciones entre 1 y 400 ng/L son la Estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), Estriol (E3) y 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) (Jurgens et al., 2002; Colborn y Cletet, 1992). Aunque el E3 puede ser detectado en altas concentraciones en los efluentes de las plantas de tratamiento, es un disruptor endocrino que genera una menor actividad estrogénica en los seres vivos comparados con el E1, E2, y EE2. El alto potencial estrogénico del E1, E2 y EE2 se cree que está relacionada con una alta acumulación en el plasma sanguíneo (Larsen et al., 1999; Stumpf et al., 1996).

#### 4.1.2 Hormonas naturales y sintéticas (estrógenos del sexo)

Existen tres grupos principales de hormonas del sexo: las progestinas, andrógenos y estrógenos. El E1, E2, E3 son los estrógenos más importantes. De los tres, el E2 tiene una actividad biológica más alta, el E1 tiene un tercio de esa actividad mientras que la actividad del E3 es solamente el 1% del E2 (Bachrach y Smith 1996). Estas hormonas son los estrógenos principales de las mujeres. También están presentes en los varones, pero en concentraciones más bajas. El E2 se convierte fácilmente a E1. Aunque esta reacción enzimática es reversible, la formación de E1 se ve más favorecida (Cooke y Naaz, 2004) El E3 es un intermediario entre el E1 y E2. La concentración del E3 es generalmente más baja, aumenta durante el embarazo, convirtiéndose en gran medida la hormona predominante del sexo en la madre y el feto (Johnson et al., 2000). El EE2 es compuesto sintético derivado del E2 y es la sustancia activa de las pastillas anticonceptivas.

Los estrógenos y los andrógenos naturales se producen en el organismo masculino y femenino en diversas cantidades. Las hormonas son moléculas lipofílicas, solubles en grasas que se excretan principalmente como glucuronatos solubles o conjugaciones de sulfatos en el agua. Bajo condiciones ambientales estas conjugaciones se hidrolizan rápidamente transformándose en hormonas libres (E1, E2, E3, EE2) (Ternes et al., 1999a; Ternes et al., 1999b).

Los seres humanos excretan varias cantidades de hormonas dependiendo de parámetros tales como edad, estado de salud, embarazo, período menstrual de la mujer. Tyle y Routledge (1998) y Colucci et al. (2001) informaron que las cantidades de estrógenos naturales excretados por los seres humanos en el período pre menopausia de las mujeres se encuentra entre 10 y 100  $\mu$ g/día. La cantidad de E1 excretado es de dos veces más alta en comparación con E2 y E3.

#### 4.1.3 Estrógenos sintéticos

Este grupo de productos farmacéuticos consiste principalmente en pastillas anticonceptivas. Parches anticonceptivos y de administración intramuscular (hormonas para inhibir la ovulación), así como estrógenos usados durante la menopausia. Hasta el momento no se encuentran otras aplicaciones de esto estrógenos sintéticos.

Los estrógenos sintéticos son copias casi exactas de los naturales. Las pastillas anticonceptivas contienen estrógenos sintéticos, tales como el EE2, que se combina a veces con una progestina (progesterona). La dosis típica de administración del EE2 es de 20 a 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Durante 21 días. Después de la administración, aproximadamente el 16.5% del EE2 no es metabolizado en el cuerpo, pero existen conjugados de esta hormona que se encuentra en la orina y un 9% en heces fecales (Johnson et al. 2000). La exposición de organismos a estos estrógenos sintéticos es extremadamente peligrosa.

#### **4.1.4 Características fisicoquímicas de los estrógenos naturales y sintéticos.**

En la Tabla 1. Se muestran las principales propiedades fisicoquímicas de los estrógenos naturales y sintéticos. La solubilidad en el agua de los estrógenos es baja en el rango de 0.3 hasta aproximadamente 13 mg/L. Los estrógenos presentan un alto coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ), indicando que estos compuestos pueden absorberse a una superficie sólida. Todos los estrógenos tienen presiones de vapor muy bajas.

Tabla 1. Características Físicoquímicas de los estrógenos  
(Fuente: Routledge et al. 1998)

Compuesto	Estructura	Peso Molecular	Solubilidad en agua a 20°C (mg/L)	Presión de vapor (mm Hg)	Log K <sub>ow</sub>
Estrona (E1)		270.4 (C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> )	13	1.42E-07	3.13
17β-estradiol		272.4 (C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> )	13	1.26E-08	4.01
17α-etinilestradiol		296.4 (C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> )	11.3	2.6E-09	3.67

Los estrógenos son lípidos formados por una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno ( o esterano), constituida por cuatro carbociclos condensados denominados A,B,C y D que presentan varias sustituciones; un radical metilo en las posiciones C13, un grupo alifático en la posición C17 (EE2), dos grupos hidroxilo en la posición C3, c17. En el caso de la estrona presenta un grupo hidroxilo en la posición C3. La característica distintiva de los estrógenos es la presencia de un triple doble enlace en el anillo A condición que le confiere propiedades aromáticas (anillo fenólico) únicas de este grupo y características únicas para la unión al receptor estrogénico. En las moléculas de los estrógenos se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos (grupo etinil en el caso del EE2 en la posición C17). Así los estrógenos son compuestos hidrofóbicos. Aunque los estrógenos son

principalmente apolares, su cadena lateral tiene un grupo polar hidroxilo capaz de formar puentes de hidrógeno.

Los compuestos disruptores endocrinos fueron identificados concretamente por primera vez en el medio ambiente en Inglaterra (Harries et al., 1994), pero también han sido identificados en ambientes acuáticos en algunos otros países de Europa, Norte y Sudamérica, y Australia (Kira et al., 2002). Los efectos potenciales de la exposición de los estrógenos Estrona, 17 $\beta$ -Estradiol, Estriol, y 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol han sido estudiados en varias especies de peces. Los resultados indicaron que la exposición de estos estrógenos con concentraciones dentro del rango de 4.5 a 8.1 ng/L afectó la capacidad esteroideogénica de los ovarios de los peces (Palace et al., 2006).

Los estrógenos excretados por los humanos ocurren en diferentes tipos de matrices ambientales Tabla 2. Las excreciones humanas son descargadas a través de la orina y heces fecales al sistema de alcantarillado y de ahí a las plantas de tratamiento de aguas residuales donde los estrógenos se pueden degradar biológicamente o pueden adsorberse en el lodo. Sin embargo, los estrógenos removidos por adsorción pueden resorberse y/o entrar nuevamente a la fase líquida cuando el lodo es deshidratado, de esta manera contaminando nuevamente las aguas superficiales, subterráneas y suelos.

Tabla 2 .Concentraciones de los estrógenos en diferentes matrices ambientales.

Matriz ambiental	Estrona E1 (ng/L)	17 $\beta$ -estradiol E2 (ng/L)	17 $\alpha$ -etinilestradiol EE2 (ng/L)	Referencia
Aguas superficiales	<17	<8.8	<5.1	Bachmann et al.(2002) Ying et al. (2002)
Influente de agua residual	44-102	11-180	<120	Busch et al. (2002) Baronti et al. (2000) Solé et al. (2000)
Efluente de agua residual	<82	<21	<62	Bachmann et al. (2002)

Efecto de las concentraciones de hormonas en el ambiente.

Los compuestos emergentes entran en las aguas superficiales y suelos por diferentes caminos o vías tales como los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y excretas de animales. Las hormonas producidas por las excreciones humanas se incorporan rápidamente a los influentes de las plantas de tratamiento donde son removidas y/o biodegradadas parcialmente, quedando concentraciones traza en sus efluentes contaminando así a las aguas superficiales y suelos.

Las descargas de hormonas en aguas residuales comenzaron a finales de los años 80 y cerca de los años 90, con informes de que en el Reino Unido peces machos, encontrados en lagos donde se descargaban los efluentes de las plantas de agua residual presentaban feminización (Harris et al., 1997; Purdom et al., 1994). La exposición a este tipo de CDE en las etapas

predominantes del embarazo puede conducir a malformaciones en los órganos sexuales de los niños con coeficientes intelectuales bajos (Mendes, 2002; Guo et al., 1995). Una teoría sobre la exposición a CDE indica que en mujeres los CDE puede generar cáncer de pecho y endometriosis (Mendes, 2002) y en varones, la exposición a tales compuestos puede ser asociada al cáncer de próstata, disminución del esperma, y cáncer testicular (Méndes, 2002; Toppan et al., 1996; Giwerzman et al., 1993).

En contraste estudios en la fauna son mucho más persuasivos. Se ha informado dos casos bien documentados del impacto en diferentes especies de peces que viven en las aguas superficiales expuestos a las aguas residuales de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas ( Solé et al., 2001; Rodgers-Gray et al., 2000), la producción de vitellogenin (Thorpe et al., 2003) y la feminización en peces machos (Bachman et al., 2002). Vitellogenin es una proteína que se produce en altas concentraciones en el hígado de os peces hembras para el desarrollo de huevecillos (Sumpter, 1995). Por lo tanto, altas concentraciones de vitellogenin en los peces masculinos indican exposición y respuesta a un CDE. En la tabla 3. Se muesotra el impacto de algunos CDE en la inducción de la proteína vitellogenin en peces.

Tabla 3 Concentración letal media de CDE en la inducción de la proteína vitellogenin en la producción de huevecillos en peces.

Compuesto disruptor endocrino	EC50	Referencia
17 $\alpha$ -etinilestradiol	1 ng/L	Palace et al.(2006)
Estrona	60 ng/L	Thorpe et al. (2003)
17 $\beta$ -estradiol	25 ng/L	Thorpe et al. (2003)
17 $\alpha$ -etinilestradiol	1.2 ng/L	Thorpe et al. (2003)

#### 4.1.5 Presencia de Hormonas en aguas residuales.

Los estrógenos naturales así como los sintéticos son CDE que son encontrados en diferentes fuentes de agua (agua superficial, influentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales).

De acuerdo con los datos medidos por Baronti et al., 2000; las concentraciones de E1, E2, E3 y EE2 en algunos influentes de diversas plantas de tratamiento de aguas residuales pueden estar en el rango de 0.4-132 ng/L, aunque existen una gama de valores reportados en otros estudios en los que se informan concentraciones de hasta 140ng/L y menores a 1 ng/L.

Los estrógenos constituyen la gran parte de la actividad estrogénica del agua residual tratada (Chapman, 2003; Koner et al.,1999); Desbrow et al., 1998). El E2 y el producto primario de su ruptura, el E1, se presenta con frecuencia en concentraciones bajas, alrededor de 10 ng/L; mientras que el EE2 se detecta con frecuencia en concentraciones hasta de 0.1 ng/L (Ternes et al. 1999b; Larson et al., 1999; Stumpf et al., 1996). El compuesto EE2 es el estrógeno sintético encontrado con mayor frecuencia en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. Sin embargo, este estrógeno presenta concentraciones bajas comparadas con el E1, E2 y E3.

Estudios realizados por Ternes et al., de estrógenos en los influentes de las aguas residuales de Brasil conteniendo E2 y E1 fueron de 21 y 40 ng/L respectivamente y en Alemania de 15 y 27 ng/L para E2 y E1.

En los Países Bajos también se detectaron E2 y E1 frecuentemente con concentraciones de hasta 47 ng/L para E1 y de 1 y 12 para E2 (Desbrow et al., 1998). Las concentraciones de los estrógenos en las aguas superficiales fueron generalmente más bajas. En diferentes muestreos de varias descargas de efluentes de plantas de tratamiento realizados en Alemania, el E2 se detectó en 20 plantas con concentraciones de hasta 62 ng/L (Stumpf et al., 1996).

En México se han detectado concentraciones de estrógenos en el rango de 0.01 a 25 ng/L (Gibson et al., 2007).

Aunque existe un incremento en la cantidad de datos que se tiene acerca de la concentración de estrógenos en ríos y efluentes de plantas de tratamiento a nivel internacional, en México haya pocos estudios sobre concentraciones de estrógenos en las aguas residuales crudas, aguas superficiales.

Debido a la problemática de los compuestos emergentes (hormonas y fármacos) se planteó la implementación del desarrollo de metodologías por cromatografía de gases y cromatografía de líquidos para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos emergentes (Compuestos disruptores endocrinos (Hormonas), Antibióticos (Amoxicilina) y Antiinflamatorios (Diclofenaco)).

## 5. METODOLOGÍA

- 5.1 Búsqueda bibliográfica de métodos de análisis para la cuantificación de los compuestos
- 5.2 Selección de los métodos a implementar.
- 5.3 Cotización de reactivos, material y estándares.
- 5.4 Identificación y determinación de tiempos de retención cromatográficos de los compuestos orgánicos.
- 5.5 Generación de los métodos instrumentales (condiciones instrumentales de análisis).
- 5.6 Estandarización de métodos de análisis mediante extracción en fase sólida (bajo consumo de disolventes, es rápida y económica).
- 5.7 Determinación del porcentaje de recuperación de los compuestos orgánicos por extracción en fase sólida.
- 5.8 Validación de métodos de análisis cromatográficos de compuestos orgánicos de interés.
- 5.9 Cálculo de precisión exactitud, límite de detección, cuantificación y coeficiente de variación.
- 5.10 Elaboración de los procedimientos de amoxicilina, diclofenaco y hormonas.
- 5.11 Elaboración de informe

## 6. RESULTADOS

### 6.1.1 Implementación de las metodologías (17 $\beta$ -ESTRADIOL Y el 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL, Acetato de 17 $\beta$ -estradiol y Estrona).

Una vez que se seleccionaron los métodos para determinar los compuestos emergentes, se procedió a la implementación analítica como se describe en el siguiente punto.

Implementación de la metodologías, para las hormonas ( $17\beta$ -ESTRADIOL Y el  $17\alpha$ -ETINILESTRADIOL, Acetato de  $17\beta$ -estradiol y Estrona).

Debido a que se requieren diferentes equipos analíticos para la detección y cuantificación de cada familia de compuestos, lo ideal es agrupar los compuestos y emplear un método analítico común y que resulte adecuado. Los dos métodos más comunes para la determinación para las hormonas ( $17\beta$ -ESTRADIOL Y el  $17\alpha$ -ETINILESTRADIOL, Acetato de  $17\beta$ -estradiol y Estrona) son la cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG/MS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de UV-Vis para Amoxicilina y Diclofenaco. Por ambos métodos los compuestos por medir se deben extraer del agua por extracción en fase sólida (SPE) empleando resinas comercialmente disponibles.

Para las hormonas se requiere derivatizar los compuestos previamente al análisis cromatográfico.

6.1.2 Identificación y determinación de tiempos de retención cromatográficos de los compuestos orgánicos.

Para el caso de  $17\beta$ -ESTRADIOL,  $17\alpha$ -ETINILESTRADIOL, Acetato de  $17\beta$ -estradiol y Estrona. La metodología consistió en preparar un estándar de cada compuesto en un disolvente afín (metanol grado pesticida o HPLC) de  $1 \mu\text{g/mL}$ . Cabe mencionar que se usaron estándares certificados marca CHEMSERVICE lote: con fecha de caducidad .

Los estándares se evaporaron con flujo de nitrógeno suave, posteriormente se derivatizaron con  $50 \mu\text{L}$  de BSTFA-TMSCI y piridina por 30 minutos a  $80^\circ\text{C}$ . Pasado el tiempo se deja alcanzar la temperatura ambiente y concentra a sequedad con nitrógeno gas suavemente.

Se cambia de disolvente a tolueno, afora a  $1 \text{ mL}$  con Tolueno y se Inyecta al Cromatógrafo de gases-masas.

Los estándares se inyectaron para generar el método cromatográfico, variando condiciones de análisis, es decir rampas de temperatura para generar picos bien definidos y resueltos, hasta obtener las condiciones cromatográficas y de la trampa iónica adecuadas (tablas 4 a 7), así como los tiempos de retención y los iones característicos de las hormonas Estrona (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2),  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y Acetato de  $17\beta$ -estradiol (E2AcO) con iones característicos de 342, 416, 425 y 366 respectivamente (tablas 1). Los cromatograma generados en modo de barrido (SCAN) de la mezcla de los estándares de hormonas se observan en la figura 1.

Condiciones cromatográficas en modo SCAN para la detección de Estrona (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2),  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y Acetato de  $17\beta$ -estradiol (E2AcO).

Tabla 4. Escaneo de masas

	Segment Description	Start (min.)	End (min.)	Low Mass (m/z)	High Mass (m/z)	Ionization Mode	Ion Preparation
1	FIL/MUL DELAY	0.00	9.00	40	650	None	None
2	EI	9.00	18.50	50	650	EI Auto	None
3							
4							
5							

Add Insert Delete Defaults Restore Special Applications...

Tabla 5. Rampeo de temperaturas

Column Oven Coolant:  On  Off  
 Enable Coolant at (C):   
 Coolant Timeout (min):   
 Stabilization Time (min):

	Temp (C)	Rate (C/min)	Hold (min)	Total (min)
1	160		3.50	3.50
2	260	25.0	0.00	7.50
3	270	1.0	0.00	17.50
4	300	30.0	0.00	18.50
5				
6				
7				
8				

Add Insert Delete

Transfer Line

Tabla 6. Condiciones de Inyector

Front Injector | Middle Injector | Rear Injector |  
 Front Injector Type:  Injector Oven:  On  Off  
 Temperature (C):

Split Ratio...

**Split Ratio for Front 1177 + Front Type 1 EFC**

	Time	Split State	Split Ratio
1	Initial	Off	Off
2	3.00	On	20
3			
4			
5			
6			

Column Oven End Time: 18.50 min

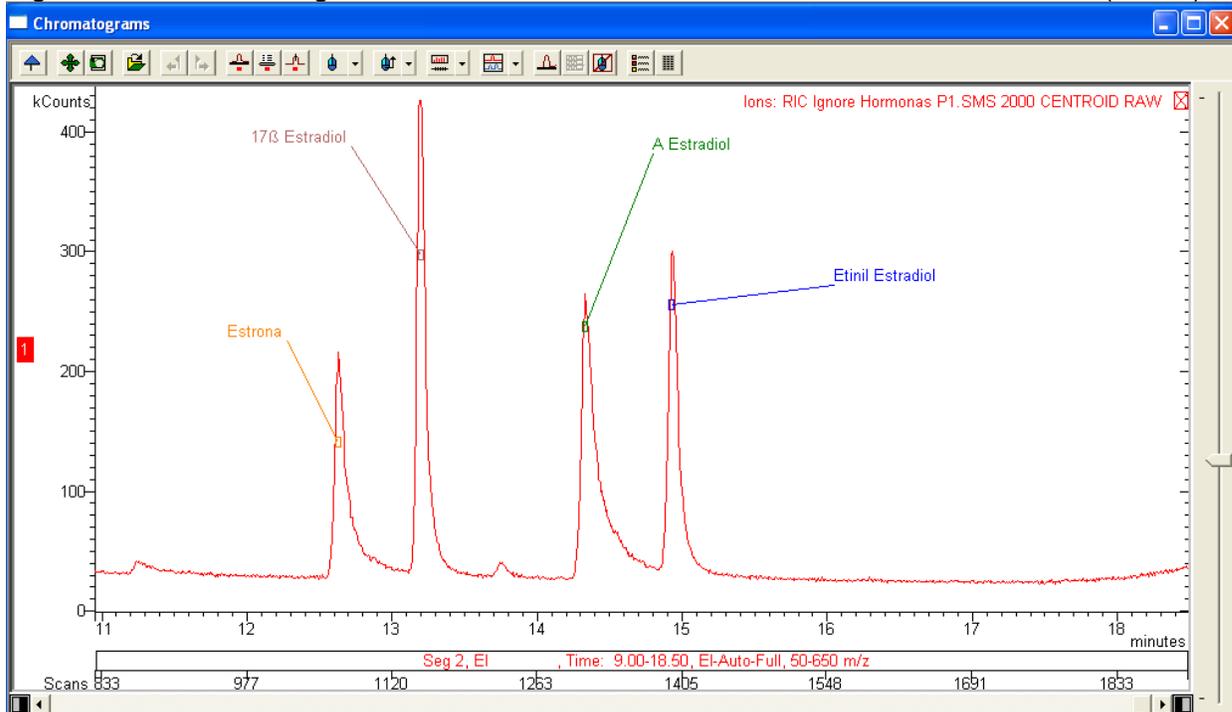
Save Cancel

Add Insert Delete Sort

Tabla 7. Iones Característicos y tiempos de retención de Estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y Acetato de 71 $\beta$ -estradiol (E2AcO).

	Ret	IS	Compound ID	Quan Ion	Calcul	Integration	Identificat	Ref. Spectrum
1	12.632		E1	342.0, C:M	Linear, 0.15, W:20.0, S:1	0.15, Spec	342.0, 343.0, 325.0	
2	13.184		E2	416.0, C:M	Linear, 0.15, W:20.0, S:1	0.15, Spec	416.0, 417.0, 415.0	
3	14.339		E2AcO-	386.0, C:M	Linear, 0.20, W:20.0, S:50	0.20, Spec	386.0, 387.0, 385.0	
4	14.927		EE2	425.0, C:M	Linear, 0.20, W:25.0, S:1	0.20, Spec	73.0, 425.0, 75.0	
5								
6								
7								
8								
9								
10								

Figura 1. Cromatograma de Hormonas en modo de Barrido (SCAN)



Para hacer más sensible el método y alcanzar los límites de cuantificación y los límites de detección más bajos se generó el método de Masas /Masas ( tabla 8 a 11).

Generación de los métodos instrumentales (condiciones instrumentales de análisis).

## CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Tabla 8.RAMPEO DE TEMPERATURAS    Tabla 9. CONDICIONES DE INYECTOR

Column Oven Coolant:  On  Off

Enable Coolant at (C):

Coolant Timeout (min):

Stabilization Time (min):

	Temp (C)	Rate (C/min)	Hold (min)	Total (min)
1	160		3.50	3.50
2	260	25.0	0.00	7.50
3	270	1.0	0.00	17.50
4	300	30.0	0.00	18.50
5				
6				
7				
8				

Buttons: Add, Insert, Delete, Transfer Line

Front Injector | Middle Injector | Rear Injector

Front Injector Type: 1177 | Injector Oven:  On  Off

Temperature (C):

Split Ratio...

**Split Ratio for Front 1177 + Front Type 1 EFC**

Time	Split State	Split Ratio
1	Initial Off	
2	3.00 On	20
3		
4		
5		
6		

Column Oven End Time: 18.50 min

Buttons: Save, Cancel

Tabla 10. CONDICIONES DE MASAS/MASAS con un intervalo de 50m/z a 650 m/z.

	Segment Description	Start (min.)	End (min.)	Low Mass (m/z)	High Mass (m/z)	Ionization Mode	Ion Preparation
1	FIL/MUL DELAY	0.00	9.00	40	650	None	None
2	E1	9.00	12.43	50	650	EI Auto	None
3	E1	12.43	13.05	100	420	EI Auto	MS/MS
4	E2	13.05	14.20	100	420	EI Auto	MS/MS
5	E2AcD	14.20	14.75	100	420	EI Auto	None

Buttons: Add, Insert, Delete, Defaults, Restore, Special Applications...

Segment Setpoints | Ionization Mode - EI Auto | Ion Preparation - MS/MS

Scan Time:  seconds/scan | Count Threshold:  counts

Multiplier Offset:  +/- volts | Mass Defect:  mmu/100u

Emission Current:  uamps | Cal Gas

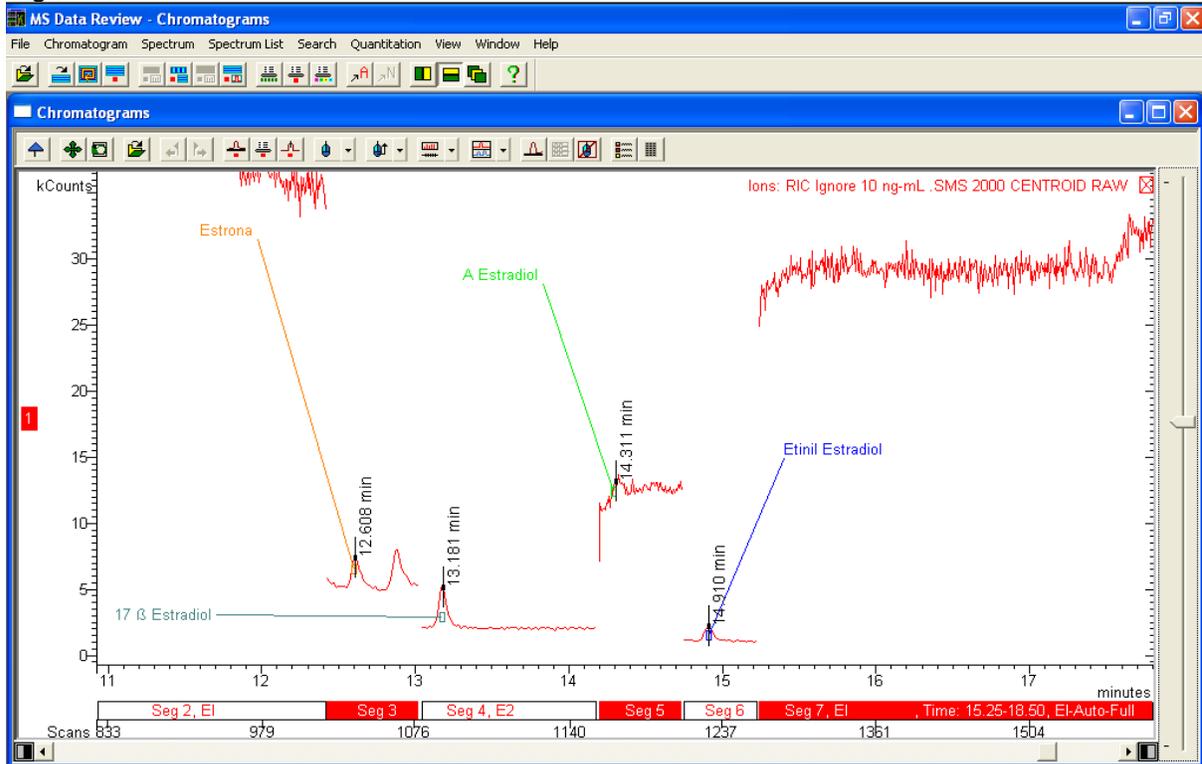
Buttons: Defaults, Restore

Tabla 11. IONES CARACTERÍSTICOS Y TIEMPOS DE RETENCIÓN

	Ret	IS	Compound ID	Quan Ion	Calcu	Integration	Identificat	Ref. Spectrum
1	12.618		E1	342.0, C:M	Linear,	0.15, W:20.0, S:1	0.15, Spec	342.0, 343.0, 325.0
2	13.188		E2	416.0, C:M	Linear,	0.15, W:20.0, S:1	0.15, Spec	416.0, 417.0, 415.0
3	14.307		E2AcD	386.0, C:M	Linear,	0.20, W:20.0, S:50	0.20, Spec	386.0, 387.0, 385.0
4	14.940		EE2	425.0, C:M	Linear,	0.20, W:25.0, S:1	0.20, Spec	425.0, 426.0, 424.0
5								

Una vez ajustados los tiempos de retención y las condiciones cromatográficas para el método de Masas/Masas, se inyectó una solución de la mezcla de Hormonas de 10 ng/L, generándose el siguiente cromatograma (figura 2).

Figura2. CROMATOGRAMA CON CONDICIONES DE MS/MS



Una vez generado el método se procedió a generar las curvas de calibración para las hormonas mencionadas (gráficos 1 a 3).

Estandarización de métodos de análisis mediante extracción en fase sólida (bajo consumo de disolventes, es rápida y económica).

Gráfica 1. Curva de calibración de la Estrona rango de concentración de 0.046 ng/L a 0.740 ng/L

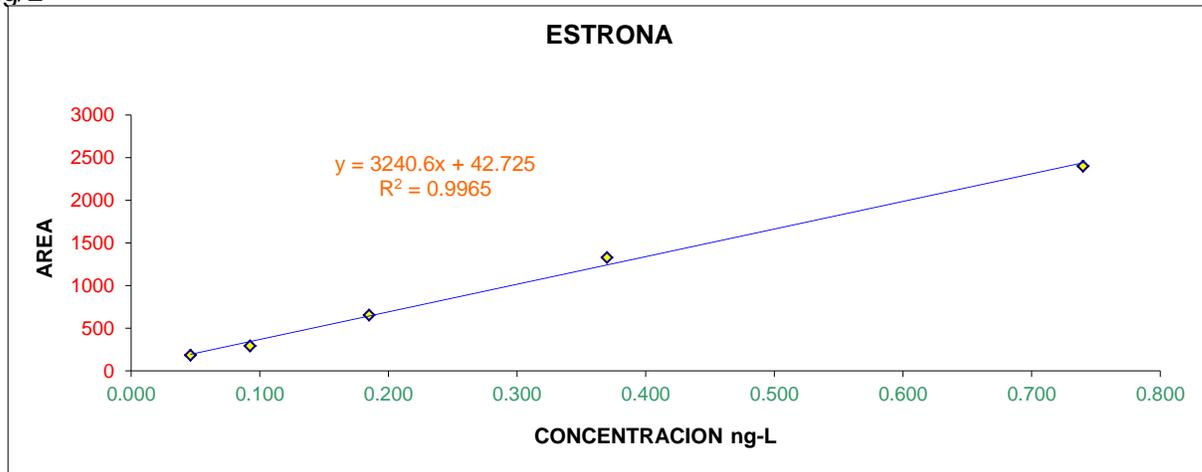


Gráfico 2. Curva del 17 $\beta$ -Estradiol rango de concentración de 0.046 ng/l a 0.720 ng/L.

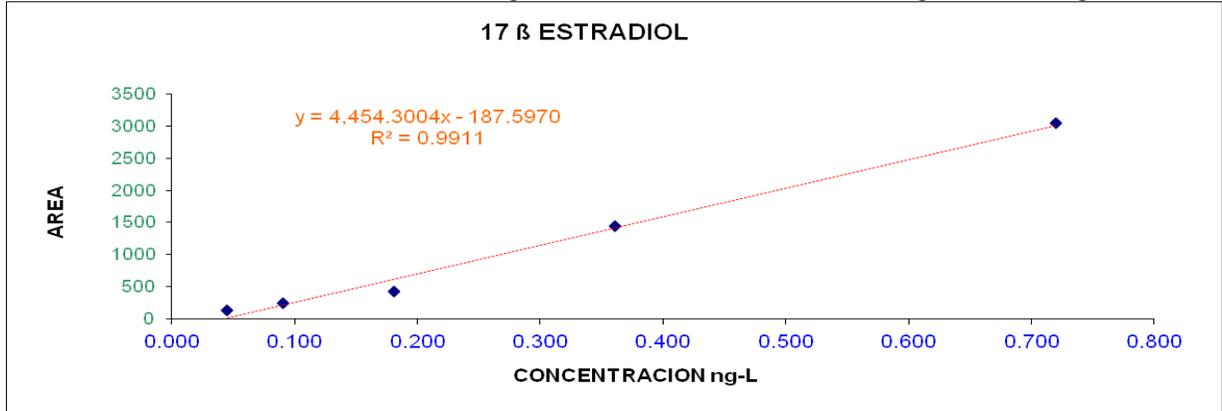
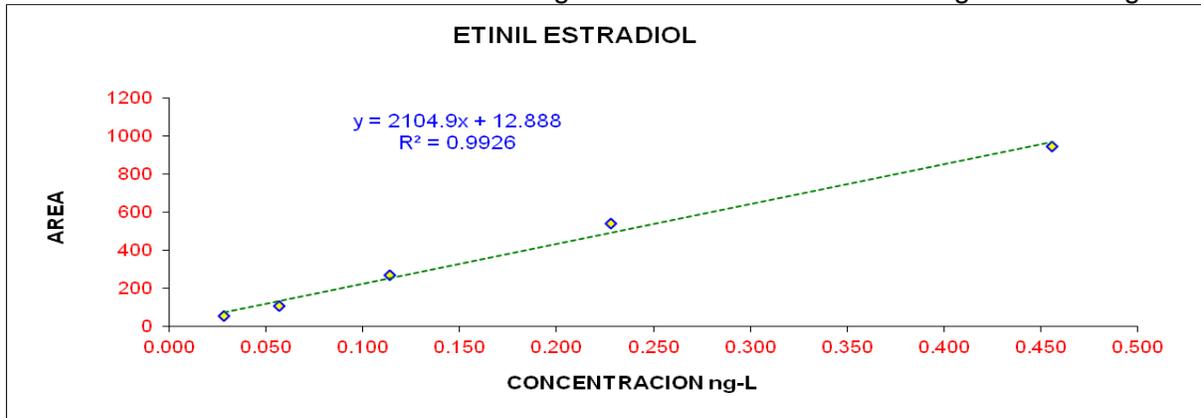


Gráfico 3. Curva del 17 $\alpha$ -etinilestradiol rango de concentración de 0.028ng/L a 0.456 ng/l.



Una vez generada la curva de calibración y obtenidos los parámetros de linealidad (m,b,r), se procedió a realizar dos curvas de calibración más para iniciar de esta forma el proceso de validación como se indica en el procedimiento CAGC7-06.

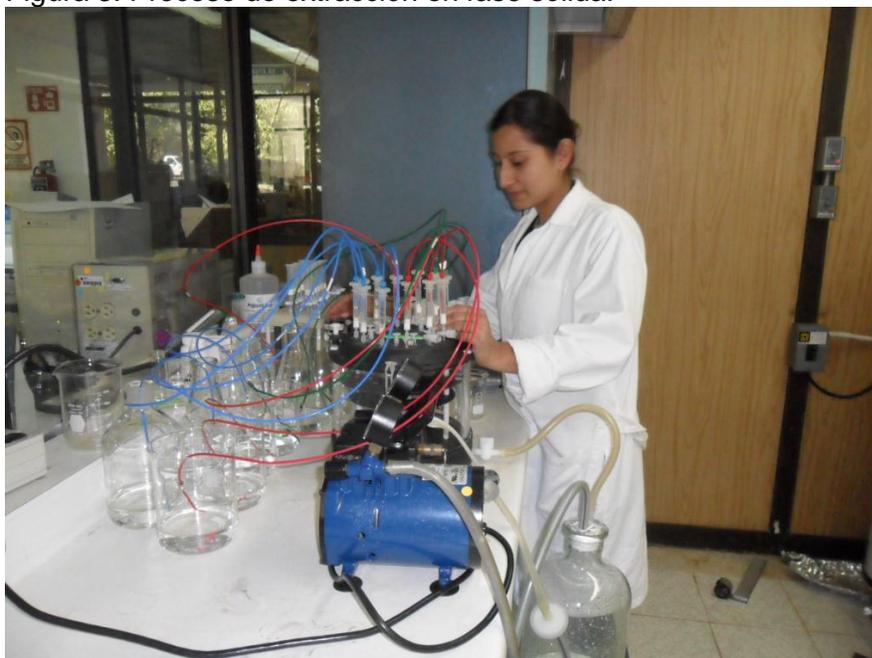
### ***Determinación del porcentaje de recuperación de los compuestos orgánicos por extracción en fase sólida***

Posterior a esto se acondicionaron los cartuchos de extracción en fase sólida para la prueba de desempeño de las hormonas, así como la obtención del porcentaje de extracción de cada analito.

### ***Validación de métodos de análisis cromatográficos de compuestos orgánicos de interés y cálculo de precisión exactitud, límite de detección, cuantificación y coeficiente de variación***

Para el cálculo de los límites de detección, límite de cuantificación del método, precisión y exactitud, se prepararon siete soluciones estándar de concentración más baja de la curva de calibración. Las siete soluciones de concentración baja se sometieron al proceso de extracción en fase sólida con cartuchos de extracción Figura 3.

Figura 3. Proceso de extracción en fase sólida.



Una vez que se pasaron las muestras de agua fortificadas con analitos, estos se dejaron secar en el sistema. Se enjuagaron los cartuchos de extracción con agua acidulada a  $\text{pH} < 3$ , se dejaron secar y posteriormente se eluyeron los analitos con metanol, se evaporaron con un flujo de nitrógeno como se muestra en la figura 4.

Figura 4. Evaporación de muestras con flujo de nitrógeno.



Se derivatizaron con BSTFA/MSCI y piridina a una temperatura de 80°C por 30 minutos en estufa. Pasado el tiempo se sacaron y dejaron enfriar. Se realizó el cambio de disolvente a tolueno y se reconstituyó con tolueno y por último se inyectaron al Cromatógrafo de Gases – Espectrometría de Masas.

En el anexo A se presentan los datos de linealidad, los límites de detección del método, límites de cuantificación, precisión, exactitud e intervalos de confianza para las hormonas.

### **Discusión de Resultados.**

El método de derivatización más adecuado y que presenta una mayor sensibilidad es con el BSFTA mezclado con TMCSI y piridina como catalizador a 80 °C por 30 minutos.

De las pruebas de desempeño se observan que los límites de detección son del orden de nanogramos 0.007 ng/L, 0.003ng/L, 0.002 ng/L para 17β-estradiol, Estrona, y 17α-etinilestradiol respectivamente.

Se calculó la Linealidad y posteriormente se prepararon las soluciones requeridas en el procedimiento de prueba de desempeño para obtener los límites de detección, cuantificación, precisión, exactitud e intervalos de confianza como se indica en el procedimiento CAGC7-06. Los resultados se presentan en el anexo A para 17β-estradiol, Estrona, y 17α-etinilestradiol.

En cuanto a los límites de cuantificación se obtuvieron de 0.064, 0.053 y 0.026 para 17 $\beta$ -estradiol, Estrona, y 17 $\alpha$ -etinilestradiol por debajo de las concentraciones reportadas en la bibliografía, lo que hace al método aplicable a aguas residuales y de abastecimiento. La precisión fue de 4.805, 1.632 y 6.99 y la exactitud de 103.203, 94.94, 64.51 lo que confirma que el método es aplicable para la determinación de estos compuestos y que además cumple con los criterios del procedimiento CAGC7-06.

### ***Elaboración de los procedimientos de amoxicilina, diclofenaco y hormonas***

Un vez concluido la validación de las hormonas 17 $\beta$ -estradiol, Estrona, y 17 $\alpha$ -etinilestradiol, se procedió a generar su procedimiento de análisis el cual se encuentra en el Anexo A (página ), junto con el de diclofenaco y amoxicilina.

## **7. CONCLUSIONES.**

La cromatografía de gases masas con extracción en fase sólida es una técnica sensible y adecuada para la determinación de 17 $\beta$ -estradiol, Estrona, y 17 $\alpha$ -etinilestradiol en agua de abastecimiento y en agua residual.

El método fue probado con agua de grifo, agua de arrollo residual y en agua residual obteniéndose porcentajes de recuperación aceptables en los tres tipos de matriz.

Tanto el 17 $\beta$ -estradiol, Estrona, y 17 $\alpha$ -etinilestradiol presentan una alta correlación, como lo indica la linealidad de cada uno de los compuestos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Aerni H.R., Koble b., Rutishañuser B.V., Wettsteint F.E., Fisher R., Giger W., Hungerbuhler A., Marazuela M.D., Peter A., Schonengerger R., Vogeli A.C., Suter M.J., Eggen R.I.L. 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plants effluents. *Analytical Bioanalytical and Chemistry*. 378, 688-696.
- Andersen H., Siegrist H., Halling-Sorensen B., Ternes T.A. 2003. Fate of estrogens in municipal sewage treatment plant. *Environmental Science and Technology*. 37, 4021-4026.
- Bachmann C.L., Winther N.M., Helweg C. 2002 . Feminisation of fish- The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plant and nature. *Chemico-biological interactions*, 729.
- Barceló D., Petrovic M. 2008. Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Occurrence, Analysis and Effects. *The Handbook of Environmental Chemistry Vol.5.S1*.
- Bachrach B.E., Smith E.P. 1996. The role of sex steroids in bone growth and development: evolving new concepts. *Endocrinologist*. 6, 362-368.
- Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science and Technology*. 34. 5059-5066.
- Braga O., Smythe G.A., Schafer A.I., Feitz A.J. 2005. Steroid estrogens in primary and tertiary wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*. 52, 273-278.
- Busch K., Hegemann W., Spengler P., Metzger J.W. 2002. Influence of Different Process Techniques in Sewage Plants to Eliminate Selected Endocrine Disruptors. *Water Science and Technology*. 197-204.
- Colborn T., Cletmet C. 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development. *The wildlife/human connection*, New Jersey: Princeton Scientific Publishing.
- Colucci M.S., Bork H., Topp E. 2001. Persistence of Estrogenic Hormones in Agricultural Soil: 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone. *Journal Environmental Quality*. 30, 2070-2076.
- Cooke P.S. Naaz A. 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Experimental Biology and Medicine*. 229, 1127-1135.
- Chapman H. 2003. Removal of endocrine disruptors by tertiary treatments and constructed wetlands in subtropical Australia. *Water Science and Technology*. 47, 151-156.
- D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Manzini R., Mastropasqua R. Nazzai M., Samperi R. 2003. Fate of natural estrogens conjugated in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science Total Environmental*. 32, 199-209.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. Waldosk M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological effects on fish. *Environmental Science and Technology*. 34, 1521-1528.
- EPA Method 1698. Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS. December 2007.
- Estrada A.E.B., García S.L. 2004. Biodegradación del 1,2-dicloroetano de aguas residuales de la industria petroquímica por biofiltración sobre medio orgánico. Tesis de licenciatura. UAEM.

Estrada Arriaga E.B. 2011. Tesis doctoral Tratamiento de Aguas Residuales Municipales con Presencia de compuestos disruptores endocrinos mediante un bioproceso aerobio con membranas.

Ferguson P.L., Charies R.I., Anne E.M., Brownawell B.J. 2001. Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-Electrospray-MS Analytical Chemistry. 73, 3890-3895.

Gibson R., Becerril-Bravo E., Silva Castro V., Jimenez B. 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1169, 31-39.

Giwercman A., Carlson E., Keiding N., Skakkebaek N.D. 1993. Evidence for Increasing Incidence of Abnormalities of the Human Testis: A Review. Environmental Health Perspectives Supplements. 101(2), 65-71.

Guo Y.L.; Lambert G.H., Hsu C.C. 1995. Environmental Health Issues. Environmental Health Perspectives, 103, (S6): 112-115.

Harries J.E., Sheenan D.; Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T., Zaman N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environmental Toxicology and Chem.

Huang C. H., Sedlak D., 2001. Analysis of Estrogenic Hormones in Municipal Wastewater Effluent and Surface Water Using Enzymelinked Immunosorbent Assay and Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Environmental Toxicology Chemistry. 20, 133-139. mistry. 16, 534-542.

Johnson A.C., Belfroid B., Di Corcia A. 2000. Estimation of steroid estrogens inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. Science Total Environmental. 256, 163-173.

Kira L.A., Tyler C.R., Lye C.M., Sumpter J.P. 2002. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment Works. Environmental Toxicology and Chemistry. 21, 972-979.

Koner W., Hanf V., Chuller W., Kempter C., Metzger J.W., Hagenmaier H. 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. Science Total Environmental. 225, 33-48.

Korner W., Bolz U., Sussmuth W., Hiller G., Shuller W., Hanf V., Hagenmaier H. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in maor municipal sewage plant in Germany. Chemosphere. 40, 1131-1142.

Larson D.G. J., Adolffsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P-E. Forlin L. 1999. Ethinylestadiol-An undesired fish contraceptive?. Aquatic Toxicology. 45, 91-97.

López de Alda M., Barceló D. 2001. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for simple preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water.

Mendes J.J. 2002. The Endocrine Disrupters: A Major Medical Challenge. Food and Chemical Toxicology. 40 (6), 781-788.

Palace V., Wautier K., Evans R., Blanchfield P., Mills K., Chalanchuk S., Godard D., McMaster M., Tetreault G., Peters L., Vandenbyllaardt L., Kidd A. 2006. Biochemical and histopathological effects in pearl dace (*margariscus margarita*) chronically exposed to a synthetic estrogens in a whole lake experiment. Environmental Toxicology and Chemistry, 25: 1114-1125.

Purdum C.E., Hardiman. P.A., Bye V.J., ENo N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chemistry and Ecology. 8, 275-285.

- Rodgers-Gray T.P., Jobling S., Morris S., Kelly C., Kirby S., Janbakhsh A., Harries J.E., Waldock M.J., Sumpter J.P., Tyler C.R. 2000. Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. *Environmental Science and Technology*. 34,(8), 1521-1528.
- Routledge E.J., Sheanan D.A., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Stumpter J.P. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science and Technology*. 32, 1559-1565.
- Routledge E.J., Waldock M., Sumpter J.P. 1999. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 1. Chemical fractionation and in vitro biological screenin. *Environmental Science and Technology*. 33, 371.
- Sheanan D. A., Brighty G.C., Danie M. Jobling S., Harries J.E., Hurst M.R., Kennedy J., Kirby S.J., Morris S., Routledge E.J., Sumpter J.P., Walddock M.J. 2002. Reduction in the estrogenic activity of a treated sewage effluent discharge to an English river as a result of a decrease in the concentration of industrially derived surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 515-519.
- Silva Castro V. 2008. Tesis de maestria. Evaluación de Contaminantes Emergentes en Fuentes de Abastecimiento del Valle de Tula.
- Snyder S.A., Villeneuve D.L., Snyder E.M., Giesy J.P. 2001. Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. *Environmental Science and Technology*. 35, (18), 3620-3625.
- Solé M. López de Alda M.J., CastilloM., Porte C., Ladegaard-Pedersen K., Barceló D. 2000. Estrogenicity Determination in Sewage Treatment Plants and Surface Waters from the Catalanian Area (NE Spain). *Environmental Science and Technology*. 34, 5076-5083.
- Solé M., Porte C., Barceló D. 2001. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 20(9), 518-525.
- Sumpter J.P., Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspective*. 103, 173-178.
- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Sevos M. 1999a. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science Total Environmental*. 225, 91-99.
- Ternes T.A., Kreckel P., Mueller J. 1999b. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activate sludge. *Science Total Environmental*. 225, 91-99.
- Thorpe K.L., Cummings R.I., Hutchinson T.H., Scholze M., Brighty G., Stumpter J.P., Tyler C.R. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science and Technology*, 37: 1142-1149.
- Toppan J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Cuillette Jr., L.J., Jégou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Mueller J., Rajpert-De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Shakkebaek N.E. 1996. Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. 104 (S4), 741-803.
- Tyler, C.R., Routledge E.J. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogen: the scientific basis for risk assessment – Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Applied Chemistry*. 70, 1795-1804.

Ying G.G., Kookana R.S., Ru Y.J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment.. Environ. Int .28, 545-551.

## **6.2 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA DETERMINACIÓN DE DICLOFENACO Y AMOXICILINA.**

### 6.2.1 Introducción.

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos y, en particular, los antibióticos. El consumo de fármacos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Jones OA et al., 2001).

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años 70 con la identificación en aguas residuales en EEUU del ácido clofibrato, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato, y etofibrato). Sin embargo, no ha sido hasta principios de la década de los 90 que el tema de los fármacos en el medio ambiente ha surgido con fuerza, como demuestran los numerosos artículos publicados desde entonces, los cuales han despertado un gran interés científico y social (tal y como ocurrió en España tras la publicación en la prensa de algunos de los resultados obtenidos por el equipo de investigación del Dr. Barceló: El Periódico, 26 Octubre 2005; El País, Enero 2006; El global, 30 Enero 2006).

Entre los fármacos mas prescritos en medicina humana destacan los Analgésicos /antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamacepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los  $\beta$ -bloqueantes como el metoprolol. A estos cabe añadir los, cada vez más, utilizados en veterinaria, en actividades como la acuicultura, la ganadería, y la avicultura. Según las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático es necesario un estudio integrado agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial suelo.

Los fármacos que se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea directamente o sus metabolitos, incluyen analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos,  $\beta$ -bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides y otros, como broncodilatadores, tranquilizantes, etc. (Hernando MD et al., 2006a).

Las concentraciones a las que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el rango de ng/L o  $\mu$ g/L, mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofibrato, por ejemplo, se estima en 21 años), alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando MD et al., 2006a; Díaz-Cruz MS, Barceló D, 2005). Pero lo que ha despertado una mayor preocupación ha sido el hallazgo de algunos de ellos (como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamacepina, o el ácido clofibrato) en aguas potables (Bedner M, Maccrehan WA, 2006).

En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están aún claras, pero en otros el riesgo parece evidente, y alarmante. Así, por ejemplo, el diclofenaco, aparte de afectar a los riñones en los mamíferos, se ha asociado (como consecuencia de su uso en veterinaria) con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistán, lo que supone, según el autor de este estudio (Fent K et al., 2006), un desastre ecológico comparable al acontecido en el pasado con el DDT. Otro ejemplo es el del propanolol, que el equipo de investigación del Dr. Barceló ha detectado en múltiples ocasiones en España (Hernando MD et al., 2006b), y que se ha visto tiene efectos sobre el zooplancton, así como sobre los organismos bentónicos (Fent K et al., 2006).

Como resultado de las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora, algunos fármacos están siendo considerados por la US EPA como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de los contaminantes orgánicos prioritarios en el agua potable, como es el caso del diclofenaco (antirreumático), la carbamacepina (antiepiléptico), y el cloranfenicol (antibiótico). En la UE, por el momento, no se han fijado límites máximos en el agua potable, y por tanto, no es necesario el seguimiento de tales compuestos, sin embargo, lo más probable es que en un futuro próximo sean regulados.

Actualmente en Europa hay más de 3000 ingredientes activos permitidos para su uso en el cuidado de la salud. Sin embargo, desde que se detectara el primer residuo de ácido clofibrico hasta el momento, únicamente unos 100 de ellos han sido alguna vez analizados en diferentes compartimentos medioambientales. La necesidad de seguir trabajando en esta línea de investigación, en la que se debe incluir el estudio de los metabolitos y los productos de transformación (Miao XS et al., 2005; Bedner M, Maccrehan WA, 2006), es, por tanto, evidente. Por el momento el número de artículos dedicados al análisis de fármacos en aguas es muy superior al del análisis en matrices sólidas (Díaz-Cruz S et al., 2003; Díaz-Cruz MS, Barceló D, 2005; Hernando MD et al., 2006a). Ello probablemente es debido a la gran complejidad que representa el estudio de tales matrices. Sin embargo, los avances tecnológicos habidos en el campo de la química analítica permiten afrontar hoy por hoy este reto con grandes probabilidades de éxito.

Para el análisis de fármacos se han empleado fundamentalmente la cromatografía de gases y la de líquidos con espectrometría de masas, pero la tendencia es a emplear, tanto en una como en otra, la espectrometría de masas en tándem para poder diferenciar entre posibles isómeros (Díaz-Cruz MS, Barceló D, 2005; Petrovic et al., 2005; Petrovic M, Barceló D, 2006). Los grupos de fármacos que en la actualidad se consideran mas peligrosos y demandan investigación son:

- los antibióticos, por la posibilidad de que se desarrollen cepas bacterianas resistentes que hagan que estos compuestos resulten ineficaces para el fin para el que fueron diseñados (Díaz-Cruz S et al., 2003) (los antibióticos ocupan el tercer puesto en volumen de uso de todos los fármacos empleados en medicina humana, y el 70% de los empleados en medicina veterinaria),
- los medios de contraste en rayos X, porque son muy persistentes, no resultan eliminados en las plantas de tratamiento, y alcanzan fácilmente las aguas subterráneas por percolación a través de suelos.
- los citostáticos, porque debido a su gran potencia farmacológica, exhiben con frecuencia propiedades carcinogénicas, muta génicas o embriogénicas, y, al igual que los anteriores, parecen presentar una eliminación negligible en los procesos de depuración, y los estrógenos, utilizados fundamentalmente como anticonceptivos y para el tratamiento de desórdenes hormonales tan frecuentes como la menopausia, que son los responsables en muchos casos de la aparición de fenómenos de feminización, hermafroditismo, y disminución de la fertilidad.

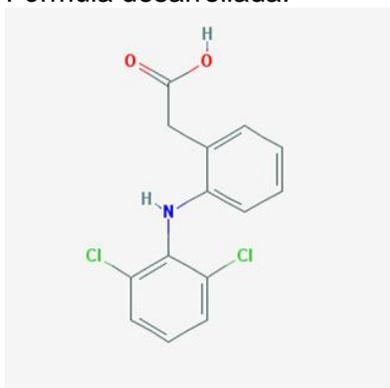
Debido a lo anteriormente expuesto, se implementa en el laboratorio de calidad del agua la metodología de análisis de diclofenaco y amoxicilina.

### 6.2.2.1 DICLOFENACO.

#### 6.2.2.1.1 Mecanismo de acción del Diclofenaco:

EL Diclofenaco es un fármaco anti-inflamatorio, analgésico y tiene actividad antipirética. Los mecanismos exactos no han sido claramente establecidos pero muchas de las acciones parecen estar asociadas principalmente con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. El Diclofenaco inhibe la síntesis de prostaglandinas en los tejidos del cuerpo por la inhibición de la ciclo-oxigenasa, por lo menos dos isoenzimas de la ciclo-oxigenasa 1 (COX-1) y 2 (COX-2) (también conocida como prostaglandina G / H sintasa-1 (PGHS-1) y 2 (PGHS-2), respectivamente), han identificado que catalizan la formación de prostaglandinas en la ruta del ácido araquidónico. El Diclofenaco inhibe tanto la COX-1 y COX-2 que, se presume, es responsable de los efectos de los medicamentos no deseados en la mucosa gastrointestinal y la agregación plaquetaria. Puede bloquear la generación del dolor a través de una acción periférica que puede implicar la reducción de la actividad de las prostaglandinas, y posiblemente la inhibición de la síntesis o acciones de otras sustancias que sensibilizan los receptores del dolor a la estimulación mecánica o química.

Fórmula desarrollada:



Propiedades fisicoquímicas:

Fórmula molecular: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Peso molecular: 296.15

Olor: Sin olor

Solubilidad: En agua, 50 mg/mL a 25°C

### 6.2.3.2 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

#### 6.2.3.2.1 Material y reactivos.

#### 6.2.3.2.2 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de Líquidos HP 1050, calibrado
- Balanza analítica OHAUS Discovery, código E-866, calibrada
- Balanza analítica OHAUS Explorer Pro, código Tar-PP-03
- Potenciómetro Orion-Termo, calibrado
- Baño Ultrasónico
- Parrilla de agitación

#### 6.2.3.2.2 Reactivos y disolventes

- Fosfato monobásico de potasio J. T. Baker, grado reactivo
- Hidróxido de sodio J. T. Baker, grado reactivo
- Ácido fosfórico, Baker Analyzed; grado reactivo
- Metanol, Fermont, grado HPLC
- Acetonitrilo, Honeywell, grado HPLC
- Agua deionizada

#### 6.2.3.2.3 Material

- Matraces volumétricos calibrados de 10, 25, 100 y 1000mL
- Pipetas volumétricas calibradas de 2 y 5mL
- Probeta calibrada de 100 y 1000 mL
- Acrodiscos de Nylon "Millex" con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$
- Micropipetas calibradas de 500 y 1000  $\mu\text{L}$ , código, EM-UA-09
- Cartuchos de separación Chromabond C18 3mL/500mg REF 730 013

#### 6.2.3.2.4 Sustancia de referencia

- Sustancia de referencia primaria de Diclofenaco, pureza 98%, Lote BCBD2026V

Denominación Común Internacional (DCI)	Diclofenaco
Denominación Genérica	Diclofenaco
Número de Lote	BCBD2026V
Fecha de Caducidad	Octubre de 2018
Fabricante	SIGMA

#### 6.2.3.2.5 Método analítico

##### 6.2.3.2.5.1 Preparación de soluciones

**6.2.3.2.5.2 Solución fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 4.7 ± 0.1.** Disolver 3.40g de fosfato de potasio monobásico en un volumen aproximado de 700mL de agua deionizada, agitar hasta disolver completamente, ajustar pH a 4.7 ± 0.1 y aforar con agua en un matraz de 1000mL.

**6.2.3.2.5.2 Solución fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 11 ± 0.1.** Disolver 0.34g de fosfato de potasio monobásico en un volumen aproximado de 70mL de agua deionizada, agitar hasta disolver completamente, ajustar pH a 11 ± 0.1 y aforar con agua en un matraz de 100mL.

**6.2.3.2.5.3 Fase móvil pH 6 ± 0.1.** Mezclar un volumen de 150mL de solución de fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 4.7 ± 0.1 y 350mL de acetonitrilo. Filtrar a través de membrana de 0.45 µm y sonicar por un periodo de 10 minutos. Ajustar la mezcla a pH 6 ± 0.1 con NaOH 1N

**6.2.3.2.5.4 Solución reconstituyente.** Mezclar un volumen de 30mL de solución de fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 11 ± 0.1 y 70mL de acetonitrilo. Ajustar, si es necesario, pH de la solución a 12 con NaOH 1N.

**6.2.3.2.5.5 Solución de lavado.** Preparar una solución 70/30 de fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 4.7 y acetonitrilo.

**6. 2.3.2.5.6 Solución Stock de referencia Diclofenaco, 1000 µg/mL.** Pesar 10.20mg de sustancia de referencia de Diclofenaco y verter en un matraz volumétrico de 10mL, disolver con 5mL de metanol y sonicar 10min hasta la dilución completa. Llevar a volumen con metanol.

**6. 2.3.2.5.7 Solución Estándar de Diclofenaco 40 µg/mL (Sol. A).** Transferir 1 mL de la solución Stock de Diclofenaco a un matraz volumétrico de 25mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.8 Solución Estándar de Diclofenaco 4 µg/mL.** Transferir 1mL de la solución Estándar de Diclofenaco 40 µg/mL (Sol. A) a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.9 Solución Estándar de Diclofenaco 2 µg/mL.** Transferir 5mL de la solución Estándar de Diclofenaco 4 µg/mL a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.10 Solución Estándar de Diclofenaco 1 µg/mL.** Transferir 2.5mL de la solución Estándar de Diclofenaco 4 µg/mL a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.11 Solución Estándar de Diclofenaco 0.4 µg/mL.** Transferir 2mL de la solución Estándar de Diclofenaco 2 µg/mL a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.12 Solución Estándar de Diclofenaco 0.2 µg/mL.** Transferir 1mL de la solución Estándar de Diclofenaco 2 µg/mL a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.13 Solución Estándar de Diclofenaco 0.08 µg/mL.** Transferir 2mL de la solución Estándar de Diclofenaco 0.4 µg/mL a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

**6.2.3.2.5.14 Placebo.** Agua municipal potable.

### 6.2.3.3 Procedimiento de Extracción de la Muestra

**6.2.3.3.1 Preparación de placebo adicionado.** Transferir una alícuota de 1mL de solución estándar de Diclofenaco de concentración conocida a un recipiente con 500mL de agua municipal, ajustar pH a 2.7 ± 0.1.

**6.2.3.3.2 Acondicionamiento del Cartucho de Separación Chromabond C18 3mL/500mg.** Pasar 1mL de metanol seguido de 1mL de agua acondicionada a pH 2.7 ± 0.1. Repetir el procedimiento 3 veces a cada cartucho.

**6.2.3.3.3 Extracción de la muestra.** Transferir el total del placebo adicionado al cartucho de separación. Aplicar vacío para obtener un flujo aproximado de 10mL/min. Lavar posteriormente con 5mL de solución de lavado anteriormente descrita.

**6.2.3.3.4 Elución y reconstitución de la muestra.** Transferir 2mL de acetonitrilo al cartucho y colectar en un vial de 4mL, concentrar a sequedad con flujo de nitrógeno y adicionar 1mL de la solución reconstituyente pH 12±0.1.

### 6.2.4 Condiciones cromatográficas.

Columna:	Thermo C18 250mm X 4.6mm, 5µm
Detector:	UV/Vis
Fase móvil:	Solución amortiguadora de fosfatos 0.025M pH 4.7 ± 0.1: Acetonitrilo (30:70), ajustar a pH 6 ± 0.1 con NaOH 1N
Flujo:	1mL/min
Temperatura auto inyector:	25°C
Temperatura horno para columna:	25°C
Longitud de onda:	280nm
Volumen de inyección:	100 µL
Tiempo de retención:	3.6 ± 0.1 min

## 6.2.5 Plan de prueba para validación.

### 6.2.5.1 Eficiencia de la columna.

**Procedimiento.** Utilizar una mezcla metanol/agua (60/40) como fase móvil e inyectar metilparabeno y propilparabeno como estándar.

**Información de reporte y cálculos.** Reportar las siguientes respuestas analíticas obtenidas:

- Eficiencia de la columna expresada como número de platos teóricos (N).
- Resolución

### 6.2.5.2 Aptitud del Sistema.

**Propósito.** Verificar las características de repetitividad que permiten determinar si el sistema cromatográfico es adecuado para la ejecución del método analítico.

**Procedimiento.** Verificar la aptitud del sistema inyectando por sextuplicado una solución estándar de concentración conocida. Esto debe realizarse cada vez que se inicie una corrida analítica.

**Información de reporte y cálculos.** Reportar las siguientes respuestas analíticas de Diclofenaco obtenidas:

- Tiempo de retención ( $t_r$ )
- Área bajo la curva del pico correspondiente al Diclofenaco
- CV de las respectivas áreas reportadas de Diclofenaco

#### **Criterios de Aceptación**

- Tiempo de retención de Diclofenaco
- $CV \leq 2.0 \%$

### 6.2.5.3 Linealidad del sistema.

**Propósito.** Verificar la habilidad del sistema cromatográfico (analista, reactivos, sistema de separación y sistema de detección) en términos de la variabilidad en la respuesta analítica (área bajo la curva, tiempo de retención).

**Procedimiento.** Preparar al menos tres curvas de calibración con al menos seis puntos de concentración de Diclofenaco desde 80ng/mL a 4000ng/mL. Transferir cada una de las soluciones de referencia a viales de 1.5mL para su inyección. Inyectar por duplicado cada punto y registrar al área bajo la curva.

**Información de reporte y cálculos.** Obtener un promedio de las áreas registradas por cada punto de la curva. Trazar una gráfica de concentración (x) vs área (y), incluir en ella la ecuación y la línea de ajuste. Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente IC( $b_1$ ).

**Criterios de aceptación.**

- $r^2 \geq 0.98$ .
- IC ( $b_1$ ) no debe incluir el valor cero.

#### **6.2.5.4 Precisión del Sistema.**

**Propósito.** Verificar la habilidad del sistema cromatográfico (analista, reactivos, sistema de separación y sistema de detección) en términos de la variabilidad en la respuesta analítica (área bajo la curva, tiempo de retención) como función de la concentración de la sustancia de referencia para determinar si el sistema es adecuado para la ejecución del método analítico.

**Procedimiento.** Preparar por sextuplicado, soluciones de concentración consideradas como alta, media y baja. En este caso se considerarán 4000ng/mL, 1000ng/mL y 80ng/mL.

**Información de reporte y cálculos.** Calcular Desviación Estándar (S) y Coeficiente de Variación (CV) de la respuesta analítica.

**Criterios de aceptación.**

- $CV \leq 2\%$ .

#### **6.2.5.5 Linealidad del Método y porcentaje de recobro.**

**Propósito.** Verificar la capacidad del método analítico para asegurar que la respuesta es directamente proporcional a la concentración de Diclofenaco adicionada al placebo.

**Procedimiento.** Las soluciones de cada nivel se preparan por sextuplicado y por diluciones independientes. La preparación del placebo adicionado debe ser de concentraciones alta, media y bajo (4000ng/mL, 1000ng/mL y 80ng/mL). Obtener los cromatogramas de cada inyección y registrar las áreas del pico principal, calcular la cantidad recuperada en ng/mL

**Información de reporte y cálculos.** Trazar una gráfica de cantidad adicionada (x) vs. cantidad recuperada (y). Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza para la pendiente IC( $b_1$ ), el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC( $b_0$ ) y el coeficiente de variación de regresión ( $CV_{Y/X}$ ). Calcular el promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.

**Criterios de aceptación.**

- $r^2 \geq 0,98$
- IC ( $b_1$ ) debe incluir la unidad

- IC ( $b_0$ ) debe incluir el cero
- $CV_{Y/X} \leq 2,0\%$  del porcentaje de recobro
- $CV \leq 2,0 \%$

#### **6.2.5.6 Precisión y Exactitud del Método.**

**Propósito.** Verificar la concordancia entre el valor experimental (cantidad recuperada) con su verdadero valor (cantidad adicionada).

**Procedimiento.** Preparar extracciones de muestras de concentración alta, media y baja (4000ng/mL, 1000ng/mL y 80ng/mL). La extracción de las muestras se realizará por sextuplicado y por pesadas independientes.

#### **Información de reporte y cálculos.**

Calcular el porcentaje de recobro. Calcular el promedio aritmético del % de recobro ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) del contenido.

#### **Criterios de aceptación.**

- $CV \leq 2,0 \%$ .

#### **6.2.5.7 Estabilidad analítica de la muestra.**

**Propósito.** Verificar la reproducibilidad de los resultados de prueba bajo las condiciones normales de operación, analizando las soluciones de la muestra en diferentes intervalos de tiempo, la información generada en este tipo de estudios permite establecer el tiempo máximo de análisis de una muestra procesada en una etapa específica del método analítico.

**Procedimiento.** Preparar una muestra de concentración 4000ng/mL y fraccionarla en 9 viales. Determinar al inicio la valoración de la preparación de prueba. Considerar este como el tiempo cero. Acondicionar 4 de los viales a temperatura ambiente y los otros cuatro dentro del refrigerador. Utilizar cada día soluciones de referencia recientemente preparadas. Proseguir con el análisis de cada fracción de la solución muestra, utilizar un vial por acondicionamiento por día.

**Información del reporte y cálculos.** Obtener el análisis inicial ( $\hat{y}_0$ ) y el análisis de cada condición de almacenaje ( $\hat{y}_1$ ). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de Diclofenaco respecto al análisis inicial  $|d_i|$ . Con la siguiente fórmula:

$$|d_i| = |\hat{y}_1 - \hat{y}_0|$$

Donde:

$|d_i|$  = Diferencia absoluta

$\hat{y}_0$  = Condición inicial %

$\hat{y}_1$  = Condición de almacenaje %

### **Criterio de aceptación.**

$$|d_i| \leq 2.0 \%$$

#### **6.2.5.8 Límite de Cuantificación.**

**Propósito.** Determinar la mínima cantidad de Diclofenaco en la muestra que puede ser cuantificado con una precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones de operación establecidas la habilidad del sistema cromatográfico (analista, reactivos, sistema de separación y sistema de detección) en términos de la variabilidad en la respuesta analítica (área bajo la curva, tiempo de retención) como función de la concentración de la sustancia de referencia para determinar si el sistema es adecuado para la ejecución del método analítico.

**Procedimiento.** Preparar de 3 a 5 niveles de concentración, por triplicado, soluciones de 4000ng/mL, 1000ng/mL y 80ng/mL de la concentración del analito, partiendo de la solución stock de Diclofenaco utilizada para la linealidad del sistema.

**Información de reporte y cálculos.** Calcular el valor de la pendiente, ordenada al origen, desviación estándar de regresión, coeficiente de correlación, coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la pendiente. Calcular el Límite de Cuantificación (LC) con la siguiente ecuación:

$$LC = 10\sigma / m$$

Donde:

$\sigma$  es la desviación estándar de regresión.  
 $m$ , es la pendiente de la línea de calibración.

### **Criterios de aceptación.**

- $r^2 \geq 0.98$
- IC para la pendiente no debe incluir el 0

#### **6.2.5.9 Robustez.**

**Propósito.** Evaluar la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones significativas, en las características normales de operación del método.

**Procedimiento.** Realizar la valoración por triplicado de una muestra homogénea. Determinar la valoración de cada una de las muestras utilizando soluciones de referencia recientemente preparadas, realizar la corrida cromatográfica bajo las siguientes condiciones:

CONCENTRACIÓN (ug/mL)	pH	
	pH 1	pH 2
4	ROB pH1 M1	ROB pH2 M1
4	ROB pH1 M2	ROB pH2 M2
4	ROB pH1 M3	ROB pH2 M3

- pH 1: pH normal de trabajo de la fase móvil (pH=6)
- pH 2: pH de prueba de la fase móvil (pH=6.5)

**Información del reporte y cálculos.** Reportar el contenido de Diclofenaco en las muestras, calcular la media aritmética de la condición normal de operación ( $\hat{y}_0$ ), y de la condición de operación modificada ( $\hat{y}_i$ ). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de operación modificada con respecto a la condición normal mediante la siguiente fórmula:

$$|d_i| = |\hat{y}_i - \hat{y}_0|$$

Donde:

$|d_i|$  = Diferencia absoluta

$\hat{y}_0$  = Media aritmética de la condición normal (%)

$\hat{y}_i$  = Media aritmética de la condición modificada (%).

**Criterio de aceptación.**

$$|d_i| \leq 2,0\%$$

#### **6.2.5.10 Tolerancia.**

**Propósito.** Establecer el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones externas al método como: diferentes equipos, lotes de reactivos o columnas.

**Procedimiento.** Realizar la valoración por triplicado de una muestra homogénea de producto terminado escogiendo una presentación. Determinar la valoración de cada una de las muestras utilizando soluciones de referencia recientemente preparadas, realizar la corrida cromatográfica bajo las siguientes condiciones.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	EQUIPO		
	COLUMNA 1	COLUMNA 2	COLUMNA 3
4	TOL M1	TOL M1	TOL M1
4	TOL M2	TOL M2	TOL M2
4	TOL M3	TOL M3	TOL M3

- Columna 1: Columna normal de trabajo (Thermo C18 250mm X 4.6mm, 5µm)
- Columna 2 : Columna de prueba (Agilent C18 250mm X 4.6mm, 5 µm)
- Columna 3 : Columna de prueba (Waters C18 250mm X 4.6mm, 5 µm)

**Información del reporte y cálculos.** Reportar el contenido de Diclofenaco en las muestras, calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) de los datos obtenidos.

**Criterio de aceptación.**

- CV total  $\leq$  2,0 %.

## 6.2.6 RESULTADOS

### 6.2.6.1 Eficiencia de la columna.

- **Eficiencia de la Columna.** Se reportó una eficiencia de la columna de 1968.32 platos teóricos.
- **Resolución.** Se reportó una resolución de la columna de 2.5

### 6.2.6.2 Aptitud del Sistema.

CONCENTRACIÓN µg/mL	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA
4	3.588	912.06
	3.577	904.11
	3.579	905.45
	3.587	904.43
	3.585	904.02
	3.586	904.5
Promedio	3.583	905.761667
DesvEst		3.12706518
CV		0.3452415

### Cromatograma de diclofenaco.

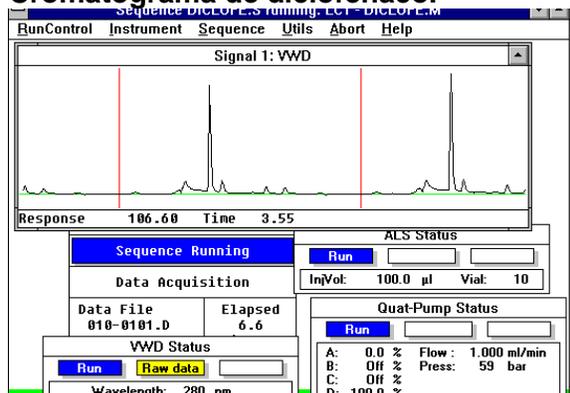


Tabla 1. Relación de tiempo y área para Aptitud del Sistema

El coeficiente de variación en la aptitud del sistema es menor al 2% y el tiempo de retención se observa alrededor de los 3.58 minutos.

#### 6.2.6.3 Linealidad del Sistema.

El valor  $R^2$  es mayor a 0.98. El intervalo de confianza para la pendiente se calculó con la ayuda de la herramienta "Excel" y no incluye el valor cero.

CONCENTRACIÓN µg/mL	ÁREA
0.08	21.198
0.2	50.017
0.4	102.995
1	243.358
2	488.848
4	978.540
Pendiente:	3.3906
Intercepto	0.8467
IC para la pendiente	242 ≤ IC ≤ 245

Tabla 2. Relación concentración/área para Linealidad del Sistema

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

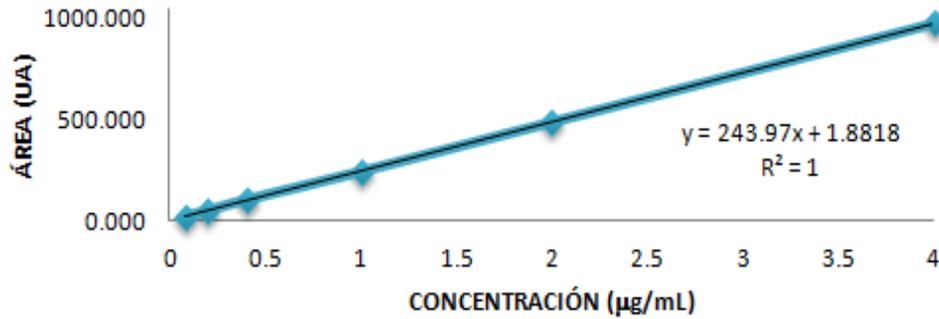


Fig. 1. Linealidad del Sistema.

#### 6.2.6.4 Presición del Sistema.

Muestra	Concentración recuperada $\mu\text{g/mL}$		
1	0.083486494	1.008538755	3.751437472
2	0.08180596	0.996775013	3.780129524
3	0.08451121	1.024708776	3.767791942
4	0.082072386	0.982121572	3.772157232
5	0.079797516	1.005136697	3.743649629
6	0.082974136	0.989868426	3.717150469
<b>Promedio</b>	0.082	1.001	3.755
<b>D.E.</b>	0.002	0.015	0.023
<b>C.V. (%)</b>	1.97	1.50	0.61
<b>Concentración adicionada <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	0.08	1.00	4.00
<b>Desv.abs. (%)</b>	3.05	0.12	6.12

Tabla 3. Precisión del Sistema.

Se realizaron 6 muestras de tres concentraciones diferentes. Los Coeficientes de Variación son menores al 2%, por lo tanto aprueban este parámetro.

### 6.2.6.5 Linealidad del método y porcentaje de recobro.

Concentración Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relación de Áreas	Concentración Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Desviación	Promedio
0.08	18.595	0.0685	14.369	0.074
	20.97	0.0782	2.200	
	19.225	0.0711	11.141	
	19.79	0.0734	8.246	
	19.785	0.0734	8.272	
	20.61	0.0768	4.045	
1.00	228.295	0.9280	7.196	0.908
	214.54	0.8717	12.834	
	217.465	0.8836	11.635	
	228.37	0.9283	7.166	
	226.145	0.9192	8.078	
	225.8	0.9178	8.219	
4.00	830.62	3.3969	15.078	3.4098
	868.17	3.5508	11.230	
	824.42	3.3715	15.713	
	825	3.3739	15.654	
	818.72	3.3481	16.297	
	835.63	3.4174	14.564	

Tabla 4. Relación de concentraciones para Linealidad del Método.

Se realizaron seis extracciones de tres concentraciones diferentes, el promedio de cada concentración recuperada se graficó contra la adicionada para obtener la linealidad del método.

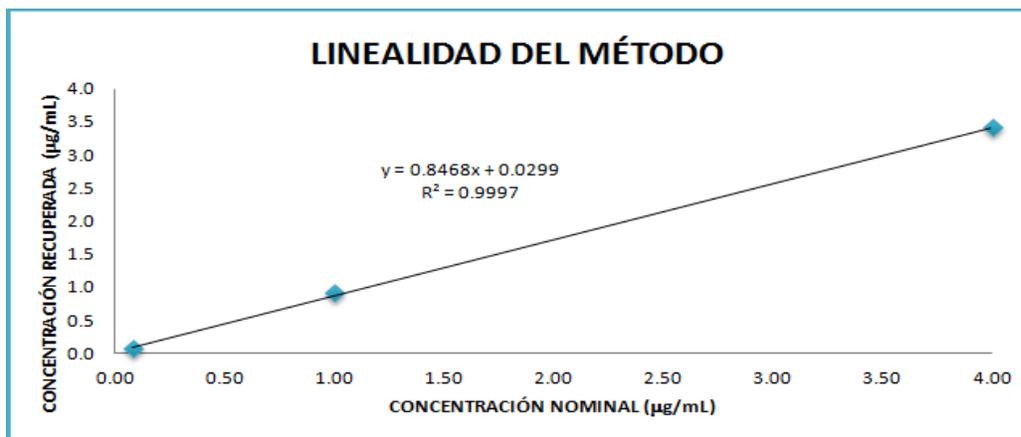


Fig. 2. Linealidad del Método.

El valor  $R^2$  es mayor a 0.98. Los intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto fueron calculados con la ayuda de "Excel". El IC para el intercepto incluye el cero mientras que el IC para la pendiente no incluye la unidad pero es muy cercano.

Pendiente:	0.846814866
Intercepto:	0.029873471
R <sup>2</sup> :	0.9997
IC para la pendiente:	0.83 < IC < 0.86
IC para el intercepto:	-0.0054 < IC < 0.065

Tabla 5. Parámetros para evaluar Linealidad del Método.

Control	Área del plasma	Área del sistema	Recobro	Desviación (%)
<b>Bajo 0.08 µg/mL</b>	18.595	22.25		
	20.97	21.84		
	19.225	22.5		
	19.79	21.905		
	19.785	21.35		
	20.61	22.125		
<b>Promedio</b>	<b>19.8292</b>	<b>21.9950</b>	<b>90.15</b>	<b>0.47</b>
<b>Medio 1 µg/mL</b>	228.295	247.935		
	214.54	245.065		
	217.465	251.88		
	228.37	241.49		
	226.145	247.105		
	225.8	243.38		
<b>Promedio</b>	<b>223.4358</b>	<b>246.1425</b>	<b>90.77</b>	<b>0.21</b>
<b>Alto 4 µg/mL</b>	830.62	917.12		
	868.17	924.12		
	824.42	921.11		
	825	922.175		
	818.72	915.22		
835.63	908.755			
<b>Promedio</b>	<b>833.7600</b>	<b>918.0833</b>	<b>90.82</b>	<b>0.26</b>
	<b>Recobro Promedio Global</b>		<b>90.58</b>	

Tabla 6. Porcentaje de Recobro.

### 6.2.6.6 Precisión del Método.

Muestra	Concentración recuperada $\mu\text{g/mL}$		
1	0.0685	0.9280	3.3969
2	0.0782	0.8717	3.5508
3	0.0711	0.8836	3.3715
4	0.0734	0.9283	3.3739
5	0.0734	0.9192	3.3481
6	0.0768	0.9178	3.4174
<b>Promedio</b>	0.0736	0.9081	3.4098
<b>D.E.</b>	0.0036	0.0243	0.0730
<b>C.V. (%)</b>	4.8593	2.6754	2.1420
<b>Concentración adicionada ng/mL)</b>	0.08	1.00	4.00
<b>Desv.abs. (%)</b>	8.05	9.19	14.76

Tabla 7. Precisión del Sistema.

### 6.2.6.7 Estabilidad analítica de la muestra.

La diferencia absoluta reportada según la prueba de estabilidad analítica no rebasa el 2% por lo que la muestra se considera estable para el estudio comprendido en 5 días.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA (SOLUCIÓN PREPARADA $4\mu\text{g/mL}$ )					
	TIEMPO CERO	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4
ESTÁNDAR PREPARADO	922.175	932.12	926.21	930.51	919.34
ESTÁNDAR FRÍO	*****	924.31	925.18	921.11	929.21
ESTÁNDAR TEMP. AMB.	*****	916.66	918.495	920.02	923.255

Tabla 8. Relación de áreas para Estabilidad de la muestra.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA (SOLUCIÓN PREPARADA 4µg/mL) %					
	TIEMPO CERO	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4
ESTÁNDAR PREPARADO	100	101.0784287	100.4375525	100.903841	99.6925746
ESTÁNDAR FRÍO	*****	100.2315179	100.3258601	99.8845122	100.76287
ESTÁNDAR TEMP. AMB.	*****	99.40195733	99.60094342	99.7663133	100.117114

Tabla 9. Relación de áreas en porcentaje para Estabilidad de la muestra.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA (SOLUCIÓN PREPARADA 4µg/mL)  dij					
	TIEMPO CERO	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4
ESTÁNDAR PREPARADO	100	1.078428715	0.437552525	0.90384146	0.30742538
ESTÁNDAR FRÍO	*****	0.231517879	0.325860059	0.11548784	0.76287039
ESTÁNDAR TEMP. AMB.	*****	0.598042671	0.399056578	0.23368666	0.11711443

Tabla 10. Diferencia absoluta de porcentaje para Estabilidad de la muestra.

#### 6.2.6.8 Límite de Cuantificación.

Partiendo de la fórmula establecida para obtener el límite de cuantificación del método analítico para determinación de Diclofenaco, éste se obtuvo en la cantidad de 0.04 µg/mL

$S_{y/x}$ :	3.3906
Pendiente:	846.7107
LC:	0.0400

Tabla 11. Límite de cuantificación

#### 6.2.6.9 Robustez.

La relación de áreas reportadas al cambiar el pH de la fase móvil no se vieron significativamente afectadas pero el tiempo de retención del pico si observó un comportamiento distinto.

Tabla 12. Relación de áreas para Robustez

Control	RELACIÓN DE ÁREAS(UA)	
	FASE MÓVIL pH=6	FASE MÓVIL pH=6.5
1	260.780	267.570
2	261.580	267.750
3	261.850	267.720
<b>Promedio</b>	<b>261.40</b>	<b>267.68</b>
<b>%</b>	<b>100.00</b>	<b>102.40</b>
<b> d </b>	<b>0.00</b>	<b>2.40</b>

Tabla 12. Relación de tiempo de retención para Robustez

Control	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	
	FASE MÓVIL pH=6	FASE MÓVIL pH=6.5
1	3.602	3.210
2	3.601	3.210
3	3.601	3.200
<b>Promedio</b>	<b>3.60</b>	<b>3.21</b>
<b>%</b>	<b>100.00</b>	<b>89.04</b>
<b> d </b>	<b>0.00</b>	<b>10.96</b>

#### 6.2.6.10 Tolerancia.

La relación de áreas se vio afectada en las dos columnas de prueba además de que en ambas presentaron el pico más ancho y más pequeño.

Control	RELACIÓN DE ÁREAS(UA)		
	COLUMNA THERMO C18	COLUMNA AGILENT C18	COLUMNA WATERS C18
1	260.780	207.970	200.240
2	261.580	207.610	200.770
3	261.850	204.480	200.730
<b>Promedio</b>	<b>261.40</b>	<b>206.69</b>	<b>200.58</b>
<b>%</b>	<b>100.00</b>	<b>79.07</b>	<b>76.73</b>
<b> d </b>	<b>0.00</b>	<b>20.93</b>	<b>23.27</b>

Tabla 13. Relación de áreas para Tolerancia.

## 7.2 DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como resultado del análisis de la linealidad del método, dicho parámetro cumplió con los criterios de aceptación establecidos y hubo una relación lineal entre las concentraciones del Diclofenaco y las áreas obtenidas para cada una.

Como se observa en las Tablas 4 y 6 se obtuvieron valores de desviación estándar relativa y porcentaje de recobro dentro de los límites establecidos considerados como aprobados y hubo

una relación lineal entre los valores de referencia por lo que se considera que el método es exacto.

En el parámetro de repetitividad, fueron necesarias al menos 6 determinaciones de cada concentración para asegurar que el método es preciso, con valores de coeficientes de variación menores al 2%. Según los resultados obtenidos en el reproducibilidad se puede concluir que el método es aceptable.

Se logró obtener un buen límite de detección para determinar concentraciones relativamente bajas de Diclofenaco.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método analítico desarrollado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución permite cuantificar Diclofenaco de forma eficiente en muestras de agua potable, pues se obtienen picos finos, bien definidos y con buena resolución entre ellos.

## 8.2 BIBLIOGRAFÍA.

1. Colborn T, 2002. Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects of wildlife. *Env. Health Perspective* 103: 81-86.
2. Damstra T, Barlow S, Kavlock R y Van Der Kraak G, 2005. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, An assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme, International Programme on Chemical Safety.
3. Daughton C. y Ternes A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107: 907-937.
4. Dodds E y Lawson W, 1938. Molecular structure in relation to estrogenic activity compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc., Royal Society London B*, 125: 222-232.
5. EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. December 2007.
6. Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) *Aquatic Toxicol.* 76, 122.
7. Guía de Validación de Métodos Analíticos; editado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; A.C.; registro ante la DGP F-032; edición 2002.
8. Hoeger B, Kollner B, Dietrich D y Hitzfeld B, 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat Toxicol* 75:53-64.
9. Janssens I, Tanghe T, Verstraete W, 1997. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Sci. Technol.* 35: 12.
10. Knepper T, Sacher F, Lange F, Brauch H, Karrenbrock F, Roeden O, Linder K, 1999. Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management* 19 (2): 77-99.
11. Krishnan A, Starhis P, Permuth S, Tokes L y Feldman D.,1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flask during autoclaving. *Endocrine* 132: 2279-2286.
11. McKinney J y Waller C, 1994. Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. *Env. Health Perspective* 102: 290-297.
12. Petrovic M, Gonzalez S, Barcelo D (2003) *TRAC-Trends Anal. Chem.* 22, 685
13. NOM 059-SSA1-2006 Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica Dedicadas a la Fabricación de Medicamentos
14. Sohoni P y Sumpter J, 1998. Several environmental estrogens are also endrogens. *J. Endocrinol.* 158: 327-339.
15. Witte W, 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279: 966-997.

## 6.3. AMOXICILINA

### 6.3.1 Antibiótico

El término antibiótico fue utilizado por primera vez por Selman Waksman en 1942 así entonces en términos estrictos o históricos, un antibiótico es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos.

Pero en la actualidad la definición de un antibiótico está siendo usada para incluir a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos antimicrobianos y otros agentes derivados de productos naturales y aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente. El objetivo del tratamiento con antibióticos es conseguir una concentración de este, en el foco de la infección, por lo tanto la automedicación con antibióticos es peligrosa y a veces contraproducente ya que un antibiótico bactericida y uno bacteriostático se contrarrestan mutuamente en su eficacia pero no en su toxicidad. Por otra parte en mayor consumo pueden resultar inefectivos.

#### 6.3.1.2 Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de una aminó penicilina que actúa contra un gran espectro de microorganismos, tanto gram positivos como gram negativos, es absorbida rápidamente en el intestino delgado (disponibilidad de 80% aprox.) y es eliminada en la orina sin ser metabolizada. Este antibiótico es más estable a pH ácido (3.5-6.0) tiene un pKa1 2.8, pKa2 7.2, soluble en agua, metanol y etanol, e insoluble en hexano, benceno y acetonitrilo.

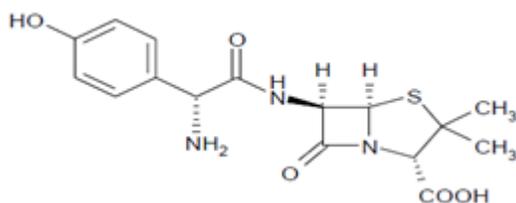


FIGURA 1. Estructura molecular de la amoxicilina

## METODOLOGÍA

### 6.3.1 Búsqueda bibliográfica

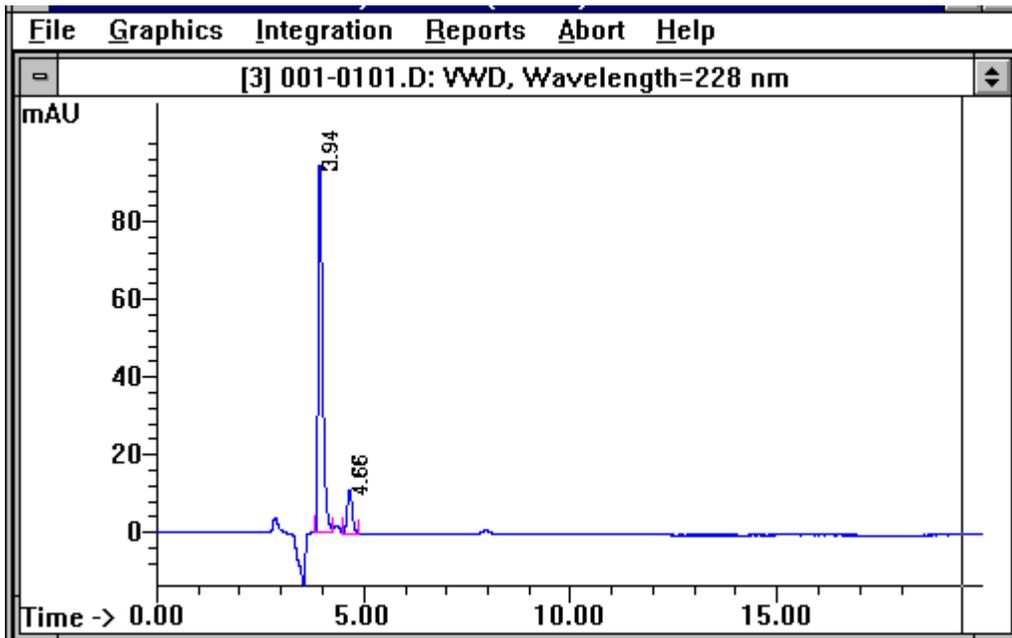
Se revisaron artículos relacionados con la investigación de los cuales, se tomaron las condiciones cromatográficas, tiempos de retención y áreas aproximadas a las cuales habían

obtenido, los picos de la amoxicilina, además de las soluciones (fase móvil, buffer) y las condiciones de estas (pH, Molaridad, relación v/v)

### 6.3.2 Selección del método por HPLC para la determinación de amoxicilina

Se realizaron pruebas con estándares (STD) de amoxicilina, trabajando con las diferentes soluciones (fase móvil, buffer) y condiciones de estas que mencionaban los artículos, con la finalidad de obtener la que diera una mayor estabilidad a la molécula, durante las pruebas se probaron diferentes tipos de columnas cromatográficas con el fin de ajustar los tiempos de retención de los picos.

Cromatograma de Amoxicilina con tiempo de retención de 3.94 min.



### 6.3.3 Linealidad del sistema. Curvas de calibración a partir de estándar de amoxicilina

Estas curvas fueron preparadas para determinar la linealidad del sistema el cual solo se puede trabajar con estándares por lo tanto lo único que se está validando es el sistema (la bomba, el detector etc.). Se utilizaron 6 diferentes concentraciones de 15, 25, 50, 100, 300, 500 ng/ml, estas concentraciones fueron establecidas en estos valores debido a que son las que se han encontrado de fármacos en el agua.

#### **6.3.4 Validación del método.**

Para la validación del método se realizaron, diferentes pruebas y se analizaron estadísticamente, para demostrar cada parámetro que se menciona a continuación, los cuales se describe como se obtuvieron de una forma más detallada en el resultado Linealidad del sistema y precisión del mismo, % de recuperación.

### 6.3.5 Optimización del método de extracción ( % de recuperación)

Para esta parte se realizaron diferentes pruebas con el fin de recuperar la mayor cantidad de amoxicilina adicionada en las muestras de agua , se trabajo con diferentes soluciones buffer en distintas condiciones de pH y molaridad para optimizar el método de extracción , para la preparación de la muestra se trabajo con diferentes tipos de agua (HPLC, municipal, deionizada) modificándoles el pH, para posteriormente fortificarlas con diferentes concentraciones de amoxicilina, estas fueron pasadas por extracción en fase sólida y eluidas con distintos solventes (metanol, acetonitrilo, metanol/acido fórmico) para después concentrarlas por evaporación con N<sub>2</sub> , para de esta forma obtener el solvente que arrastrara la muestra en mayor cantidad.

### 6.3.6 RESULTADOS

**TABLA 1.** Condiciones cromatográficas

COLUMNA	THERMO de 250 x 4.6mm y 5µm de espesor
DETECTOR	UV/Vis
FASE MOVIL	Solución de acetatos pH 4.6 ± 0.1 Metanol (96:4) V/V
FLUJO	1 ml/minuto
LONGITUD DE ONDA	228 nm
VOLUMEN DE INYECCION	100 µL
TIEMPO DE RETENCION	8.39 ± 1.0 min

#### 6.3.6.1 Selección del método HPLC

El método fue seleccionado debido a que las concentraciones a analizar fueron muy bajas, las condiciones cromatográficas se determinaron por una serie de pruebas utilizando diferentes columnas ( Agilent, Thermo) de las cuales la columna Thermo de 250 x 4.5mm y 5µm de espesor fue la que dio una mejor respuesta a la señal de la amoxicilina, el flujo (1ml/min) y la longitud de onda 228nm) se tomaron de los artículos.

##### 6.3.6.1.2 Preparación de soluciones para fase móvil

###### Solución "A" acido acético glacial 0.020 M.

Se colocaron 1.15ml de acido acético glacial en 500 ml de agua grado HPLC, se homogenizo y se aforo a 1000ml con agua HPLC.

#### Solución "B" acetato de sodio 0.020 M.

Se pesaron 2.72grs de acetato de sodio anhidro (PM:82.03 ) y se disolvieron en 500ml de agua HPLC, posteriormente se aforo a 1000ml.

#### Buffer de acetatos pH 4.6

De la solución "A" se tomaron 255ml y se disolvieron con 245ml de la solución "B" estas se llevaron a 1000ml con agua HPLC, estas cantidades adicionadas de ambas soluciones daban el PH deseado.

#### Fase móvil

Del buffer de acetatos PH 4.6 se tomaron 500 ml y se mezclaron con 20ml de metanol grado HPLC, posteriormente esta solución se filtro por membrana de 0.45µm y se desgasifico por 15 min.

### **6.3.6.2.1 Preparación de soluciones de trabajo**

#### Solución "stock"

Se pesaron 11.5 mg del estándar de referencia de amoxicilina, se disolvió con 25 ml de dimetilsulfoxido y se aforo a 100 ml con acetonitrilo grado HPLC

#### Solución fosfato de sodio 0.02 M pH 6 ± 0.1

Se pesaron 2.83 gramos de Fosfato de sodio dibásico anhidro y se disolvieron en 500ml de agua HPLC posteriormente se llevo a 1000ml con la misma agua, se ajusto en pH con acido fosfórico (P: 84.17%) e hidróxido de sodio al 2 N

#### Solución de fosfatos y acetatos a pH 4.6 con E.D.T.A

Se prepararon soluciones de fosfatos y de acetatos, por separado a cada una se le coloco 100mg de E.D.T.A por cada 1000ml de solución, posteriormente se les ajusto el pH, a la primera con acido fosfórico y a la segunda con acido acético e hidróxido de sodio.

### **6.3.6.3 Linealidad del sistema**

Nos sirve para determinar la proporcionalidad, entre la concentración del principio activo y su respuesta, para esta determinación se prepararon 3 curvas de calibración en diferentes días, donde se utilizaron 6 concentraciones (15, 25, 50, 100, 300, 500 ng/ml), para esto fue necesario realizar dos soluciones.

**Solución "A":** se tomo 1ml de la solución stock con una concentración de 101.12 µg/ml y se aforo a 100ml con buffer de acetatos pH 4.6.

**solución "B" :** se tomo 5ml de la solución "A" con una concentración de 1.0112 µg/ml y se aforo a 50ml con buffer de acetatos .esta solución tuvo una concentración de 0.10112 µg/ml. En la siguiente tabla se explica de que solución y en qué cantidad se tomo para lograr la concentración deseada.

**TABLA 2.** Concentración de estándares para curvas de calibración

Solución	Alícuota (ml)	Aforo buffer de Acetatos pH 4.6 (ml)	Concentración teórica (ng/ml)
B	1.5	10	15.00
B	2.5	10	25.00
B	5	10	50.00
A	1	10	100.00
A	3	10	300.00
A	5	10	500.00

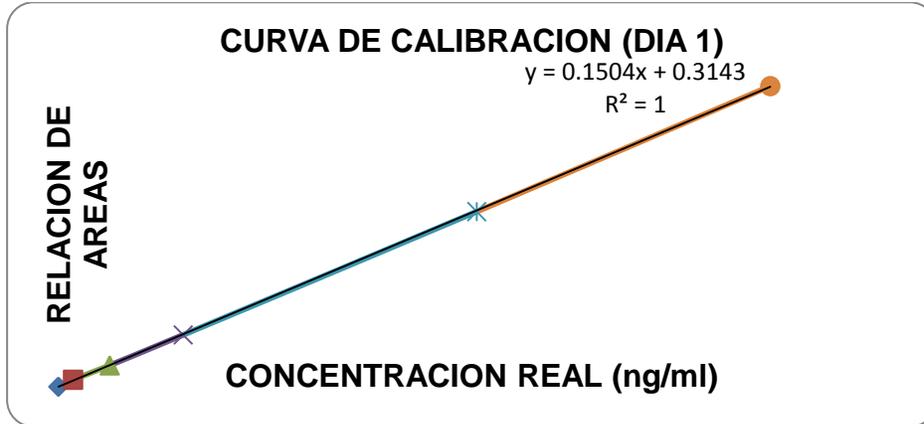
Posteriormente cada concentración se colocó en viales ámbar de 1.5ml y se colocaron en cromatógrafo de la siguiente forma adecuabilidad (100 ng/ml), fase móvil de acetatos, buffer de acetatos pH 4.6, concentración de 15, 25, 50, 100, 300 y 500 ng/ml y se inyectaron por duplicado, con los datos obtenidos de las inyecciones se obtuvo el promedio de cada concentración.

Para poder calcular la linealidad es necesario trazar graficas de concentración (x) vs área (y), e incluir en ella la ecuación y la línea de ajuste, calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ) el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente IC ( $b^1$ ). Con la finalidad de determinar si cada curva cumple con los criterios de aceptación (TABLA 6)

**TABLA 3.** Resultados de la curva de calibración (día 1)

Concentración teórica (ng/ml)	Concentración real (ng/ml)	Relación de áreas
15	15.16	2.625
25	25.28	4.345
50	50.56	7.89
100	101.12	15.375
300	303.36	45.68
500	505.60	76.53

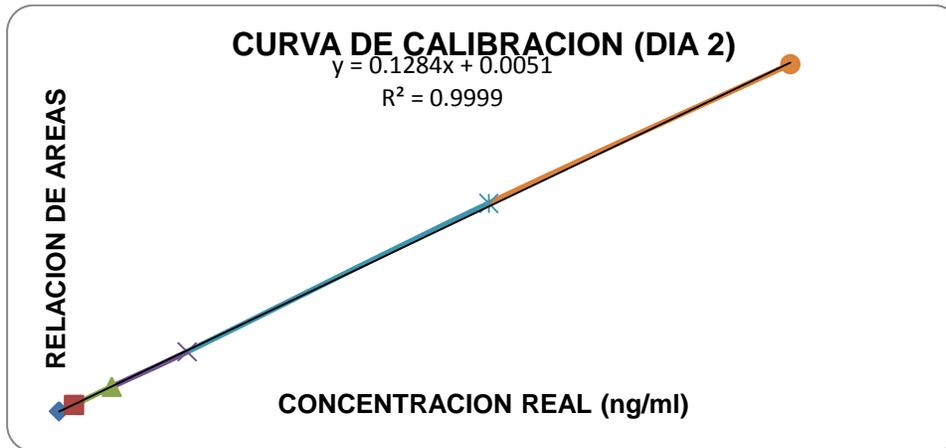
NOTA: la concentración real se obtuvo multiplicando la cantidad de alícuota tomada por la concentración de la solución a la que esta correspondía y se dividió entre los mililitros de buffer a los que se aforo el resultado de la concentración en daba en ( $\mu\text{g/ml}$ ) por lo tanto para obtenerla en (ng/ml) el resultado se multiplico por 1000 ya que ( $1\mu\text{g} = 1000\text{ng}$ )



**FIGURA 3.** Grafica de la curva de calibración (día 1)

**TABLA 4.** Resultados de la curva de calibración (día 2)

Concentración teórica (ng/ml)	Concentración real (ng/ml)	Relación de áreas
15.00	15.16	2.025
25.00	25.28	3.18
50.00	50.56	6.45
100.00	101.12	12.76
300.00	303.36	39.54
500.00	505.60	64.655



**FIGURA 4.** Grafica de la segunda curva de calibración (día 2)

Para la tercera curva se preparo una nueva solución “stock” ya que la solución utilizada en la primera y la segunda curva de calibración se comenzó a degradar, dando areas muy por debajo de las obtenidas en las anteriores curvas. Todo se realizo de la misma manera pero en esta ocasión la concentración de la solución “stock” fue de  $103.74\mu\text{g/ml}$ . La solución “A” tuvo una concentración de  $1.0374\mu\text{g/ml}$  y la “B” de  $0.10374\mu\text{g/ml}$ .

Para obtener los resultados y poder hacer coincidir la concentración real de la tercer curva con las dos anteriores, fue necesario ajustarla de la siguiente manera (TABLA 5).

$$Y = (m) (x) + b$$

Donde:

m= pendiente de la tercer curva (antes de ajustar los datos)

x=Concentración real de las primeras dos curvas

b= intercepto de la tercer curva (antes de ajustar los dato)

ejemplo:

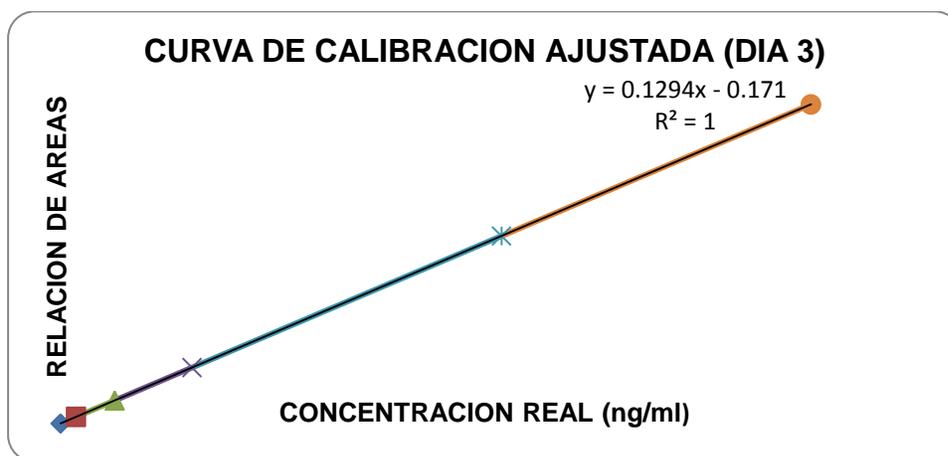
$$Y = (0.1328) (15.16) + (- 0.1669)$$

$$= 2.013 - 0.1669$$

$$Y = 1.84$$

**TABLA 5.** Resultados de la tercera curva de calibración ajustada (día 3)

Concentración teórica (ng/ml)	Concentración real (ng/ml)	Relación de áreas (datos originales)	Relación de áreas (con datos ajustados)
15.00	15.56	1.960	1.84
25.00	25.93	3.44	3.19
50.00	51.87	6.59	6.54
100.00	103.74	13.56	13.26
300.00	311.22	41.09	40.11
500.00	518.7	68.84	66.97



**FIGURA 5.** Grafica de la tercer curva de calibración ajustada (día 3)

**TABLA 6.** Resultados estadísticos de las tres curvas de calibración

Criterio	Curva 1	Curva 2	Curva 3
$b_1$	0.150397	0.12844078	0.13289086
$b_0$	0.3143	0.0051	-0.1669
$r^2$	.99996056	.99981387	.99998128
IC( $b_1$ )	0.149- 0.151	0.126 – 0.130	0.132- 0.133
CV	0.82%	1.61 %	0.02%

$b_1$ =Pendiente,  $b_0$ = ordenada al origen,  $r^2$ = coeficiente de determinación, IC ( $b_1$ )= intervalo de confianza al 95% para la pendiente, CV=coeficiente de variación de la regresión.

**TABLA 7.** Criterios de aceptación para cada curva

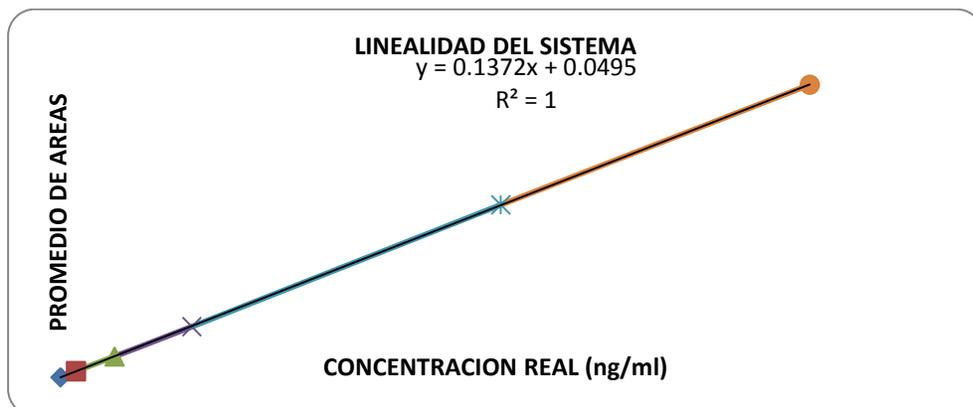
critorio	
$r^2$	$\geq 0,98.$
CV de la regresión	NO < 2%
IC ( $b_1$ )	No debe incluir el valor cero

Por lo tanto las tres curvas de calibración cumplen con los criterios establecidos

Posteriormente de obtener los resultados de las tres curvas de calibración y viendo que estas cumplían con los criterios de aceptación, las áreas de las tres fueron promediadas, graficadas y de igual forma se determinaron los criterios de aceptación por medio de las herramientas estadísticas de Excel.

**TABLA 8.** Promedio de áreas de las tres curvas de calibración

Concentración real (ng/ml)	Área curva 1	Área curva 2	Área curva 3	Promedio de áreas
15.16	2.625	2.025	1.84	2.16
25.28	4.345	3.18	3.19	3.57
50.56	7.89	6.45	6.54	6.96
101.12	15.375	12.76	13.26	13.80
303.36	45.68	39.54	40.11	41.78
505.60	76.53	64.655	66.97	69.39



**FIGURA 6.** Grafica de la linealidad del sistema intervalo de concentraciones 15.16 – 505.60 ng/mL.

**TABLA 9.** Resultados estadísticos de la linealidad del sistema

Criterio	
$b_1$	0.137209751
$b_0$	0.0495
$r^2$	1
IC( $b_1$ )	0.136 – 0.137
CV	0.82%

$b_1$ =Pendiente,  $b_0$ = ordenada al origen,  $r^2$ = coeficiente de determinación, IC ( $b_1$ )= intervalo de confianza al 95% para la pendiente, CV=coeficiente de variación de la regresión.

**TABLA 10.** Criterios de aceptación para la linealidad del sistema

criterio	
$r^2$	$\geq 0,98.$
CV de la regresión	NO < 2%
IC ( $b_1$ )	No debe incluir el valor cero

#### 6.3.6.4 Limite de detección y cuantificación

Se prepararon 4 estándar en tres ocasiones de diferente concentración ( 5, 10, 15 y 50 ng/ml) a partir de la solución “stock”, estos fueron inyectados en el cromatógrafo 3 veces cada uno, obteniendo como resultado que la concentración de 10ng/ml se puede detectar, pero debido a que su área es muy pequeña no se pudo integrar, por lo tanto no es cuantificable, sin embargo la concentración de 15ng/ml si es cuantificable dando una área de 1.90,1.84 y 1.99

#### 6.3.6.5 Precisión del sistema

Su finalidad es verificar la habilidad del sistema cromatográfico (analista, reactivos, sistema de separación y sistema de detección) en términos de la variabilidad en la respuesta analítica (área bajo la curva, tiempo de retención,.) como función de la concentración de la sustancia de referencia para determinar si el sistema es adecuado para la ejecución del método analítico. Se prepararon 6 estándares de cada concentración (15, 50,500ng/ml)

De la solución “stock” (103.74µg/ml) se tomo 1 ml y se llevo a 100 ml con buffer de acetatos pH 4.6 esta fue la solución “A”(1.0347µg/ml), de esta solución se tomo 5 ml y se llevo a 50 ml con buffer de acetatos pH 4.6 (0.10374µg/ml), posteriormente se tomo la alícuota correspondiente de cada solución por seis ocasiones para cada estándar, se coloco en viales ámbar de 1.5ml cada estándar y se inyecto al cromatógrafo por duplicado, para determinar la respuesta.

En los resultados se reporta la señal analítica y se calcula el coeficiente de variación (CV), donde (CV) no debe exceder el 1.5%

**TABLA 11.** Datos de la precisión del sistema

Concentración real (ng/ml)	Área 1	Área 2	Relación de áreas
15.56	1.19	1.35	1.27
15.56	1.27	1.25	1.89
15.56	1.46	1.28	1.37
15.56	1.48	1.59	1.53
15.56	1.45	1.45	1.45
15.56	1.04	1.04	1.04
51.87	4.92	4.50	4.71
51.87	4.33	4.49	4.41
51.87	4.25	4.42	4.33
51.87	4.49	4.40	4.44
51.87	4.09	4.15	4.12
51.87	4.71	4.75	4.73
505.60	50.09	49.89	49.99
505.60	47.85	48.99	48.42
505.60	47.36	48.68	48.02
505.60	46.99	45.07	46.03
505.60	46.63	46.63	46.63
505.60	41.49	40.69	41.09

**TABLA 12.** Resultado del coeficiente de variación para la linealidad del método

Concentración	CV
15.56	13.59-19.93
51.87	4.35-6.88
505.60	6.09-6.88

### 6.3.6.6 Optimización del método de extracción

Después de revisar los artículos seleccionados donde manejaban la técnica de extracción en fase sólida, se realizaron las pruebas con las diferentes soluciones que hay mencionaban.

#### Prueba de ensayo 1

Para esta prueba se utilizó cartuchos HLB y se acondicionaron ml de buffer de fosfatos pH 3 y 1 ml de metanol, el estándar para la muestra fue en buffer de fosfatos pH  $6 \pm 0.1$  y el agua utilizada fue municipal (llave), se utilizó fase móvil de fosfatos a pH  $3 \pm 0.1$ , posteriormente de pasar la muestra por el cartucho de separación fue eluida con 1 ml de buffer de fosfatos pH 3 y se inyectaba al cromatógrafo, pero esta prueba se descartó ya solamente era reproducible en volumen de 1 ml, ya que aumentándose el volúmenes de muestra la amoxicilina se degradaba.

#### Prueba de ensayo 2

En esta prueba se cambió el tipo de cartucho ahora se utilizó CHROMABOND C6, utilizando buffer de fosfatos a diferente pH (3, 4.5, 6.0) para acondicionarlos, los estándares para las muestras fueron preparados a los pH antes mencionados, después de pasar la muestra esta fue eluida con 1 ml de metanol y evaporada a sequedad con nitrógeno, posteriormente fue reconstituida con 1 ml de buffer de fosfatos a los diferentes pH, obteniendo que la muestra que daba una mayor estabilidad era la de fosfato de sodio a pH 6, pero posteriormente se degradaba en cuestión de minutos.

#### Prueba de ensayo 3

Se utilizó buffer de acetatos (acetato de sodio/ácido acético glacial) pH  $4.6 \pm 0.1$  agregando 100mg de E.D.T.A por cada 1000ml de buffer, para acondicionar el cartucho de separación, para la muestra se utilizó un volumen de 100ml de agua municipal (llave) con E.D.T.A sal disódica 100mg por cada 1000ml, la muestra fue eluida con metanol/ácido fórmico (100ml/90 $\mu$ l) y evaporada a sequedad con nitrógeno, finalmente fue reconstituida con buffer de acetatos pH  $4.6 \pm 0.1$ , es estándar fue preparado en buffer de fosfatos pH  $6 \pm 0.1$  con una concentración de 100ng/ml.

Esta prueba fue la que nos dio el mejor porcentaje de recuperación con un volumen de muestra de 100ml (80%), ya que a mayor volumen el porcentaje de recuperación de amoxicilina disminuía a un (9%), obteniéndose su producto de degradación que es el ácido amoxicílico. El porcentaje de recuperación se obtuvo de la siguiente manera % de recuperación = área de la muestra / área del estándar (100).

#### **6.3.6.6.1 Acondicionamiento de cartuchos**

Los cartuchos de separación utilizados fueron OASIS HLB Waters 6cc, estos fueron acondicionados con 6 ml de metanol grado HPLC y 6 ml de solución de buffer de acetatos pH 4.6/E.D.T.A.

#### **6.3.6.6.2 preparación de la muestra**

Se utilizo agua municipal (llave) a la cual se le colocó 100mg de E.D.T.A sal disódica por cada 1000 ml y se le ajusto el pH a  $4.6 \pm 0.1$  con acido fosfórico e hidróxido de sodio, posteriormente se le coloco 1 ml del estándar con la concentración deseada.

#### **6.3.6.6.3 Proceso de extracción, elución y recuperación**

Posteriormente de haber acondicionado los cartuchos, se dejo pasar las muestras con un flujo de 10ml/min aprox. Con la finalidad de obtener la mayor retención del analito, al terminar de extraerla se dejo con vacío por 10 min, para que no hubiera humedad en el cartucho de separación, pasado este tiempo la muestra fue eluida con 1ml de la solución metanol/acido fórmico (100ml/90 $\mu$ l) y evaporada con nitrógeno hasta sequedad para finalmente ser reconstituida (recuperada) con 1 ml de buffer de acetatos pH  $4.6 \pm 0.1$  e inyectada al cromatógrafo.

### **Discusión de Resultados**

Se observó que la precisión del sistema está por encima del criterio de aceptación (menor a 2%), lo que implica que el fármaco es inestable y requiere un estabilizante.

### **7. 3 Conclusiones**

Se obtuvo un límite de detección de 10 ng/L y un límite de cuantificación de 15 ng/L.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de 1, lo que indica una alta correlación entre la respuesta instrumental y la concentración del analito, un coeficiente de variación de 0.82% pasando el criterio por ser menor a 2%, implicando una alta precisión del sistema.

Por otra parte se concluye que la amoxicilina es un fármaco que se degrada muy rápidamente y requiere un estabilizante, esto se comprobó con la precisión del sistema al rebasar el coeficiente de variación establecido como criterio y que es menor al 2%.

Se obtuvo un 80% de recuperación en el proceso de extracción que es aceptable para este tipo de farmacos ya que este fármaco se degrada.

### 8. 3 BIBLIOGRAFÍA

Alam G.Trovo, Ana Agüera, Amadeo R. Fernández, Alba Sixto Malato, Raquel F. Pupo Nogueira. **Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-fenton process – chemical and toxicological assessment.** Water Research, 2011;45, 1394-1402.

Arash Khoddam, Alireza Shafaati, Afshin Zarghi, Hoomam Movahed, Seyed Mohsen Foroutan. **Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.,2007; 45, 531-534.

Antonio Marzo, Lorenzo Dal Bo, **Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes:a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications.** Journal of Chromatography A., 1998; 812, 17-34.

A. Orriols, E. García Montoya, J.M Suñe-Negre, J.R Ticó, M. Miñarro, P. Pérez-Lozano, **Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring products through a new HPLC analytical method.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.,2006; 42, 192-199.

Bruce G. Charles, Suvatna Chulavatnatol, **High- Performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in urine using solid phase, ion pair extraction and ultraviolet detection.** Journal of Chromatography.,1993; 615, 91-96.

Carlos Guerrero, Elbert Hogendoorn, Elena Pytarch, Félix Hernández, Juan V. Sancho, María Ibáñez, Oscar J. Pozo, **Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in wáter using on- line solid- phase extraction liquid chromatography/tándem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A., 2006; 1103, 83-93.

Chuangji Liu, Hai Wang, Yanbin Jiang Zhenxia Du. **Rapid and simultaneous determination de amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B., 2011; 879, 533-540.

C. De Sena, E. Ciranni Signoretti, L. Giannetti, L. Valvo, R. Alimenti, R. Draisci, S. Alimonti, **Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis., 1997; 15, 487-493.

Chia-Yang Chen, Lloyd R. Wilson, Patrick M. Palmer, Patrick O'Keefe, Robert Sheridan, Thomas King, **Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed.** Science of the Total Environment., 2008; 394, 90-102.

D.R. El-Wasseef, F. Belal, M. M. El-Kerdawy, S. M El-Ashry, **Kinetic Spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms.** IL Fármacos,. 2000; 55, 680-686.

E. Benito Peña, J. L Urraca, M. C. Moreno-Bondi, **Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis., 2009; 49, 289-294.

Edgar Nägele, Ralf Moritz, **Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MS<sup>n</sup> and Accurate Mass Determination by ESI TOF.** J.Am Soc Mass Spectrom, 2005; 16, 1670-1676.

Georgios Batzias, Georgios Delis, Georgios Kounenis, Maria Koutsoviti- Papadopoulou, **Application and validation of LC/fluorescence method for the determination of amoxicillin in sheep serum and tissue cage fluid.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis., 2009; 49, 375-380.

Gan Zhang, Shi-Chun Zou, Wei-hai Xu, Xiang-dong Li, Yu-chun Liu, **Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using High-Performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.** Environmental Pollution,.145; 145, 672-679.

Hie-Joon Kim, Jong- Sei Park, Kyung-Hwan Yoon, So-Young Lee, Won Kim, **Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC-ESI mass spectrometry.** Journal of chromatography B,. 2004; 813, 121-127.

M. A. Brooks, T. L. Lee, **High- Performance liquid chromatography determination of amoxicillin in human plasma using a bonded-phase extraction.** Journal of Chromatography, 1984; 306, 429-435.

Maria Elena Benito Peña, Maria Cruz Moreno Bandi, 2006. **Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular, para la determinación de antibióticos  $\beta$ - lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medio ambiental** Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.Facultad de ciencias químicas, Madrid, España.

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, 2002 **Guía de Validación de Métodos Analíticos** México. DF.

## RESUMEN DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS EMERGENTES EN ESTUDIO.

**Cuadro 1.**

<b>RESULTADOS DE VALIDACIÓN</b>					
Compuestos orgánicos emergentes	Límite de detección (ng/L)	Límite de cuantificación (ng/L)	Precisión (%)	Exactitud (%)	Coefficiente de correlación (r)
17 $\beta$ -Estradiol	0.007	0.064	4.8	103	0.99
17 $\alpha$ -Etinilestradiol	0.002	0.026	7	64.5	0.99
Estrona	0.007	0.068	4.7	86.01	0.99
Diclofenaco GC/MS	1.5	9.1	8	101.4	0.99
Diclofenaco HPLC	7.5	82	1.97	102.5	0.99
Amoxicilina HPLC	10	15	13.6	80	1

### Conclusiones.

Se validaron las metodologías para los compuestos emergentes 17 $\beta$ -Estradiol, 17 $\alpha$ -Etinilestradiol, Estrona, Diclofenaco y Amoxicilina en agua.

Se concluye que para el caso de las hormonas y diclofenaco se obtuvieron límites de detección, límites de cuantificación del orden de nanogramos por litro cuando se emplea la cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

Se obtuvieron límites más altos para el diclofenaco y la amoxicilina debido a que se aplicó cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de ultravioleta visible que es una técnica menos sensible que la del detector de masas.

Estas metodologías son aplicables a muestras de agua potable y residual ya que cumplen con los límites de detección y cuantificación aceptables, con una precisión y exactitud adecuadas para el análisis de agua.

Se implementaron las metodologías para los compuestos emergentes en estudio que se presentan en cuadro 1 de resultados de validación y se generaron sus respectivos procedimientos.

# ANEXO A

## ANEXO A.

### Validación de Hormonas y de Farmacos en Agua.

Linealidad de Estrona.....	64
Linealidad de 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol.....	65
Linealidad de 17 $\beta$ -Estradiol.....	66
Límites de detección y cuantificación de Estrona.....	67
Límites de detección y cuantificación de 17 $\beta$ -Estradiol.....	68
Límites de detección y cuantificación de 17 $\alpha$ -Ethinilestradiol.....	69
Límites de detección y cuantificación de Diclofenaco.....	63
Procedimiento de determinación de hormonas en agua.....	72-80
Linealidad de Diclofenaco.....	70
Procedimiento de Diclofenaco en Agua.....	81-85
Procedimiento de Amoxicilina en agua.....	86-91

SEMARNAT

HOJA DE CÁLCULO

LINEARIDAD DEL MÉTODO



INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA  
LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA

Equipo : Cromatografato VARIAN CP 3800  
Parámetro: HORMONAS - ESTRONA  
Analista: LUIS ALBERTO GONZALEZ  
Fecha: 2011-10

Se introducen los valores de K0 y K1 de una de las tres curvas de calibración, obtenidos en el Cromatografato VARIAN 3800 ó en su defecto calculari la m y la b tomando en cuenta que el área es la variable independiente y la concentración es la variable dependiente.

Ecuación  $C = K0 + (K1 \cdot A)$  ó  $Conc. = b + (m \cdot A)$   
 $K0 \text{ ó } b = -0.118564109$   
 $K1 \text{ ó } m = 0.000774606$

Curva (archivo:blitocora folio):

concentración ng/mL	AREA	AREA	concentración ng/mL	AREA	concentración ng/mL	AREA	concentración ng/mL	AREA	concentración ng/mL	AREA
x	AREA	AREA	y1	y2	y3	sumatoria X	sumatoria Y	sumatoria X <sup>2</sup>	sumatoria XY	sumatoria Y <sup>2</sup>
0.046	132	120	-0.016336105	-0.025663138	-0.02020914	0.138	-0.062176619	-0.00286012	0.006348	0.001332245
0.093	218	239	0.050280019	0.06654675	0.05957529	0.279	0.176402058	0.01640539	0.025947	0.010505765
0.185	389	372	0.182737661	0.16956936	0.18118845	0.555	0.533495467	0.09666666	0.102675	0.094976074
0.37	683	755	0.410471852	0.46624349	0.4925801	1.11	1.369295441	0.50663931	0.4107	0.628505287
0.741	964	1156	0.628136164	0.77840975	0.7427787	2.223	2.149323777	1.59264892	1.647243	1.552195732
1.481	1858	2101	1.320634011	1.50886329	1.48020287	4.443	4.30970017	6.38266595	6.580083	6.211743152
2.962	3401	3995	2.515851213	2.97596723	2.94188456	8.886	8.433703009	24.9806283	26.320332	23.84057308
			sumatoria =			17.634	16.9097433	33.5748244	35.093328	32.33983134

No de curvas	n°	3
puntos de la curva	l°	7
pendiente	m°	0.9551
intersección	b°	0.0032
	C°	406.8849
	d°	428.0019
	e°	393.1970
	f°	16555.3214
	r°	0.9884
coeficiente de correlación	r°	0.9942

Conclusión: Cumple criterio de acuerdo al punto 9 del procedimiento CAGC7-06

**SEMARNAT**

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA		LINEARIDAD DEL MÉTODO										HOJA DE CÁLCULO
Equipo :	GRAFO VARIAN CP 3800											
Parámetro:S:	ETIMIL ESTRADIOL											
Analista:	LBERTO GONZALEZ											
Fecha:	2011-06											
Se introducen los valores de K0 y K1 de una de las tres curvas de calibración, obtenidos en el Cromatografo VARIAN 3800 ó en su defecto calcular la m y la b tomando en cuenta que el área es la variable independiente y la concentración es la variable dependiente.												
Ecuación	$C = K0 + (K1 * A)$ ó $Conc. = b + (m * A)$	Curva (archivo,bitácora,folio):										
K0 ó b =	-0.050519779											
K1 ó m =	0.000716803											
conc.teórica	AREA	conc. obtenida1	conc. obtenida2	conc. obtenida3	conc. teórica X	suma de las conc. obtenidas Y	suma de las conc. X*Y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>			
ng/mL		y1	y2	y3	ng/mL	ng/mL						
0.028	70	74	75	-0.000343545	0.00252367	0.00324047	0.084	0.005420595	0.00015178	0.002352	1.69876E-05	
0.057	159	162	152	0.063451953	0.06660236	0.05843433	0.171	0.187488646	0.01068685	0.009747	0.011744391	
0.114	203	222	234	0.094991301	0.10861056	0.1172122	0.342	0.320814069	0.0365728	0.038988	0.034558303	
0.228	383	390	387	0.224015904	0.22903353	0.22688312	0.684	0.679932548	0.15502462	0.155952	0.15411543	
0.456	699	748	803	0.450525762	0.48564913	0.52507331	1.368	1.461248199	0.66632918	0.623808	0.714530518	
0.911	1122	1357	1392	0.753733579	0.92218237	0.94727048	2.733	2.623186429	2.38972284	2.489763	2.315885994	
1.288	1682	1840	1917	1.155143455	1.28839838	1.32359224	3.864	3.747134082	4.8263087	4.978832	4.695087287	
	<b>n=</b>			<b>3</b>	sumatoria =		9.246	9.025224568	8.08479677	8.297442	7.925908911	
	<b>puntos de la curva</b>			<b>7</b>	<b>ΣX</b>		<b>ΣY</b>	<b>ΣX*Y</b>	<b>ΣX<sup>2</sup></b>	<b>ΣY<sup>2</sup></b>		
	<b>pendiente</b>			<b>0.9727</b>								
	<b>intercepción</b>			<b>0.00151</b>								
	<b>c=</b>			86.33350575								
	<b>d=</b>			88.757786								
	<b>e=</b>			84.98940863								
	<b>f=</b>			7453.474216								
	<b>r<sup>2</sup>=</b>			0.988069704								
	<b>coeficiente de correlación</b>			<b>0.9940</b>								
<b>Conclusión:</b> cumple criterio de acuerdo al punto 9 del procedimiento CAGC7-06												



**LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA  
CROMATOGRAFIA  
DE GAES  
PRUEBA DE DESEMPEÑO**

**HORMONAS: ESTRONA**

**ESTÁNDAR :** **MARCA :** **LOTE :** **PUREZA:**  
**LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO**  
 PROM.BCOS 0 ng/L t 99% 3.747  
**LDM = B+ (t) (S)**  
**LDM =** 0.007

**LIMITE DE CUANTIFICACIÓN**  
**LCM= 10S + X**  
**LCM =** 0.058

MUESTRA	CONC TEOR (ng-L)	CONC PROM (ng-L)	% RECUP	BLANCOS
SD1	0.046	0.046	99.74	0
SD2	0.046	0.046	99.74	0
SD3	0.046	0.045	98.06	0
SD4	0.046	0.045	96.38	0
SD5	0.046	0.044	94.70	0
SD6	0.046	0.049	106.46	0
SD7	0.046	0.032	69.52	0
x	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.0393</b>	<b>85.0114</b>	
s	<b>DESV.STD</b>	<b>0.0019</b>	<b>4.0667</b>	

**PRECISIÓN DEL METODO**

**%R= (Con Cuant/Conc Teor)\*100**

**%R =** 85.0114

**CV = ( s / R ) ( 100 )**

**EXACTITUD DEL METODO**

**Exactitud = (Conc.cuantificada prom. /Conc. Real)\*100**

**Exactitud=** 85.0114

**CUMPLE CRITERIO PROCED.  
CAGC7-06**

4.7837

**CUMPLE CRITERIO PROCED.  
CAGC7-06**

**LIMITES DE CONFIANZA**

**LC=R+ - (t n-1, 95) (s/n)**

**LC =E25 + (2.132\*E26/7)**

**LC =E25-(2.132\*E26/7)**

t 95% 2.132

**LCS=**

86.25

**LCI=**

83.77

MUESTRA		CONC TEOR (µg)	CONC PR	% RECUP	BLANCOS
<b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b>					
<b>CROMATOGRAFIA DE GAES</b>					
<b>PRUEBA DE DESEMPEÑO</b>					
<b>HORMONAS: 17 B ESTRADIOL</b>					
<b>ESTÁNDAR MARCA :</b>		<b>LOTE :</b>		<b>PUREZA:</b>	
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO</b>					
PROM.BCOS		0 ng/L		t 99%	3.747
<b>LDM = B• (t) (S)</b>					
<b>LDM =</b>		0.007			
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>					
<b>LCM= 10S • X</b>					
<b>LCM=</b>		0.064			
MUESTRA		CONC TEOR (µg)	CONC PR	% RECUP	BLANCOS
SD1		0.045	0.046	102.59	0
SD2		0.045	0.044	98.31	0
SD3		0.045	0.044	98.31	0
SD4		0.045	0.048	106.87	0
SD5		0.045	0.042	94.04	0
SD6		0.045	0.050	111.15	0
SD7		0.045	0.050	111.15	0
x	<b>PROMEDIO</b>	0.0459		101.5226	
s	<b>DESY.STD</b>	0.0019		4.8777	
		0.0466		103.2033	
<b>PRECISIÓN DEL METODO</b>				6.7319	
<b>%R= (Con Cuant/Conc Teor)*100</b>					
<b>%R=</b>		101.523			
<b>CV = ( s / R ) ( 100 )</b>		4.805 CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06			
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>					
<b>Exactitud = (Conc.cuantificada prom. /Conc. Real)*100</b>					
<b>Exactitud=</b>		103.203 CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06			
<b>LIMITES DE CONFIANZA</b>				t 95%	2.132
<b>LC=R• - (t n-1, 95) (s/n)</b>					
<b>LC = E25 • (2.132*E26/7)</b>		<b>LCS=</b>		105.25	
<b>LC = E25 • (2.132*E26/7)</b>		<b>LCI=</b>		101.15	



**SEMARNAT**

LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA				
CROMATOGRAFIA DE GAES				
PRUEBA DE DESEMPEÑO				
HORMONAS: ETINIL ESTRADIOL				
ESTÁNDAR MARCA :		LOTE :		PUREZA:
LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO				
PROM.BCOS	0 ng/L		t 99%	3.747
LDM = B• (t) (S)				
LDM =			0.002	
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN				
LCM= 10S • X				
LCM=			0.026	
MUESTRA	CONC TEOR (ug-	CONC PROM (ug-L)	% RECUP	BLANCOS
SD1	0.028	0.020	68.95	0
SD2	0.028	0.020	68.95	0
SD3	0.028	0.019	66.53	0
SD4	0.028	0.018	64.11	0
SD5	0.028	0.018	61.69	0
SD6	0.028	0.016	56.85	0
				0
x	PROMEDIO	0.0191	67.1373	
s	DESY.STD	0.0007	4.6962	
		0.0184		
PRECISIÓN DEL METODO				
%R= (Con Cuant/Conc Teor)*100				
%R=	67.137			
CV = ( s / R ) ( 100 )				
		6.995	CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06	
EXACTITUD DEL METODO				
Exactitud = (Conc.cuantificada prom. /Conc. Real)*100				
Exactitud=	64.516	CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06		
LIMITES DE CONFIANZA				
			t 95%	2.132
LC=R• - (t n-1, 95) (s/n)				
LC =E25 + (2.132*E26/7)	LCS=		68.57	
LC =E25-(2.132*E26/7)	LCI=		65.71	

HOJA DE CÁLCULO

LINEALIDAD DEL MÉTODO

arámetro:  
nalista:  
echa:

DICLOFENACO  
LUIS ALBERTO GONZALEZ  
2011-10

e e introducen los valores de K0 y K1 de una de las tres curvas de calibración, obtenidos en el Cromatograma VARIAN 3800 ó en su defecto calcular la m y la b  
xmando en cuenta que el área es la variable independiente y la concentración es la variable dependiente.

Ecuación  $C = K0 + (K1A)$  ó  $Conc. = b + (m \cdot A)$   
 $K0 \text{ ó } b = -0.002340061$   
 $K1 \text{ ó } m = 4.91957E-06$

Curva (archivo, bitácora, folio) **CARPETA\_VALIDACIONES 2010**

conc. teórica	x	AREA	CC 1	AREA	CC2	AREA	CC3	AREA	conc. obtenida1	y1	conc. obtenida2	y2	conc. obtenida3	y3	mg/L	suma conc. teórica X	mg/L	suma de las conc. obtenidas Y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	x*Y	ΣX	ΣY	ΣX <sup>2</sup>	ΣY <sup>2</sup>	ΣX*Y	Sx2	Sy2	
0.001	437	403	403	434					-0.000190207		-0.000357473		-0.000204966		0.003	0.000752646	-7.52646E-07	0.000003	2.05976E-07		0.36	0.355449394	0.01443	0.014244711	0.01443	0.014244711			
0.002	908	884	884	931				0.002128912	0.002128912	0.002240362	0.002240362	0.002240362	0.002240362	0.002240362	0.006	0.006375817	1.27516E-05	0.000012	1.35771E-05		0.18	0.179766197	0.0108	0.01077225	0.0108	0.01077225			
0.004	1177	1365	1365	1386				0.003450278	0.003450278	0.004375157	0.004375157	0.004375157	0.004375157	0.004375157	0.012	0.012205512	4.8922E-05	0.000048	5.02315E-05		0.36	0.355449394	0.01443	0.014244711	0.01443	0.014244711			
0.008	2149	2262	2262	2250				0.008232103	0.008232103	0.008788015	0.008788015	0.008788015	0.008788015	0.008788015	0.024	0.025746099	0.000205993	0.000192	0.000221192		0.36	0.355449394	0.01443	0.014244711	0.01443	0.014244711			
0.015	3276	3330	3330	3521				0.013779463	0.013779463	0.016501907	0.016501907	0.016501907	0.016501907	0.016501907	0.045	0.045752086	0.000686281	0.000675	0.00070154		0.36	0.355449394	0.01443	0.014244711	0.01443	0.014244711			
0.030	6335	6282	6282	6383				0.028925439	0.028925439	0.028954702	0.028954702	0.028954702	0.028954702	0.028954702	0.09	0.086353329	0.0025906	0.0027	0.002485714		0.36	0.355449394	0.01443	0.014244711	0.01443	0.014244711			
0.060	12705	12696	12696	12587				0.060163125	0.060163125	0.06018849	0.06018849	0.06018849	0.06018849	0.06018849	0.18	0.179766197	0.010765972	0.0108	0.01077225		0.36	0.355449394	0.01443	0.014244711	0.01443	0.014244711			
No de curvas		Puntos de la Curva		pendiente		intercepción		coeficiente de correlación		r <sup>2</sup>		r		r <sup>2</sup>		r		r <sup>2</sup>		r		r <sup>2</sup>		r		r <sup>2</sup>		r	
3		7		0.9973		-0.00017		0.9991		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293		0.17293	

Conclusión: Cumple criterio de acuerdo al punto 9 del procedimiento CAGC7-06

<b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b>				
<b>CROMATOGRAFIA DE GAES</b>				
<b>PRUEBA DE DESEMPEÑO</b>				
<b>DICLOFENACO</b>				
<b>ESTÁNDAR MARCA :</b>		<b>LOTE :</b>		<b>PUREZA:</b>
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO</b>				
PROM.BCOS	0 µg/L		t 99%	3.747
<b>LDM = B+ (t) (S)</b>				
<b>LDM =</b>		<b>0.0015</b>		
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>				
<b>LCM= 10S * X</b>				
<b>LCM =</b>		<b>0.0091</b>		
<b>MUESTRA</b>	<b>CONC TEOR (µg)</b>	<b>CONC PROM (µg)</b>	<b>% RECUP</b>	<b>BLANCOS</b>
SD1	0.005	0.00544	108.73	0
SD2	0.005	0.00548	109.62	0
SD3	0.005	0.00524	104.80	0
SD4	0.005	0.00490	97.93	0
SD5	0.005	0.00440	88.00	0
SD6	0.005	0.00497	99.50	0
<b>x</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>0.0051</b>	<b>101.4308</b>	
<b>s</b>	<b>DESY.STD</b>	<b>0.0004</b>	<b>8.1009</b>	
<b>PRECISIÓN DEL METODO</b>				
<b>%R= (Con Cuant/Conc Teor)*100</b>				
<b>%R =</b>		<b>101.43</b>		
<b>CY = ( s / R ) ( 100 )</b>		<b>7.99</b>		<b>CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06</b>
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>				
<b>Exactitud = (Conc.cuantificada prom. /Conc. Real)*100</b>				
<b>Exactitud=</b>		<b>101.43</b>		<b>CUMPLE CRITERIO PROCED. CAGC7-06</b>
<b>LIMITES DE CONFIANZA</b>				
			t 95%	2.132
<b>LC=R+ - (t n-1, 95) (s/n)</b>				
<b>LC =E25 + (2.132*E26/7)</b>		<b>LCS=</b>	<b>103.90</b>	
<b>LC =E25-(2.132*E26/7)</b>		<b>LCI=</b>	<b>98.96</b>	



**LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA**

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS

**1. OBJETIVO**

Identificar y cuantificar hormonas en muestras de agua.

**2. CAMPO DE APLICACIÓN**

Este método cuantifica las hormonas (17β-estradiol, 17α-etinilestradiol y estrona ) en muestras de agua ya sea superficial, subterránea, agua potable, residual y residual tratada.

**3. DEFINICIONES**

Las definiciones de Blanco de vidriería, Blanco de método, Muestra sintética, Muestra duplicada y Muestra fortificada, están descritas en el procedimiento de control de calidad analítico CAQAC7-08.

**4. FUNDAMENTO**

*La extracción en fase sólida es una forma de cromatografía digital (paso a paso) diseñado para extraer, distribuir, y /o adsorber uno o mas componentes de una fase líquida (muestra) dentro de una fase estacionaria (adsorbente o resina). Una sustancia adsorbente puede removerse del adsorbente paso a paso incrementando la fuerza de elución del eluyente (técnica de gradiente), posteriormente los extractos son limpiados por cromatografía en columna usando gel de sílice 60 70-230 y los extractos son derivatizados con BSTFA/ PIRIDINA, evaporados y reconstituidos en tolueno e inyectados a un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.*

**5. EQUIPO**

Cromatógrafo de gases modelo 3800 acoplado a espectrómetro de masas modelo 2200.  
Sistema de extracción de fase sólida  
Rotavapor  
Concentrador de muestras Minivap  
Vortex

**6. REACTIVOS**

Estándar de 17β-estradiol con una pureza mayor o igual al 99%  
Estándar de 17α-etinilestradiol con una pureza mayor o igual al 99%  
Metanol grado HPLC  
Hexano grado HPLC  
Acetona grado HPLC

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	11	2008		21	12	2005	06	
Elaboró:				Revisó:				Aprobó:	Hoja 1 de 9
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

 <p><b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b></p>					
<p>SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b></p>					
<p>AREA:</p>	<p>TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS</p>				
<p>Derivatizante N,O-bis(trimetilsilil)rifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilsililclorano (TMSCl)          Piridina          Subrogado 4,4'-Diclorobifenilo          Helio          Nitrógeno          Ácido Sulfúrico al 98 %          Agua grado HPLC          Sulfato de sodio anhidro grado reactivo</p>					
<p><b>7. MATERIAL</b></p>					
<p>Columna capilar VF5ms 30 m X 0.25 mm X 0.25 µm          Cartuchos de extracción en fase sólida CHROMABOND C18 ec 3 mL/500 mg          Viales de 1.8 mL          Microjeringas de 1000, 500, 100, 50, 25 µL</p>					
<p><b>8. CONDICIONES DE LA MUESTRA</b></p>					
<p>La muestra debe conservarse con metanol al 2 % v/v en frasco ambar y refrigeración a 4 °C.</p>					
<p><b>9. INTERFERENCIAS</b></p>					
<p>Las interferencias se pueden agrupar en tres categorías:</p>					
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Disolventes y /o reactivos</li> <li>2. Material de laboratorio contaminado</li> <li>3. Partes del cromatografo; Gas acarreador, columnas y/o detector contaminado</li> <li>4. Compuestos extraídos de la matriz que causan respuesta en el detector. Las interferencias coextraídas de las muestras pueden variar considerablemente.</li> </ol>					
Fecha de edición:	D M A	Sustituye a:	D M A	Revisión:	Clave:
	01 11 2008		21 12 2005	06	
Elaboró:	Revisó:			Aprobó:	Hoja 2 de 9
				<b>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</b>	

Forma: CR-03



**LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA**

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS

**10. PRECAUCIONES**

**11. PROCEDIMIENTO**

Preparación de la curva de calibración:

Preparación de la curva de calibración para de cuantificación de Hormonas (17β-estradiol, 17α-etinilestradiol y estrona ).

1.- Para la realización de la curva de calibración se parte con una solución madre de una concentración de

Estrona 1850 µg-mL  
17β-estradiol 1807µg-mL  
17α-etinilestradiol 1140 µg-mL

De ahí se parte para realizar las diluciones correspondientes según las siguientes tablas

**TABLA 1 Estrona**

µg-mL Inicial	µL Inicial	µg-mL Final	µL Final	ng-mL
0.00185	25	0.00004625	1000	0.046
0.00185	50	0.00009250	1000	0.093
0.00185	100	0.00018500	1000	0.185
0.0185	20	0.00037000	1000	0.370
0.0185	40	0.00074000	1000	0.740
0.0185	80	0.00148000	1000	1.480
0.0185	160	0.00296000	1000	2.960

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	11	2008		21	12	2005	06	
Elaboró:	Revisó:						Aprobó:		Hoja 3 de 9
							M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS		

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA:

TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN  
AGUA POR CROMATOGRFÍA DE GASES  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS

**TABLA 2 17 $\beta$ -estradiol**

$\mu\text{g-mL}$ Inicial	$\mu\text{L}$ Inicial	$\mu\text{g-mL}$ Final	$\mu\text{L}$ Final	ng-mL
0.001807	25	0.000045 2	1000	0.0452
0.001807	50	0.000090 4	1000	0.0904
0.001807	100	0.000180 7	1000	0.1807
0.01807	20	0.000361 4	1000	0.3614
0.01807	40	0.000722 8	1000	0.7228
0.01807	80	0.001445 6	1000	1.4456
0.01807	160	0.002891 2	1000	2.8912

**TABLA 3 17 $\alpha$ -etinilestradiol**

$\mu\text{g-mL}$ Inicial	$\mu\text{L}$ Inicial	$\mu\text{g-mL}$ Final	$\mu\text{L}$ Final	ng-mL
0.001139 4	25	0.000028 5	1000	0.028
0.001139 4	50	0.000057 0	1000	0.057
0.001139 4	100	0.000113 9	1000	0.114
0.011394	20	0.000227 9	1000	0.228
0.011394	40	0.000455 8	1000	0.456
0.011394	80	0.000911 5	1000	0.912
0.011394	160	0.001823 0	1000	1.823

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	11	2008		21	12	2005	06	
Elaboró:	Revisó:						Aprobó:	Hoja 4 de 9	
							M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS		

Forma: CR-03



**LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA**

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA:

TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN  
AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS

- 2.-A cada punto de la curva de calibración se le agrega 50µL de una concentración de 10.66 µg-mL aprox de Surrogado ( 4,4-Diclorobifenilo)
- 3.-Cada punto de la curva se concentra a flujo de Nitrógeno ( Moderado ), hasta sequedad.
- 4.-A cada vial ( punto de la Curva) se le agrega 50µL del Derivatizante N,O-bis(trimetilsilil)rifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilsililclorano (TMSCI) y 25 µL Piridina .
- 5.-Se homogenizan en el bortex por un lapso de 20segundos
- 6.-Se libera el exceso de presión dentro de cada uno de los vialesy se meten a la estufa a una temperatura de 70°C durante 30 minutos
- 7.-Pasado el tiempo se dejan a temperatura ambiente y se concentran a sequedad para reconstituir en tolueno
- 8.-Homegenizar en el bortex y concentrar nueva mente.
- 9.- Por último se afora a 1mL con Tolueno
- 10.-Se inyecta al sistema cromatografico lo mas pronto posible.

Condiciones Cromatografías para la detección y cuantificación de las Hormonas fueron :

El instrumento analítico fue un Cromatografo Varian CP 3800 y un detector de masas Saturn 2200, acoplado a una columna capilar Factor Four VF -5ms de 30m x 0.25mm, 0.25

La corriente del gas Helio fue de 1.00 mL/min

Se inyecto un volumen de 2µL en inyección splitless, la temperatura del inyector es de 280°C

El programa de temperatura fue de

Temp °C	Rate (°C/min)	Hold (min)
160		3.50
260	25.0	0.00
270	1.00	0.00
300	30	1.00
		18.50

Se realizo la detección por medio de MS/MS ( Masas /Masas )

Las temperaturas de análisis fueron de

Trampa 220 Manifould 50 y línea de Transferencia fue de 280

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	11	2008		21	12	2005	06	
Elaboró:				Revisó:				Aprobó:	Hoja 5 de 9
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

 <b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b>																			
SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b>																			
AREA:	TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS																		
<p>Para la identificación, los iones principales de los compuestos fueron</p> <table border="0"> <tr> <td>Estrona</td> <td>342</td> </tr> <tr> <td>17β-estradiol</td> <td>416</td> </tr> <tr> <td>17α-etinilestradiol</td> <td>425</td> </tr> </table> <p><b>Blanco de cristalería.</b></p> <p>Realizar un blanco de vidriería a todo el material a utilizar como a continuación se describe:                      Dar dos lavados con acetona (20 mL cada lavado) grado HPLC al material y descartar los lavados                      Dar dos lavados con metanol (20 mL cada lavado) grado HPLC y descartar los lavados                      Por último enjuagar el material con metanol (20 mL a cada matraz erlenmeyer) este lavado se recolecta en un matraz bola de 500 mL y se concentra en rotavapor procurando no llegar a sequedad.                      El extracto se transfiere a un vial de 1.8 mL y se concentra a flujo de nitrógeno, a la par de la concentración, se realizan tres enjuagues con metanol al matraz bola y los lavados se agregan al vial de 1.8 mL para concentrar a 1 mL.</p> <p><b>Tratamiento de la muestra</b></p> <p>Poner a temperatura ambiente la muestra. Si esta se encontrara en refrigeración</p> <p>Homogenizar la muestra perfectamente por inversión</p> <p>Tomar un litro de muestra y filtrar a través de un filtro Whatman de 1.0 ó 1.2 micras.</p> <p>Ajustar el pH de la muestra ya filtrada a pH menor a 3</p> <p>Se agrega subrogado (50 µL de una concentración de aproximadamente 10.66 µg/mL).</p> <p>Dejar reposar la muestra por un lapso de 1 hora con agitación periódica.</p> <p><b>Acondicionamiento del cartucho de extracción en fase sólida.</b></p> <p>Los cartuchos se acondicionan con metanol 2 X 5 mL de metanol y agua HPLC acidificada (con ácido clorhídrico a pH menor o igual a 3) con 2X 10 mL.</p>		Estrona	342	17β-estradiol	416	17α-etinilestradiol	425												
Estrona	342																		
17β-estradiol	416																		
17α-etinilestradiol	425																		
Fecha de edición:	<table border="1"> <tr> <td>D</td> <td>M</td> <td>A</td> <td>Sustituye a:</td> <td>D</td> <td>M</td> <td>A</td> <td>Revisión:</td> <td>Clave:</td> </tr> <tr> <td>01</td> <td>11</td> <td>2008</td> <td></td> <td>21</td> <td>12</td> <td>2005</td> <td>06</td> <td></td> </tr> </table>	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:	01	11	2008		21	12	2005	06	
D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:											
01	11	2008		21	12	2005	06												
Elaboró:	<table border="1"> <tr> <td>Revisó:</td> <td>Aprobó:</td> <td>Hoja 6 de 9</td> </tr> <tr> <td></td> <td>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</td> <td></td> </tr> </table>	Revisó:	Aprobó:	Hoja 6 de 9		M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS													
Revisó:	Aprobó:	Hoja 6 de 9																	
	M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS																		

Forma: CR-03



**LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA**

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Una vez acondicionados los cartuchos de extracción se hace pasar un litro de muestra a través de ellos a razón de 5-10 mL/min.

Se deja secar por 30 minutos

Se eluye con 5 mL de metanol recibíendose en vial de 4 mL

A Cada unas de las muestras se concentra a flujo de Nitrógeno ( Moderado ), hasta sequedad.

A cada vial que contiene una muestra se le agrega 50µL del Derivatizante ( N,O-bis(trimetilsilil)rifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilsililclorano (TMSCI) y 25 µL Piridina .

Se homogenizan en el bortex por un lapso de 20segundos

Liberar el exceso de presión que se halla formado dentro de cada uno de los viales y se meten a la estufa a una temperatura de 70°C durante 30 minutos

Pasado el tiempo se dejan a temperatura ambiente y se concentran a sequedad a flujo suave de Nitrogeno para reconstituir en tolueno

Homegenizar en el bortex y concentrar nueva mente.

Por último se afora a 1mL con Tolueno

Se inyecta al sistema cromatografico lo mas pronto posible.

De ser necesario se realizara una limpieza con silica gel

Pesar 3g de Silica Gel y calentar a150°C durante 24 hra

Desactivar la silica gel con 1.5% de agua deionizada (m/m)

Rellenar una columna vertical de 20mL

Acondicionar la columna empacada con la silica gel desactivada con 5mL de una solución de Hexano – Acetona 65-35

Depositar la muestra en la columna empacada evitando que esta llegue a sequedad

Eluir la muestra con 10mL de la solución de Hexano – Acetona

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	11	2008		21	12	2005	06	
Elaboró:				Revisó:				Aprobó:	Hoja 7 de 9
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

 <p><b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b></p>	
<p>SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b></p>	
<p>AREA:</p>	<p>TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS</p>
<p>Concentrar la muestra a sequedad y realizar la derivatización como se menciona a continuación :</p> <p>A cada vial que contiene una muestra se le agrega 50µL del Derivatizante ( N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilsililclorano (TMSCl) y 25 µL Piridina .</p> <p>Se homogenizan en el bortex por un lapso de 20segundos</p> <p>Liberar el exceso de presión que se halla formado dentro de cada uno de los viales y se meten a la estufa a una temperatura de 70°C durante 30 minutos</p> <p>Pasado el tiempo se dejan a temperatura ambiente y se concentran a sequedad a flujo suave de Nitrogeno para reconstituir en tolueno</p> <p>Homegenizar en el bortex y concentrar nueva mente.</p> <p>Por último se afora a 1mL con Tolueno</p> <p>Se inyecta al sistema cromatografico lo mas pronto posible</p>	
<p><b>12. CÁLCULOS</b></p>	
<p>12.1 Hacer la integración bajo la curva de las señales que coincidan en tiempo de retención con los estándares.</p>	
<p>12.2 Llevar a cabo el ajuste de la curva y el cálculo del coeficiente de correlación estadísticamente. Determinar por este medio la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.</p>	
<p>12.3 Interpolan los valores de las áreas de los picos de las muestras positivas en la curva de calibración de los estándares.</p>	
<p>12.4 En caso de que alguna muestra presente analitos en concentraciones mayores a los ámbitos de la curva de calibración, se preparará una nueva curva de calibración que cubra el rango de concentración del analito en la muestra o se diluirá el extracto .</p>	
Fecha de edición:	D M A Sustituye a: D M A Revisión: Clave:
	01 11 2008 21 12 2005 06
Elaboró:	Revisó: Aprobó: M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS Hoja 8 de 9

Forma: CR-03

		<b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b>							
SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b>									
AREA:		TEMA: DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS							
<p><b>13. FORMATOS</b></p> <p>No aplica</p> <p><b>14. BIBLIOGRAFÍA</b></p> <p>Gibson R., Becerril-Bravo E., Silva Castro V., Jimenez B. 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1169, 31-39</p> <p><b>15. REFERENCIAS</b></p> <p>Gibson R., Becerril-Bravo E., Silva Castro V., Jimenez B. 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1169, 31-39</p>									
Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	11	2008		21	12	2005	06	
Elaboró:	Revisó:			Aprobó:			Hoja 9 de 9		
				M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS					

Forma: CR-03

 <p><b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b></p>															
<p>SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b></p>															
<p>AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS</p>	<p>TEMA: DETERMINACIÓN DE DICLOFENACO EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC</p>														
<p><b>1. OBJETIVO</b></p> <p>Identificar y cuantificar Diclofenaco en muestras de agua.</p>															
<p><b>2. CAMPO DE APLICACIÓN</b></p> <p>Este método cuantifica el fármaco diclofenaco en muestras de agua natural ya sea superficial, subterránea, agua potable, residual y residual tratada.</p>															
<p><b>3. DEFINICIONES</b></p> <p>Las definiciones de Blanco de vidriería, Blanco de método, Muestra sintética, Muestra duplicada y Muestra fortificada están en el procedimiento de control de calidad analítico CAQAC7-08.</p>															
<p><b>4. FUNDAMENTO</b></p> <p>La extracción en fase sólida es una forma de cromatografía digital (paso a paso) diseñado para extraer, distribuir, y /o adsorber uno o mas componentes de una fase líquida (muestra) dentro de una fase estacionaria (adsorbente o resina). Una sustancia adsorbente puede removerse del adsorbente paso a paso incrementando la fuerza de elución del eluyente (técnica de gradiente).</p>															
<p><b>5. EQUIPO</b></p> <p>Cromatógrafo HPLC Sistema de extracción de fase sólida Concentrador de muestras Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g</p>															
<p><b>6. REACTIVOS Y MATERIAL</b></p> <p>Estándar diclofenaco Sigma 98% pureza Fosfato monobásico de potasio J. T. Baker, grado reactivo Hidróxido de sodio J. T. Baker, grado reactivo Ácido fosfórico, Baker Analyzed; grado reactivo Metanol grado HPLC Acetonitrilo grado HPLC Nitrógeno Aire Agua grado HPLC</p>															
<p>Fecha de edición:</p> <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>D</td><td>M</td><td>A</td> </tr> <tr> <td>01</td><td>12</td><td>2011</td> </tr> </table>	D	M	A	01	12	2011	<p>Sustituye a:</p> <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>D</td><td>M</td><td>A</td> </tr> <tr> <td>01</td><td>12</td><td>2011</td> </tr> </table>	D	M	A	01	12	2011	<p>Revisión:</p> <p style="text-align: center;">06</p>	<p>Clave:</p>
D	M	A													
01	12	2011													
D	M	A													
01	12	2011													
<p>Elaboró:</p> <p>M.C. MARTHA AVILES FLORES</p>	<p>Revisó:</p> <p>M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA</p>	<p>Aprobó:</p> <p style="text-align: center;"><b>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</b></p>	<p>Hoja 1 de 5</p>												

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE DICLOFENACO  
EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

**MATERIAL**

Matraces volumétricos calibrados de 10, 25, 100 y 1000mL  
Pipetas volumétricas calibradas de 2 y 5mL  
Probeta calibrada de 100 y 1000 mL  
Acrodiscos de Nylon "Millex" con tamaño de poro de 0.45 µm  
Micropipetas calibradas de 500 y 1000 µL  
Cartuchos de separación Chromabond C18 3mL/500mg

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

6.1.1 Disolución madre de Diclofenaco

*Solución Stock de referencia Diclofenaco, 1000 µg/mL. Pesar 10.20mg de sustancia de referencia de Diclofenaco y verter en un matraz volumétrico de 10mL, disolver con 5mL de metanol y sonicar 10 minutos hasta la dilución completa. Llevar a volumen con metanol*

Solución Estándar de Diclofenaco 40 µg/mL. Transferir 1mL de la solución Estándar de Diclofenaco 40 µg/mL (Sol. A) a un matraz volumétrico de 10mL, mezclar y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.

6.1.1.1 Preparación de disoluciones para la curva de calibración

*A partir de la disolución madre de diclofenaco de aproximadamente 4000 ng/mL, preparar las disoluciones para la curva de calibración de acuerdo al intervalo de trabajo necesario, utilizando micro jeringas tomar los diferentes volúmenes y aforar con solución reconstituyente ajustado a pH 12 ± 0.1.*

6.1.1.2 Solución fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 4.7 ± 0.1. Disolver 3.40g de fosfato de potasio monobásico en un volumen aproximado de 700mL de agua deionizada, agitar hasta disolver completamente, ajustar pH a 4.7 ± 0.1 y aforar con agua en un matraz de 1000mL.

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró: M.C. MARTHA AVILES FLORES				Revisó: M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA				Aprobó: M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	
								Hoja 2 de 5	

Forma: CR-03

	<p><b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b></p>																				
<p>SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b></p>																					
<p>AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS</p>	<p>TEMA: DETERMINACIÓN DE DICLOFENACO EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC</p>																				
<p>6.1.1.3 Fase Móvil pH 6 ± 0.1. Mezclar un volumen de 150mL de solución de fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 4.7 ± 0.1 y 350mL de acetonitrilo. Filtrar a través de membrana de 0.45 µm y sonicar por un período de 10 minutos. Ajustar la mezcla a pH 6 ± 0.1 con NaOH 1N</p> <p>6.1.1.4 Solución reconstituyente. Mezclar un volumen de 30mL de solución de fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 11 ± 0.1 y 70mL de acetonitrilo. Ajustar, si es necesario, pH de la solución a 12 con NaOH 1N.</p> <p>6.1.1.5 Solución de lavado. Preparar una solución 70/30 de fosfato de potasio monobásico 0.025M pH 4.7 y acetonitrilo.</p> <p>6.1.1.6 Acondicionamiento del Cartucho de Separación Chromabond C18 3mL/500mg. Pasar 1mL de metanol seguido de 1mL de agua acondicionada a pH 2.7 ± 0.1. Repetir el procedimiento 3 veces a cada cartucho. Extracción de la muestra. Transferir el total del placebo adicionado al cartucho de separación. Aplicar vacío para obtener un flujo aproximado de 10mL/min. Lavar posteriormente con 5mL de solución de lavado anteriormente descrita. Elución y reconstitución de la muestra. Transferir 2mL de acetonitrilo al cartucho y colectar en un vial de 4mL, concentrar a sequedad con flujo de nitrógeno y adicionar 1mL de la solución reconstituyente pH12±0.1.</p> <p style="text-align: center;"><b>7. CONDICIONES DE LA MUESTRA</b></p> <p>La muestra debe conservarse en frasco ámbar y refrigeración a 4 °C.</p> <p style="text-align: center;"><b>8. INTERFERENCIAS</b></p> <p>Las interferencias se pueden agrupar en tres categorías:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Disolventes y /o reactivos</li> <li>2. Material de laboratorio contaminado</li> <li>3. Gas acarreador, columnas y/o detector contaminado</li> </ol>																					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;">Fecha de edición:</td> <td style="width: 10%;">D</td> <td style="width: 10%;">M</td> <td style="width: 10%;">A</td> <td style="width: 20%;">Sustituye a:</td> <td style="width: 10%;">D</td> <td style="width: 10%;">M</td> <td style="width: 10%;">A</td> <td style="width: 15%;">Revisión:</td> <td style="width: 10%;">Clave:</td> </tr> <tr> <td></td> <td>01</td> <td>12</td> <td>2011</td> <td></td> <td>01</td> <td>12</td> <td>2011</td> <td>06</td> <td></td> </tr> </table>		Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:		01	12	2011		01	12	2011	06	
Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:												
	01	12	2011		01	12	2011	06													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Elaboró:</td> <td style="width: 33%;">Revisó:</td> <td style="width: 33%;">Aprobó:</td> </tr> <tr> <td>M.C. MARTHA AVILES FLORES</td> <td>M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA</td> <td>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</td> </tr> </table>		Elaboró:	Revisó:	Aprobó:	M.C. MARTHA AVILES FLORES	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA	M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS														
Elaboró:	Revisó:	Aprobó:																			
M.C. MARTHA AVILES FLORES	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA	M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS																			
<p>Hoja 3 de 5</p>																					

Forma: CR-03

 <b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b>																			
SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b>																			
AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS	TEMA: DETERMINACIÓN DE DICLOFENACO EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC																		
<p><b>9. PRECAUCIONES</b></p> <p><b>10. CÁLCULOS</b></p> <p>10.1 Hacer la integración bajo la curva de las señales que coincidan en tiempo de retención con los estándares de diclofenaco.</p> <p>10.2 Calcular del coeficiente de correlación estadísticamente y determinar la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.</p> <p>10.3 Interpolan los valores de las áreas de los picos de las muestras en la curva de calibración de los estándares de diclofenaco</p> <p>10.4 En caso de que alguna muestra presente analitos en concentraciones mayores a los ámbitos de la curva de calibración, se preparará una nueva curva de calibración que cubra el intervalo de concentración del analito en la muestra o se diluirá el extracto.</p> <p><b>11 PROCEDIMIENTO</b></p> <p>11.1 Establecer las condiciones de operación del equipo cromatógrafo de líquidos. (Temperatura ambiente 27°C)</p> <p>11.2 A partir de la disolución madre detallada en la sección 6.1.1 preparar las disoluciones para la curva de calibración y leer mínimo tres lecturas.</p> <p>11.3 En cada lote de 8 muestras incluir un blanco, duplicado de muestra, un estándar de concentración conocida de la disolución madre, una muestra fortificada..</p> <p>11.4 Criterios de aceptación. El coeficiente de correlación de la curva debe tener un valor dentro del intervalo 0.98-0.99 y el porcentaje de variación entre duplicados no debe ser mayor del 10%.</p> <p>11.5 Neutralizar con hidróxido de sodio concentrado grado industrial a pH ≤ 7 todos los desechos que se generan entre inyección e inyección de cada una de las muestras de agua analizadas.</p>																			
Fecha de edición:	<table border="1"> <tr> <td>D</td><td>M</td><td>A</td> <td>Sustituye a:</td><td>D</td><td>M</td><td>A</td> <td>Revisión:</td><td>Clave:</td> </tr> <tr> <td>01</td><td>12</td><td>2011</td> <td></td><td>01</td><td>12</td><td>2011</td> <td>06</td><td></td> </tr> </table>	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:	01	12	2011		01	12	2011	06	
D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:											
01	12	2011		01	12	2011	06												
Elaboró: M.C. MARTHA AVILES FLORES	Revisó: M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA																		
Aprobó: <b>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</b>																			
Hoja 4 de 5																			

Forma: CR-03

 <p><b>LABORATORIO DE CALIDAD DEL AGUA</b></p>																																									
<p>SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD <b>MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO</b></p>																																									
<p>AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS</p>	<p>TEMA: DETERMINACIÓN DE DICLOFENACO EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC</p>																																								
<p><b>12. FORMATOS</b></p> <p>No aplica.</p> <p><b>11. BIBLIOGRAFÍA</b></p> <p>Colborn T, 2002. Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects of wildlife. <i>Env. Health Perspective</i> 103: 81-86.</p> <p>Damstra T, Barlow S, Kavlock R y Van Der Kraak G, 2005. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, An assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme, International Programme on Chemical Safety.</p> <p>Daughton C. y Ternes A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? <i>Environ. Health Perspect.</i> 107: 907-937.</p> <p>Dodds E y Lawson W, 1938. Molecular structure in relation to estrogenic activity compounds without a phenanthrene nucleus. <i>Proc., Royal Society London B</i>, 125: 222-232.</p> <p>Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) <i>Aquatic Toxicol.</i> 76, 122.</p> <p>Guía de Validación de Métodos Analíticos; editado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; A.C.; registro ante la DGP F-032; edición 2002.</p>																																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;">Fecha de edición:</td> <td style="width: 5%;">D</td> <td style="width: 5%;">M</td> <td style="width: 5%;">A</td> <td style="width: 20%;">Sustituye a:</td> <td style="width: 5%;">D</td> <td style="width: 5%;">M</td> <td style="width: 5%;">A</td> <td style="width: 15%;">Revisión:</td> <td style="width: 15%;">Clave:</td> </tr> <tr> <td></td> <td>01</td> <td>12</td> <td>2011</td> <td></td> <td>01</td> <td>12</td> <td>2011</td> <td>06</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">Elaboró: M.C. MARTHA AVILES FLORES</td> <td colspan="4">Revisó: M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA</td> <td colspan="2">Aprobó: <i>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</i></td> </tr> <tr> <td colspan="4"></td> <td colspan="4"></td> <td colspan="2">Hoja 5 de 5</td> </tr> </table>		Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:		01	12	2011		01	12	2011	06		Elaboró: M.C. MARTHA AVILES FLORES				Revisó: M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA				Aprobó: <i>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</i>										Hoja 5 de 5	
Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:																																
	01	12	2011		01	12	2011	06																																	
Elaboró: M.C. MARTHA AVILES FLORES				Revisó: M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA				Aprobó: <i>M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS</i>																																	
								Hoja 5 de 5																																	

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

**1. OBJETIVO**

Identificar y cuantificar Amoxicilina en muestras de agua.

**2. CAMPO DE APLICACIÓN**

Este método cuantifica el fármaco amoxicilina en muestras de agua natural ya sea superficial, subterránea, agua potable, residual y residual tratada.

**3. DEFINICIONES**

Las definiciones de Blanco de vidriería, Blanco de método, Muestra sintética, Muestra duplicada y Muestra fortificada están en el procedimiento de control de calidad analítico CAQAC7-08.

**4. FUNDAMENTO**

La extracción en fase sólida es una forma de cromatografía digital (paso a paso) diseñado para extraer, distribuir, y/o adsorber uno o mas componentes de una fase líquida (muestra) dentro de una fase estacionaria (adsorbente o resina). Una sustancia adsorbente puede removerse del adsorbente paso a paso incrementando la fuerza de elución del eluyente (técnica de gradiente).

**5. EQUIPO**

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución HP modelo 1050 con detector UV-Vis  
Potenciometro Orion-Thermo  
Sistema de extracción de fase sólida Varian de 20 plazas  
Concentrador de muestras  
Balanza analítica Shimadzu con sensibilidad de 0.0001 g

**6. REACTIVOS**

Estándar amoxicilina Sigma 9.5% pureza, Lote 440-136B, Chem Service PS-2016  
Fosfato monobásico de potasio J. T. Baker, grado reactivo  
Hidróxido de sodio J. T. Baker, grado reactivo  
Ácido fosfórico, Baker Analyzed; grado reactivo  
Ácido Fórmico Baker grado suprapur  
Ácido Acético Glacial Baker grado reactivo  
Acetato de sodio Baker grado reactivo  
Sal disódica del Ácido Etilendiaminotetra áctico EDTA grado reactivo  
Metanol grado HPLC  
Solución Buffer pH 4 Fermont

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	M.C. MARTHA AVILES FLORES			Revisó:	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			Aprobó:	Hoja 1 de 7
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN  
MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

Solución Buffer pH 10 Fermont  
Solución Buffer pH 7 Fermont  
Nitrógeno  
Aire  
Agua grado HPLC

**7. MATERIAL**

Matraces volumétricos calibrados de 10, 25, 100 y 1000mL  
Pipetas volumétricas calibradas de 2 y 5mL  
Probeta calibrada de 100 y 1000 mL  
Acrodiscos de Nylon "Millex" con tamaño de poro de 0.45 µm  
Micropipetas calibradas de 500 y 1000 µL  
Cartuchos de separación Oasis HLB 6 cc WAT106202  
Viales de 2 mL SUNRI con tapa y sello de teflón/silicon  
Columna XTerra C8 3.9mm X 150 mm, 5µm de espesor

**8. CONDICIONES DE LA MUESTRA**

La muestra debe conservarse en frasco ámbar y refrigeración a 4 °C.

**9. INTERFERENCIAS**

Las interferencias se pueden agrupar en tres categorías:

1. Disolventes y /o reactivos
  2. Material de laboratorio contaminado
- Gas acarreador, columnas y/o detector contaminado

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

**9.1.1 Disolución madre de Amoxicilina.**

Solución de referencia de Amoxicilina de 1000µg/mL **A.** Pesar aproximadamente 100 mg de Amoxicilina y verter en matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 25 mL de agua y sonicar 10 minutos hasta disolución completa. Llevar a volumen con metanol.

Solución Stock de referencia Amoxicilina, 100 µg/mL **B.** Pesar 11.5 mg de sustancia de referencia de Amoxicilina y verter en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 25 mL de

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	M.C. MARTHA AVILES FLORES			Revisó:	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			Aprobó:	Hoja 2 de 7
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

agua y sonicar 10 minutos hasta la disolución completa. Llevar a volumen con metanol.

Solución de Estándar de Amoxicilina 1000 ng/mL

Transferir 100  $\mu$ L de la solución Stock de Amoxicilina de 100  $\mu$ g/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, mezclar y aforar con fase móvil.

9.1.1.1 Preparación de disoluciones para la curva de calibración

De la solución B de Amoxicilina tomar alícuotas de 1.5, 2.5 y 5 mL, verter en matraz volumétrico de 10 mL y aforar con fase móvil de acetatos pH 4.6, se obtendrán concentraciones de 15, 25, 50 ng/mL

De la solución A de Amoxicilina tomar alícuotas de 1,3 y 5 mL, verter a un matraz volumétrico de 10 mL y aforar con fase móvil de acetatos pH 4.6, se obtendrán concentraciones de 100, 300 y 500 ng/mL.

El intervalo de trabajo de la curva de calibración es de 15 a 500 ng/mL.

6.1.1.2 Solución ácido acético 0.020 M. Disolver 1.55 mL de ácido acético glacial en 1000 mL de agua grado cromatográfico, agitar hasta disolver completamente. Llevar a volumen con agua.

6.1.1.3 Solución de acetatos de sodio 0.020 M. Disolver 2.72 g de acetato de sodio en 1000 mL, adicionar un volumen de 500 mL de agua grado cromatográfico, agitar hasta disolver completamente. Llevar a volumen con agua.

6.1.1.4 Solución amortiguadora de acetatos 0.020 M, pH 4.6  $\pm$  0.1. Mezclar 255 ml de la solución de ácido acético 0.02M y 245 mL de la solución de acetatos de sodio en un matraz de 1000 mL, adicionar un volumen de 500 mL de agua grado cromatográfico, agitar hasta disolver completamente. Llevar a volumen con agua. Determinar el pH

6.1.1.5 Fase móvil. Mezclar un volumen de 960 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.020 M pH 4.6  $\pm$  0.1 y 40 mL de metanol (960:40). Filtrar a través de membrana de 0.45  $\mu$ m y sonicar por un periodo de 10 minutos.

6.1.1.6 Solución diluyente con EDTA a pH 4.6  $\pm$  0.1. En un matraz de 1000 mL, adicionar un volumen de 500 mL de agua municipal, adicionar 200 mg de EDTA, agitar hasta disolver completamente. Llevar a volumen con agua. Determinar el pH y ajustar a pH 4.6  $\pm$  0.1 con solución de ácido fosfórico o hidróxido de sodio 5N.

6.1.1.7 Solución Eluyente de Metanol ácido. En un matraz de 100 mL, adicionar un volumen de

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	M.C. MARTHA AVILES FLORES			Revisó:	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			Aprobó:	
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	Hoja 3 de 7

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN  
MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

50 mL de metanol, adicionar 200 uL de ácido fórmico, agitar hasta disolver completamente. Llevar a volumen con metanol.

6.1.1.8 Acondicionamiento de los cartuchos de separación utilizados fueron OASIS HLB Waters 6cc, estos fueron acondicionados con 6 ml de metanol grado HPLC y 6 ml de solución de buffer de acetatos pH 4.6/ E.D.T.A. Repetir el procedimiento tres veces.

**Procedimiento de preparación de las muestras**

Agregar a la muestra 100mg de E.D.T.A sal disódica por cada 1000 ml, ajustar el pH a  $4.6 \pm 0.1$  con ácido fosfórico e hidróxido de sodio.

Posteriormente de haber acondicionado los cartuchos, transferir las muestras con un flujo de 10ml/min. Con la finalidad de obtener la mayor retención del analito, al terminar de extraerla se dejar con vacío por 10 min, para eliminar la humedad en el cartucho de separación.

Eluir con 1ml de la solución metanol/ácido fórmico (100ml/90µl), recolectar en vial de 2 mL y evaporar con nitrógeno hasta sequedad para finalmente ser reconstituir con 1 ml de buffer de acetatos pH  $4.6 \pm 0.1$  e inyectar al cromatógrafo.

3.

**10. PRECAUCIONES**

Evitar luz del sol directa sobre las muestras, coleccionar las muestras en frascos ambar.

**11. CÁLCULOS**

11.1 Hacer la integración bajo la curva de las señales que coincidan en tiempo de retención con los estándares de diclofenaco.

11.2 Calcular del coeficiente de correlación estadísticamente y determinar la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.

11.3 Interpolar los valores de las áreas de los picos de las muestras en la curva de calibración de los estándares de diclofenaco

11.4 En caso de que alguna muestra presente analitos en concentraciones mayores a los ámbitos de la curva de calibración, se preparará una nueva curva de calibración que cubra el intervalo de concentración del analito en la muestra o se diluirá el extracto.

**11 PROCEDIMIENTO**

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	M.C. MARTHA AVILES FLORES			Revisó:	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			Aprobó:	Hoja 4 de 7
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

11.1 Establecer las condiciones de operación del equipo cromatógrafo de líquidos (Temperatura ambiente 27°C).

**TABLA 1.** Condiciones cromatográficas

COLUMNA	THERMO de 250 x 4.6mm y 5µm de espesor
DETECTOR	UV/Vis
FASE MOVIL	Solución de acetatos pH 4.6 ± 0.1 Metanol (96:4) V/V
FLUJO	1 ml/minuto
LONGITUD DE ONDA	228 nm
VOLUMEN DE INYECCION	100 µL
TIEMPO DE RETENCION	8.39 ± 1.0 min

11.2 A partir de la disolución madre detallada en la sección 6.1.1 preparar las disoluciones para la curva de calibración y leer mínimo tres lecturas.

11.3 En cada lote de 8 muestras incluir un blanco, duplicado de muestra, un estándar de concentración conocida de la disolución madre, una muestra fortificada.

11.4 Criterios de aceptación. El coeficiente de correlación de la curva debe tener un valor dentro del intervalo 0.98-0.99 y el porcentaje de variación entre duplicados no debe ser mayor del 10%.

11.5 Neutralizar con hidróxido de sodio concentrado grado industrial a pH ≤ 7 todos los desechos que se generan entre inyección e inyección de cada una de las muestras de agua analizadas.

**12. FORMATOS**

No aplica.

**13. BIBLIOGRAFÍA**

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	M.C. MARTHA AVILES FLORES			Revisó:	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			Aprobó:	Hoja 5 de 7
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

Alam G.Trovo, Ana Agüera, Amadeo R. Fernández, Alba Sixto Malato, Raquel F. Pupo Nogueira. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-fenton process – chemical and toxicological assessment. *Water Research*, 2011;45, 1394-1402.

Arash Khoddam, Alireza Shafaati, Afshin Zarghi, Hoomam Movahed, Seyed Mohsen Foroutan. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2007; 45, 531-534.

Antonio Marzo, Lorenzo Dal Bo, Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of Chromatography A*, 1998; 812, 17-34.

A. Orriols, E. García Montoya, J.M Suñe-Negre, J.R Tico, M. Miñarro, P. Pérez-Lozano, Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring products through a new HPLC analytical method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006; 42, 192-199.

Bruce G. Charles, Suvatna Chulavatnatol, High- Performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in urine using solid phase, ion pair extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, 1993; 615, 91-96.

Carlos Guerrero, Elbert Hogendoorn, Elena Pytarch, Félix Hernández, Juan V. Sancho, María Ibáñez, Oscar J. Pozo, Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006; 1103, 83-93.

Chuangji Liu, Hai Wang, Yanbin Jiang Zhenxia Du. Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2011; 879, 533-540.

C. De Sena, E. Ciranni Signoretti, L. Giannetti, L. Valvo, R. Alimenti, R. Draisci, S. Alimonti, Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997; 15, 487-493.

Chia-Yang Chen, Lloyd R. Wilson, Patrick M. Palmer, Patrick O'Keefe, Robert Sheridan, Thomas King, Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. *Science of the Total Environment*, 2008; 394, 90-102.

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	Revisó:			Aprobó:				Hoja 6 de 7	
M.C. MARTHA AVILES FLORES	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS					

Forma: CR-03

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD  
**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO**

AREA: COMPUESTOS ORGÁNICOS

TEMA: DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUA POR HPLC

D.R. El-Wasseef, F. Belal, M. M. El-Kerdawy, S. M El-Ashry, Kinetic Spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. *IL Fármacos*,. 2000; 55, 680-686.

E. Benito Peña, J. L Urraca, M. C. Moreno-Bondi, Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*., 2009; 49, 289-294.

Edgar Nägele, Ralf Moritz, Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF. *J.Am Soc Mass Spectrom*, 2005; 16, 1670-1676.

Georgios Batzias, Georgios Delis, Georgios Kounenis, Maria Koutsoviti- Papadopoulou, Application and validation of LC/fluorescence method for the determination of amoxicillin in sheep serum and tissue cage fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*., 2009; 49, 375-380.

Gan Zhang, Shi-Chun Zou, Wei-hai Xu, Xiang-dong Li, Yu-chun Liu, Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using High-Performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*., 145, 672-679.

Hie-Joon Kim, Jong- Sei Park, Kyung-Hwan Yoon, So-Young Lee, Won Kim, Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC-ESI mass spectrometry. *Journal of chromatography B*,. 2004; 813, 121-127.

M. A. Brooks, T. L. Lee, High- Performance liquid chromatography determination of amoxicillin in human plasma using a bonded-phase extraction. *Journal of Chromatography*, 1984; 306, 429-435.

María Elena Benito Peña, María Cruz Moreno Bandi, 2006. "Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular, para la determinación de antibióticos  $\beta$ - lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medio ambiental" Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias químicas, Madrid, España.

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, 2002 "Guía de Validación de Métodos Analíticos" México. DF.

Fecha de edición:	D	M	A	Sustituye a:	D	M	A	Revisión:	Clave:
	01	12	2011		01	12	2011	06	
Elaboró:	M.C. MARTHA AVILES FLORES			Revisó:	M.I. MANUEL SANCHEZ ZARZA			Aprobó:	Hoja 7 de 7
								M. en C. NORMA RAMÍREZ SALINAS	

Forma: CR-03