

Análisis multirresiduo de fármacos de uso veterinario en hígado de bovino mediante LC/MS/MS

Sistema Bond Elut QuEChERS
Extracción mejorada en matriz de lípidos

Nota de aplicación

Agricultura y análisis de alimentos

Autores

Limian Zhao, Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

El sistema Bond Elut QuEChERS con extracción mejorada en matriz de lípidos (EMR-Lipid) de Agilent es la nueva generación en productos de preparación de muestras y está disponible en una práctica extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Este material presenta una elevada selectividad hacia a la matriz extraída simultáneamente, especialmente la que procede de muestras grasas (contenido en grasa > 5 %) sin afectar negativamente a la recuperación de los analitos. Este estudio demuestra la aplicación de este nuevo producto en el análisis de 30 fármacos de uso veterinario en hígado de bovino. El procedimiento implica una extracción con precipitación de proteínas rápida y eficaz mediante acetonitrilo acidificado, seguido por el uso de la dSPE con EMR—Lipid y un kit de pulido para una limpieza adicional. La cantidad de matriz extraída mediante el protocolo EMR-Lipid se determinó mediante el peso de las sustancias extraídas simultáneamente y los experimentos de infusión postcolumna. En comparación con otros productos para limpiar la matriz, la dSPE con EMR—Lipid proporciona una extracción de la matriz más eficaz y mejor recuperación de los analitos. El método EMR—Lipid optimizado proporciona una limpieza superior, así como exactitud y precisión excelentes para los 30 fármacos de uso veterinario en todos los niveles, proporcionando un análisis rápido, sólido y eficaz de muestras grasas.



Agilent Technologies

Introducción

Los fármacos de uso veterinario se utilizan ampliamente en animales en el sector de producción de alimentos para luchar contra las enfermedades, o para fomentar el crecimiento. Estos fármacos se acumulan en los tejidos animales, y un uso inadecuado puede producir la acumulación de residuos de fármacos en tejidos comestibles, lo que supone un riesgo conocido para la salud humana. Dado que la seguridad alimentaria cada vez es más importante, casi todos los países han implantado normativas para limitar los fármacos utilizados en la producción de animales para consumo [1-4].

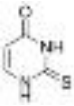
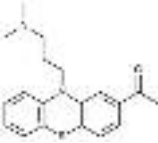
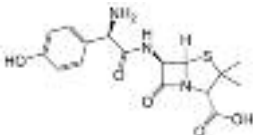
Los alimentos de origen animal tales como músculo, hígado y huevos suelen ser complejos desde el punto de vista químico y, por tanto, es muy importante aplicar un método eficaz para la preparación de muestras que incluya una extracción general y una limpieza eficiente. Los métodos establecidos para la preparación de muestras incluyen las técnicas tradicionales de extracción en disolvente, extracción en fase sólida (SPE), o una combinación de varias técnicas. Estos métodos suelen requerir bastantes recursos humanos, son laboriosos, solamente son adecuados para unas pocas clases de compuestos, y requieren el desarrollo de métodos adicionales.

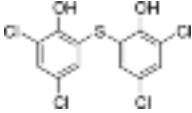
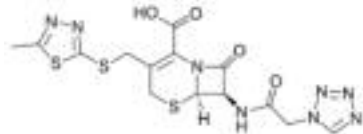
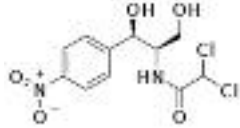
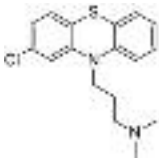
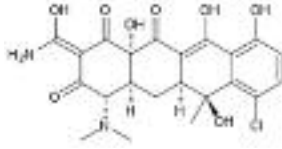
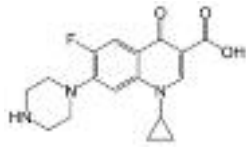
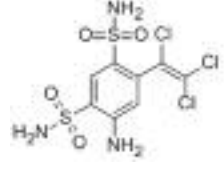
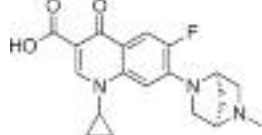
Los métodos multiclase y multiresiduo cada vez aparecen con más frecuencia en los programas de monitorización normativa debido a su creciente alcance analítico y eficiencia del laboratorio. El número de fármacos de uso veterinario monitorizados ha aumentado en los últimos años, y en la actualidad se informa de más de 100 fármacos [5-8]. El pretratamiento de las muestras suele implicar extracción con una mezcla de acetonitrilo:agua, seguido por una limpieza con C18, otras técnicas de limpieza o ambos. Los absorbentes como C18 solamente proporcionan una eliminación limitada de los lípidos extraídos simultáneamente, lo que puede dar como resultado la precipitación en la muestra final tras la dilución o

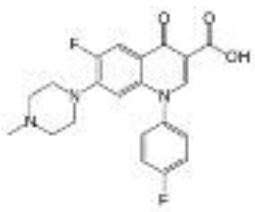
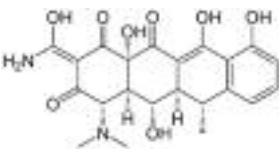
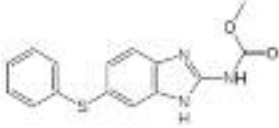
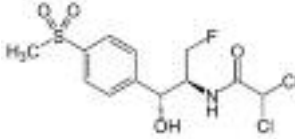
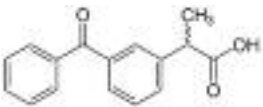
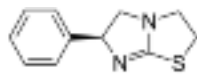
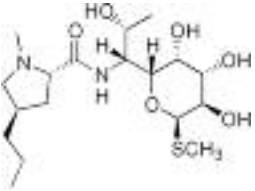
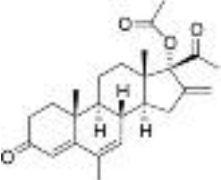
la reconstitución. La formación de un precipitado requiere la filtración de la muestra antes de la inyección en el equipo de LC/MS/MS, y puede ocasionar la pérdida de analitos. Se puede añadir hexano durante la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) para eliminar los lípidos extraídos simultáneamente, pero esta operación no es selectiva, es laboriosa, y extrae analitos hidrofóbicos. El uso de materiales absorbentes de circonio en la limpieza proporciona una limpieza de la matriz mejorada en comparación con C18, pero también da como resultado más pérdida de analitos, especialmente en el caso de compuestos que contienen ácido carboxílico e hidroxilo, tales como fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos [7,8].

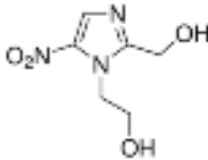
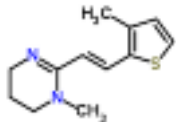
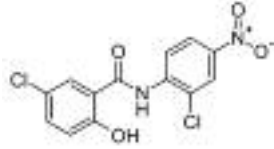
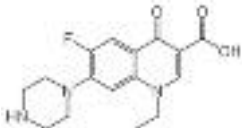
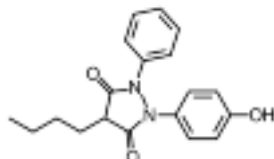
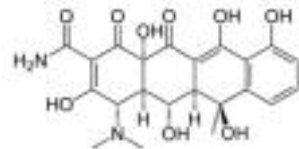
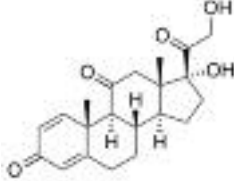
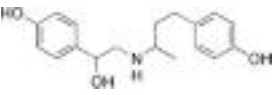
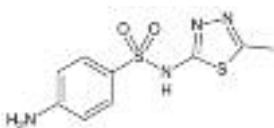
El sistema Bond Elut QuEChERS con extracción mejorada en matriz de lípidos (EMR—Lipid) de Agilent es un nuevo material absorbente que elimina selectivamente las principales clases de lípidos de la muestra sin una retención de analitos indeseada. La eliminación de interferencias lipídicas de las matrices complejas es especialmente importante en técnicas tales como QuEChERS y precipitación de proteínas. Puesto que estos sencillos métodos de preparación de muestras no pueden extraer un porcentaje de lípidos elevado, las sustancias extraídas simultáneamente permanecerán en el extracto final de la muestra junto con analitos objetivo. Esto ocasiona anomalías cromatográficas, escasa exactitud y precisión de los datos, y mayores problemas de mantenimiento. En este estudio hemos investigado un abordaje nuevo para la preparación de muestras en el análisis de 30 fármacos de uso veterinario en hígado de bovino, representativos y que suponen un desafío, usando una extracción sencilla con precipitación de proteínas seguido de limpieza mediante EMR-Lipid. Los fármacos de uso veterinario representan 17 clases diferentes, incluyendo fármacos hidrofílicos a hidrofóbicos, ácidos, neutros y básicos. La Tabla 1 muestra información química y normativa acerca de estos fármacos de uso veterinario.

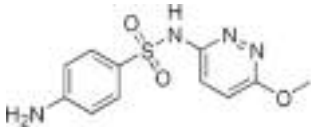
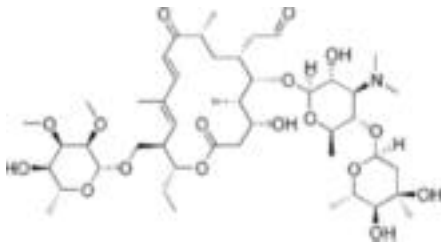
Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los fármacos de uso veterinario.

Nombre	Clase de fármaco	Log P	pKa	Fórmula molecular	Estructura	Tolerancia en EE.UU. (µg/g)
2-Tiouracilo	Thyreostat	-0,28	7,75	C ₄ H ₄ N ₂ OS		N.A
Acetopromazina	Tranquilizante	3,49	9,3	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S		N.A
Amoxicilina	β-Lactama	0,86	2,4	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		0,01

Nombre	Clase de fármaco	Log P	pKa	Fórmula molecular	Estructura	Tolerancia en EE.UU. (µg/g)
Bitionol	Fluquicida	5,51	4,82	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$		N.A
Cefazolina	Cefalosporina	-1,5	2,3	$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$		N.A.
Cloramfenicol	Fenicol	1,14	5,5	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$		(c)
Clorpromazina	Tranquilizante	5,20	9,3	$C_{17}H_{19}ClN_2S$		N.A
Clortetraciclina	Tetraciclina	0,24	3,3, 7,4, 9,3	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$		2 (d)
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona	0,28	6,09, 8,74	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$		(c)
Clorsulon	Fluquicida	1,25	—	$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$		0,1 (e)
Danofloxacina	Fluoroquinolona	1,2	6,04	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$		0,02 (a, e)

Nombre	Clase de fármaco	Log P	pKa	Fórmula molecular	Estructura	Tolerancia en EE.UU. (µg/g)
Difloxacina	β -Lactama	2,78	5,85	$C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$		N.A.
Doxiciclina	Tetraciclina	-0,54	3,4	$C_{22}H_{24}N_2O_8$		N.A
Fenbendazol	Antihelmíntico	3,75	10,27	$C_{15}H_{13}N_3O_2S$		0,4 (e, h), 2 (b)
Florfenicol	Fenicol	-0,12	10,73	$C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$		0.2 (b)
Ketoprofeno	Tranquilizante	2,81	3,88	$C_{16}H_{14}ClN_3S$		N.A
Levamisol	Antihelmíntico	1,85	8,0	$C_{11}H_{12}N_2S$		0,1 (e)
Lincomicina	Lincosamida	0,91	7,8	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$		0,1(b)
Acetato de melengesterol (MGA)	Otro	4,21	11,42	$C_{25}H_{32}O_4$		0,025 (g)

Nombre	Clase de fármaco	Log P	pKa	Fórmula molecular	Estructura	Tolerancia en EE.UU. (µg/g)
Metonidazol-OH	Nitroimidazol	-0,81	3,09	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄		(c)
Morantel	Antihelmíntico	1,97	>12	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S		N.A
Niclosamida	Fluquicida	5,41	5,6	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₄		N.A
Norfloxacina	Fluoroquinolona	0,82	6,32	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(c)
Oxifenilbutaza	AINE	2,72	4,87	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃		N.A
Oxitertraciclina	Tetraciclina	-1,5	3,27	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉		2 (d)
Prednisona	Corticoesteroide	1,57	12,58	C ₂₁ H ₂₆ O ₅		N.A
Ractopamina	β-Agonista	1,65	9,4	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃		0,03 (e)
Sulfametizol	Sulfonamida	0,51	5,45	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂		N.A

Nombre	Clase de fármaco	Log P	pKa	Fórmula molecular	Estructura	Tolerancia en EE.UU. (µg/g)
Sulfametoxipiridazina	Sulfonamida	0,32	6,7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S		N.A
Tilosina	Macrólido	3,27	7,7	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇		0,2 (f)

a Tolerancia en hígado de ganado vacuno (para tulatromicina, se ha establecido un marcador del residuo)

b Tolerancia en músculo porcino

c Prohibido para uso fuera de sus indicaciones

d Tolerancia es la suma de residuos de tetraciclina incluyendo clortetraciclina, oxitetraciclina, y tetraciclina en el músculo

e Tolerancia en el músculo de ganado vacuno

f Tolerancia en grasa, músculo, hígado y riñón de ganado vacuno sin cocinar

g Tolerancia en grasa de ganado vacuno

h Tolerancia en el músculo de cabra

Experimento

Todos los reactivos y disolventes fueron de calidad HPLC o calidad analítica. El acetonitrilo (ACN) era de Honeywell (Muskegon, MI, EE.UU.). El dimetilsulfóxido (DMSO), los patrones de fármacos de uso veterinario y los patrones internos eran de Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, EE.UU.). El ácido fórmico (FA) de calidad reactivo era de Agilent (ref. G2453-86060). El acetato de amonio (NH₄OAc) era de Fisher Chemicals (Fair Lawn, NJ, EE.UU.).

Disoluciones y patrones

Se preparó ácido fórmico (5 %) en acetonitrilo por adición de 5 ml de ácido fórmico a 95 ml de ACN reciente. La disolución madre de acetato de amonio (1 M) se preparó disolviendo 19,27 g de NH₄OAc en 250 ml de agua Milli-Q. La disolución se almacenó a 4 °C. Se preparó una solución de acetato de amonio 5 mM en agua por adición de 5 ml de disolución madre de acetato de amonio 1 M a 1 l de agua Milli-Q.

Las disoluciones madre de patrón y de patrón interno (PI) se prepararon en DMSO a 2,0 mg/ml, excepto en el caso de la disolución madre de danofloxacina en DMSO (a 1,0 mg/ml) y la disolución madre de ciprofloxacina en DMSO (a 0,25 mg/ml). Las disoluciones madre de amoxicilina y cefazolina se prepararon en agua a 2,0 mg/ml. Todas las disoluciones madre se prepararon en viales de vidrio ámbar, salvo para las disoluciones madre de

amoxicilina y cefazolina, en las que se usaron viales de plástico. Todas las disoluciones madre se almacenaron a -20 °C. Los 30 compuestos se distribuyeron en dos grupos, G1 y G2, en función de la respuesta del instrumento. Se preparó una disolución de trabajo de patrón de 25/5 µg/ml (G1/G2) 1/1 en ACN/agua 1/1. La disolución de trabajo de PI Flunixin-d₃ (25 µg/ml) se preparó en ACN/agua 1/1.

Equipo

El equipo y el material utilizados en la preparación de muestras incluyó:

- Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, EE.UU.)
- Centrífuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, EE.UU.)
- Microcentrífuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EE.UU.)
- Vortizador y vortizador multitubo (VWR, Radnor, PA, EE.UU.)
- Dispensador vertical para viales, (VWR, So. Plainfield, NJ, EE.UU.)
- Pipetas y repetidor Eppendorf
- Tubos Bond Elut EMR—Lipid de Agilent (ref. 5982-1010) y tubos para pulido final Bond Elut para extracción mejorada en matriz de lípidos (ref. 5982-0101)

Instrumentación

El análisis se llevó a cabo en un sistema LC Agilent 1290 Infinity que incluía:

- Bomba cuaternaria Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Muestreador automático de alto rendimiento Agilent 1290 Infinity (G4226A) provisto de un termostato Agilent 1290 Infinity (G1330B), y un compartimento termostatzado de columna Agilent 1290 Infinity (G1316C)

El sistema UHPLC se acopló a un sistema de LC/MS de triple cuadrupolo Agilent 6490 provisto de una fuente de ionización por electrospray Agilent Jet Stream y tecnología iFunnel. Se utilizó el software de estación de trabajo MassHunter de Agilent para adquisición y análisis de datos.

Condiciones del instrumento

Condiciones de HPLC

Columna:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 mm, 2,7 µm (ref. 693775-902), precolumna Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC, 2,1 × 5 mm, 2,7 µm (ref. 821725-911)		
Fase móvil:	A) FA al 0,1 % en agua B) FA al 0,1 % en acetonitrilo		
Velocidad de flujo:	0,3 ml/min		
Temp. columna:	40 °C		
Temp. del muestreador automático:	4 °C		
Vol. iny.:	3 µl		
Lavado de la aguja:	ACN:MeOH:IPA:H ₂ O 1:1:1:1 con FA al 0,2 %		
Gradiente:	Tiempo (min)		
	%B		
	0	10	
	0,5	10	
	8,0	100	
Tiempo de parada:	12 min		
Tiempo posterior:	3 min		

Condiciones, MS

Modo positivo/negativo

Temp. gas:	120 °C
Flujo de gas:	14 l/min
Nebulizador:	40 psi
Calentador del gas de impulsión	400 °C
Flujo de gas de impulsión:	12 l/min
Capilar:	3.000 V

Parámetros de iFunnel:	Positivo	Negativo
RF de alta presión	90 V	90 V
RF de baja presión	70 V	60 V

Las condiciones de monitorización dinámica múltiple de la reacción (DMRM) por MS relativas a los analitos se relacionan en la Tabla 2. En la Figura 1 se muestra un cromatograma típico.

Preparación de muestras

El procedimiento final de preparación de muestras se optimizó con las siguientes etapas.

1. Pese 2 g (±0,1 g) de hígado de bovino homogéneo en un tubo de centrifuga de 50 ml.
2. Añada 10 ml de acetonitrilo acidificado (que contiene FA al 5 %).
3. Mezcle las muestras en un agitador mecánico durante 2 min.
4. Centrifugue a 5.000 rpm durante 5 min.
5. Añada 5 ml de tampón acetato de amonio (5 mM) a un tubo de dSPE EMR-Lipid de 15 ml.
6. Transfiera 5 ml de sobrenadante a un tubo de EMR—Lipid.
7. Mezcle en vórtex inmediatamente para dispersar la muestra, seguido de 60 s de mezclado en una mesa de vortización multiposición.
8. Centrifugue a 5.000 rpm durante 3 min.
9. Transfiera 5 ml de sobrenadante a un tubo EMR—Lipid pulido de 15 ml que contenga 2 g de sales (NaCl:MgSO₄ 1:4), y mezcle en vórtex durante 1 min.
10. Centrifugue a 5.000 rpm durante 3 min.
11. Combine 200 µl de la capa sobrenadante de ACN con 800 µl de agua en un vial de muestras de 2 ml y mezcle en vórtex.

Tabla 2. Parámetros de LC/MS/MS DMRM y tiempos de retención para los analitos diana.

Analito	TR (min)	Delta TR (min)	Polaridad	Ión precursor (<i>m/z</i>)	Ión producto			
					Ión de cuantificación	CE (V)	Ión de cualificación	CE (V)
2-Tiouracilo	1,41	2	Negativo	127	57,9	17	—	—
Amoxicilina	1,84	2	Positivo	366,1	349,2	5	114	25
Metonidazol-OH	2,07	2	Positivo	188,1	123,1	9	126,1	13
Levamisol	3,4	2	Positivo	205,1	178,1	21	91,1	41
Lincomicina	3,35	2	Positivo	407,2	126,1	37	70,1	80
Norfloxacina	4,22	2	Positivo	320,1	302,2	21	276,1	17
Oxitetraciclina	4,24	2	Positivo	461,2	426,1	17	443,2	9
Ciprofloxacina	4,31	2	Positivo	332,1	231	45	314,3	21
Danofloxacina	4,42	2	Positivo	358,2	340,2	21	81,9	53
Ractopamina	4,4	2	Positivo	302,2	107	33	77	77
Morantel	4,9	2	Positivo	221,1	123,1	37	76,9	80
Cefazolina	4,65	2	Positivo	455	323,1	9	156	13
Sulfametizol	4,65	2	Positivo	271	156,1	13	92	29
Sulfametoxipiridazina	4,69	2	Positivo	281,1	92	33	65,1	57
Difloxacina	4,83	2	Positivo	400,2	382	25	356,3	17
Clortetraciclina	5,11	2	Positivo	479,1	444,2	21	462,1	17
Doxiciclina	5,24	2	Positivo	445,2	428,1	17	410,2	25
Florfenicol	5,47	2	Negativo	300,1	268,1	25	159,1	41
Cloranfenicol	5,68	2	Negativo	321	152	17	257,1	9
Tilosina	5,85	2	Positivo	916,5	173,9	45	772,5	33
Closulon	5,86	2	Negativo	377,9	341,9	9	—	—
Prednisona	5,88	2	Positivo	359,2	147,2	33	341,2	9
Acetopromizina	5,93	2	Positivo	327,2	86	21	58	45
Clorpromazina	6,49	2	Positivo	319,1	86	21	58,1	45
Fenbendazol	6,77	2	Positivo	300,1	268,1	25	159,1	41
Ketoprofeno	6,8	2	Positivo	255,1	208,9	13	77	57
Oxifenbutazona	7,27	2	Negativo	323,1	133,9	25	295	17
Flunixinina-d ₃ (NEG)	7,53	2	Negativo	298,1	254,2	17	192	37
Flunixinina-d ₃ (POS)	7,53	2	Positivo	300,1	282	25	264	41
Acetato de melengestrol	8,78	2	Positivo	397,2	337,4	13	279,2	21
Niclosamida	8,82	2	Negativo	325	170,9	25	289,1	13
Bitionol	9,49	2	Negativo	352,9	161	21	191,8	25

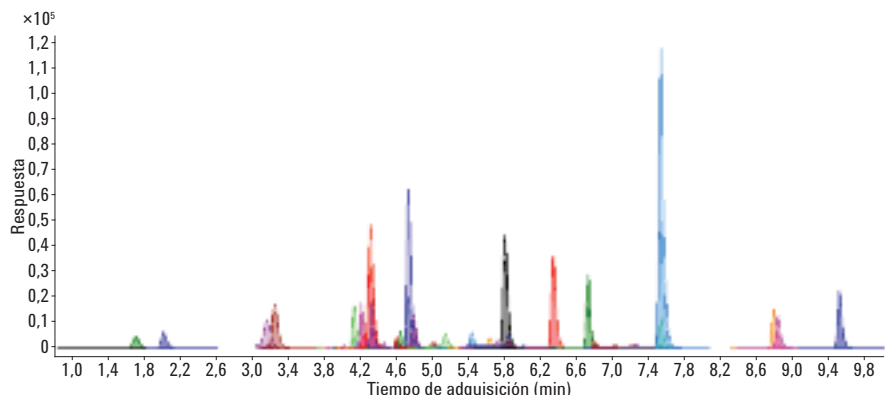


Figura 1. Cromatograma LC/MS/MS (DMRM) típico de una muestra de hígado de bovino reforzada con 50 ng/g de patrón de fármaco de uso veterinario y extraída mediante precipitación de proteínas seguido por limpieza con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent.

La muestra ya estará lista para el análisis de LC/MS/MS. El flujo de trabajo completo para preparación de muestras se muestra en la Figura 2.

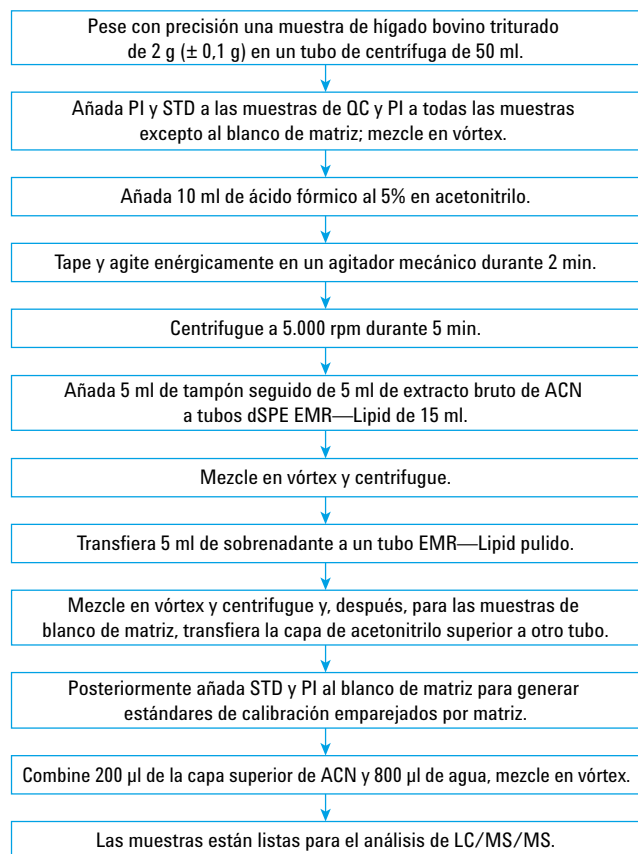


Figura 2. Procedimiento para la preparación de muestras usando Bond Elut EMR—Lipid de Agilent para el análisis de fármacos de uso veterinario en hígado de bovino.

Patrones de calibración y muestras de control de calidad

Muestras de control de calidad (QC) previamente marcadas se reforzaron adecuadamente con la disolución de trabajo combinada normalizada, después de la etapa 1, para seis réplicas. Para los analitos G1, las muestras de QC correspondieron a 10, 50, 250, y 750 ng/g en hígado. Para los analitos G2, las muestras de QC correspondieron a 2, 10, 50, y 150 ng/g en hígado. La disolución de PI también se introdujo en todas las muestras, salvo el blanco de matriz, correspondiente a 200 ng/g de flunixin-d₃ en hígado.

Se prepararon patrones de calibración emparejados por matriz con disoluciones de trabajo de patrón y de PI. Las concentraciones adecuadas en las muestras del blanco de matriz después de la etapa 8 corresponden a 5, 25, 50, 250, 750, y 1.000 ng/g en hígado (G1), o 1, 5, 10, 50, 150, y 200 ng/g en hígado (G2), y 200 ng/g de PI en el hígado.

Determinación de la cantidad de sustancias extraídas simultáneamente

La cantidad de sustancias extraídas simultáneamente se determinó por medida gravimétrica [7] realizada para tres técnicas de limpieza diferentes: C18, absorbente de circonio, y EMR—Lipid. Las muestras se prepararon de la siguiente forma.

1. Caliente los tubos de vidrio durante ~ 1 h a 110 °C para eliminar la humedad.
2. Enfríe los tubos a temperatura ambiente.
3. Tare los tubos.
4. Transfiera con precisión 1 ml del extracto inicial de blanco de matriz (sin limpieza) y de los blancos de matriz sometidos a las diferentes técnicas de limpieza, por duplicado.
5. Seque todas las muestras en un equipo CentriVap a 50 °C durante 1 h o hasta sequedad.
6. Caliente los tubos durante ~ 1 h a 110 °C para eliminar la humedad.
7. Enfríe los tubos a temperatura ambiente.
8. Vuelva a pesar los tubos.

La diferencia de peso después de la etapa 8 y después de la etapa 3 es la cantidad de muestra extraída simultáneamente. La cantidad de sustancias extraídas simultáneamente mediante la limpieza es la diferencia del peso promedio entre las sustancias extraídas simultáneamente de la matriz antes y después de la limpieza.

Evaluación del efecto de la matriz

El efecto de la matriz cromatográfica se evaluó mediante un experimento de infusión postcolumna. Las muestras de blanco de matriz se inyectaron con infusión postcolumna simultánea de una disolución de patrón puro de fármaco de uso veterinario de 10 partes por billón (ppb) a 60 µl/min. Todas las transiciones de compuestos se monitorizaron durante la totalidad del ciclo de LC.

Adicionalmente, se comparó la respuesta del analito (área de pico) entre los extractos de hígado después del marcado y las disoluciones originales equivalentes. Los extractos de hígado después del marcado se prepararon introduciendo disolución de patrón normalizada en el extracto de blanco de matriz de hígado. La diferencia en la respuesta (área de pico) se correlaciona directamente con los efectos de la matriz.

Optimización, validación y comparación de los métodos

Se evaluaron diferentes ensayos de optimización, FA al 5 % en ACN comparado con FA al 1 % en ACN para la precipitación de proteínas, tampón acetato de amonio comparado con agua para la limpieza con EMR—Lipid, y también ensayos incluyendo y sin incluir sales de pulido tras la limpieza con EMR—Lipid. Los resultados se evaluaron en función de la recuperación de los analitos, la precisión y otros parámetros de cuantificación. El método optimizado final se validó, a continuación, analizando un lote de cuantificación completo con patrones de curva de calibración por duplicado incluidos en todas las muestras de QC.

Se recogieron los datos de comparación de la recuperación en las muestras de hígado antes y después del marcado a 50 ng/g. A continuación, los extractos se procesaron con protocolos de limpieza aceptables. Para el protocolo EMR—Lipid con precipitación de proteínas, se utilizó el procedimiento de limpieza descrito en la Figura 2. Para QuEChERS, se utilizó limpieza dSPE usando C18 o absorbente de circonio.

1. Pese 2 g de hígado en un tubo de 50 ml.
2. Añada 8 ml de tampón fosfato (pH 7,0) y 10 ml de ACN acidificado (FA al 5 %).
3. Mezcle en vórtex durante 30 s.
4. Añada sales EN para reparto/extracción, y agite energicamente en un agitador mecánico.
5. Centrifugue a 5.000 rpm durante 5 min.

El extracto de hígado en ACN bruto usado en la limpieza adicional se preparó de la siguiente forma.

1. Añada 1 ml de extracto de hígado en ACN bruto a un vial de 2 ml que contenga 25 mg de C18 y 150 mg de MgSO₄ (ref. 5982-4921), o a un vial de 2 ml que contenga 100 mg de absorbente de circonio.
2. Tape y mezcle en vórtex durante 1 min.
3. Centrifugue a 13.000 rpm durante 3 min (microcentrifuga).
4. Transfiera 200 µl de sobrenadante a otro vial que contenga 800 µl de agua.
5. Mezcle en vórtex y filtre con un filtro de celulosa regenerada de 0,45 µm.

Las muestras están listas para el análisis de LC/MS/MS. La recuperación se calculó a partir del cociente entre las áreas de pico del analito de las muestras antes y después del marcado.

Resultados y debate

Cantidad de sustancias extraídas simultáneamente

La Tabla 3 muestra los resultados del ensayo gravimétrico de la muestra de sustancias extraídas simultáneamente, que demuestra claramente que la dSPE con EMR—Lipid proporciona la mejor eficiencia de limpieza de la matriz por peso que la dSPE con C18 o absorbente de circonio.

Tabla 3. Resultados gravimétricos para la extracción simultánea de la matriz de hígado bovino obtenidos con la limpieza mediante el sistema Agilent Bond Elut para extracción mejorada en matriz, circonio y C18.

Técnica de limpieza	Eficiencia de extracción de	
	Sustancias extraídas simultáneamente por 1 ml de extracto final en ACN (mg) (n=2)	la sustancias de la matriz que se extraen simultáneamente según la limpieza (%)
Sin limpieza adicional	12,1	—
dSPE con EMR—Lipid	5,3	56,2
Separación mediante circonio con dSPE	6,0	50,4
dSPE con C18	7,8	35,5

Evaluación del efecto de la matriz

Se utilizó la infusión postcolumna (PCI) de los patrones de fármaco de uso veterinario para la evaluación de los efectos de la matriz en los extractos de ACN bruto y en tres extractos de ACN finales limpios mediante EMR—Lipid, C18, y absorbente de circonio. Todos los analitos se monitorizaron durante la totalidad del ciclo de LC. Los cromatogramas PCI reflejan el impacto de la matriz para los analitos monitorizados en modo positivo y negativo. El extracto de ACN final no se diluyó antes de la inyección, y el ACN se inyectó directamente. Los perfiles de PCI se muestran en la Figura 3.

Como se muestra en la traza roja, se observaron una supresión de la matriz (línea base inferior) y una potenciación de la matriz (picos grandes) significativas con la inyección del blanco de la matriz de hígado bruto sin ningún tipo de limpieza. Estos efectos de la matriz tienen efectos fuertemente negativos sobre la fiabilidad del método y la calidad de los datos. En comparación, como se muestra en la traza azul, el uso de la limpieza con EMR—Lipid proporcionó mejoras significativas, tal como se observa mediante una supresión y potenciación de la matriz reducida.

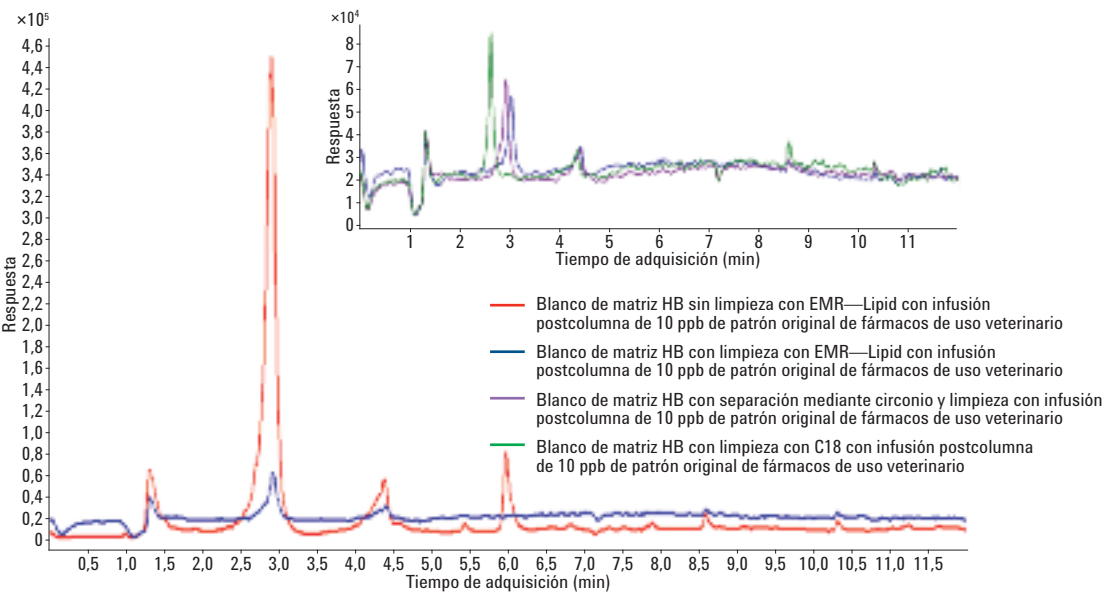


Figura 3. Perfiles de infusión postcolumna generados tras la inyección de una muestra de blanco de matriz de hígado de bovino (HB) con infusión postcolumna simultánea de 10 ppb de disolución de patrón de fármaco de uso veterinario. Todos los analitos se monitorizaron para el análisis cromatográfico, y el perfil fue un cromatograma de ion total combinado de todas las transiciones de analito monitorizadas.

El cromatograma insertado en la Figura 3 muestra los perfiles PCI con la inyección de las muestras de blanco de matriz usando diferentes tipos de limpieza. Los perfiles de EMR—Lipid (azul) y absorbente de circonio (púrpura) son similares. El perfil de limpieza con C18 (verde) también muestra similitud con los otros dos, pero se observaron más regiones con potenciación y supresión de la matriz. Esta comparación corresponde a la de la evaluación gravimétrica de las sustancias extraídas simultáneamente, en la que la limpieza con EMR—Lipid proporciona una eficacia de limpieza ligeramente superior al absorbente de circonio, y ambos proporcionan una eficacia de limpieza superior a C18.

También se usaron las comparaciones de la respuesta del analito entre las muestras de matriz después del marcado y los patrones puros para evaluar el efecto de la matriz. En la mayoría de los analitos no se produjeron diferencias significativas en las respuestas al analito. Sin embargo, para los compuestos que eluyen más tarde, que son más hidrofóbicos, se observó más supresión iónica de la matriz en las muestras limpias mediante C18 y absorbente de circonio. Puesto que la mayoría de interferencias lipídicas eluyen tarde, la reducida supresión iónica de la matriz en los analitos hidrofóbicos confirma que EMR—Lipid elimina eficientemente los lípidos extraídos simultáneamente en comparación con la dSPE con C18 y absorbente de circonio. La Figura 4 muestra dos ejemplos de cómo la limpieza con EMR—Lipid redujo los efectos de supresión iónica de la matriz.

Optimización del método

También se investigó el disolvente usado en la etapa de precipitación de proteínas. Se sabe que el acetonitrilo precipita proteínas eficientemente para una relación entre la muestra y la sustancia orgánica de 1:3 a 1:5, y el acetonitrilo acidificado ofrece más precipitación de proteínas. El hígado de bobino es una matriz compleja, y la eliminación de proteínas es algo fundamental no solamente para eliminar la matriz, sino también para facilitar una limpieza eficiente con

EMR—Lipid. En este estudio, se evaluaron concentraciones de FA al 1 % y 5 % en ACN en la etapa de precipitación de proteínas seguido por la limpieza con EMR—Lipid y el análisis mediante LC/MS/MS. El uso de FA al 5 % en ACN proporcionó mejor precisión, como se muestra en las curvas de calibración (Figura 5). También se compararon las recuperaciones de analito y, de nuevo, el FA al 5 % en ACN proporcionó mejor precisión.

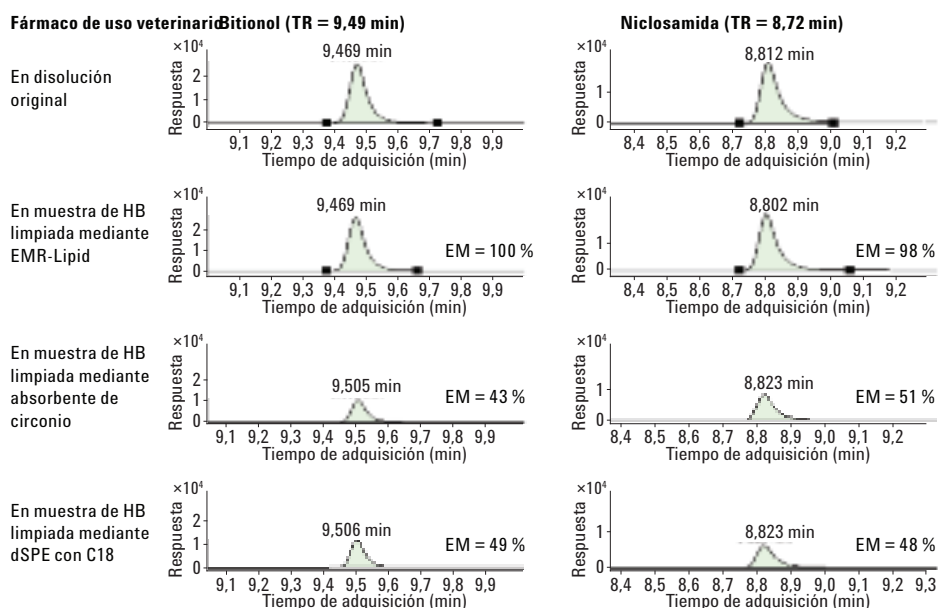


Figura 4. Efecto de supresión iónica de la matriz para analitos hidrofóbicos. El efecto de la matriz (EM) se calculó a partir de la relación del área de pico en extracto de hígado después del marcado y el correspondiente patrón puro.

Disolvente usado en la extracción con precipitación de proteínas

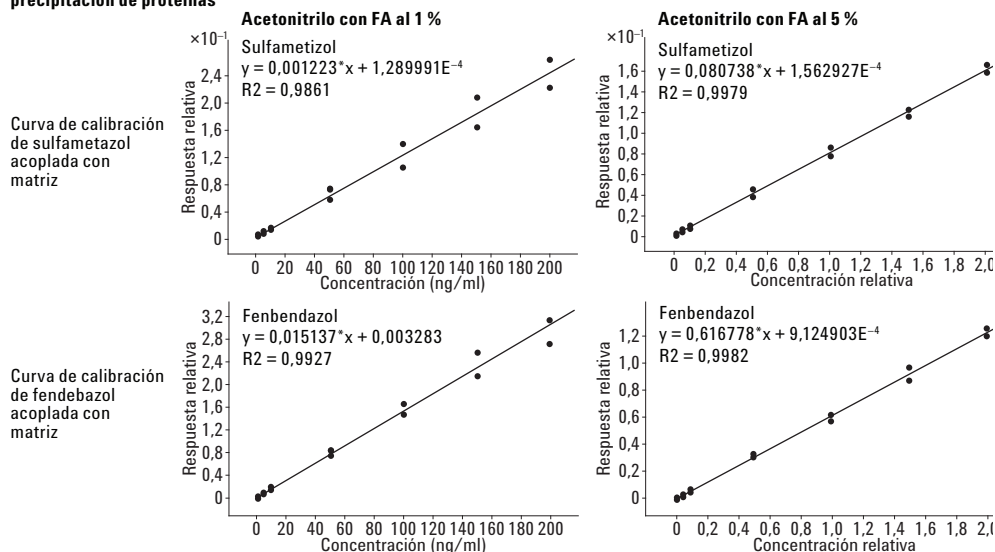


Figura 5. Comparación de la linealidad de la curva de calibración cuando se utiliza FA al 1 % en ACN con FA al 5 % en ACN para la precipitación de proteínas.

Es importante que se añada una cantidad de agua o tampón adicional para activar el material EMR-Lipid. Esto mejora su interacción con la matriz indeseada de la muestra, especialmente los lípidos, llevando a una eliminación eficiente de la matriz. Se investigó el efecto de usar un tampón acetato de amonio (5 mM) durante la limpieza con EMR—Lipid, y los resultados se compararon con los obtenidos usando agua. En general, el uso del tampón acetato de amonio mejoró muchas recuperaciones del analito del 5 al 10 %, salvo para las tetraciclinas.

Para estos compuestos, el uso del tampón dio como resultado recuperaciones un 5 % inferiores que con el uso de agua no tamponada. Se seleccionaron analitos con diferencias de recuperación evidentes entre el uso del tampón y del agua para su comparación en la Figura 6. Puesto que con el uso del tampón mejoraron las recuperaciones de más analitos, y que la pérdida ocasionada de la tetraciclina era mínima, se usó la disolución tampón acetato de amonio 5 mM durante el resto del estudio.

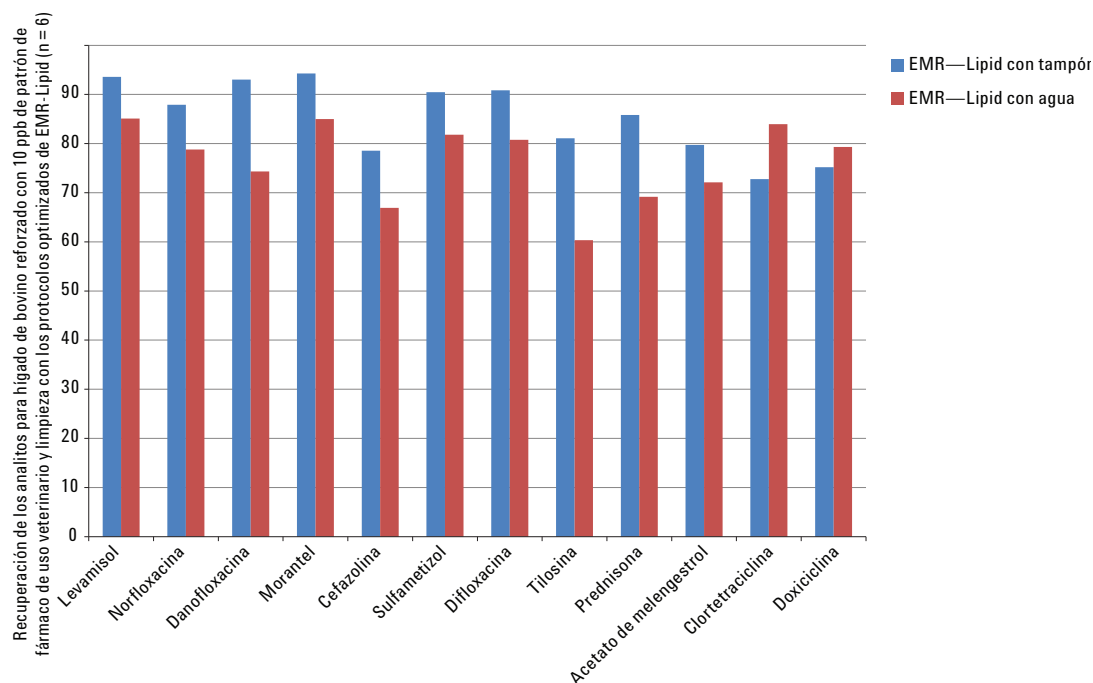


Figura 6. Comparación de la recuperación de los analitos cuando se usó tampón acetato de amonio 5 mM frente a agua en la etapa de limpieza mediante dSPE con extracción mejorada en matriz.

Tras la limpieza con EMR-Lipid, el sobrenadante es una mezcla acetronitrilo:agua 1:1. A continuación se transfirió una alícuota de 5 ml al tubo de pulido EMR—Lipid que contenía 2 g de mezcla de sales ($\text{MgSO}_4\cdot\text{NaCl}$ 4:1) para separar las fases orgánica y acuosa mediante separación salina. Esta etapa no solo separa sino que también facilita la limpieza adicional de la matriz y elimina los absorbentes y sales adicionales disueltos. Por tanto, ésta se recomienda tanto para el análisis por GC como para el análisis por LC. Durante el desarrollo de nuestro método, obtuvimos buenas recuperaciones de los analitos, así como una buena precisión, para todos los analitos salvo para las tetraciclinas. En una posterior investigación descubrimos que las bajas recuperaciones de las tetraciclinas (de 45 a 68 %) estaban relacionadas con la etapa de separación salina. Se investigó un protocolo alternativo (Figura 7) para reducir la pérdida de tetraciclina, que omite el uso de las sales de pulido EMR—Lipid. El procedimiento es similar, salvo que se mezclaron 400 µl del extracto (de la dSPE con EMR—Lipid) y 600 µl de agua en un vial de microcentrifuga, y se mezcló en vórtex durante un minuto sin esta etapa de pulido. Las muestras se centrifugaron en una microcentrifuga a 13.000 rpm durante tres minutos y, a continuación, el sobrenadante se transfirió a un vial de muestra de 2 ml para análisis mediante LC/MS/MS. Los patrones y el marcado posterior del blanco de matriz con el PI se realizaron antes de la etapa de mezclado/dilución. Se puede considerar que este protocolo es de no-separación, ya que no se utilizan sales de separación.

Los resultados de la Figura 8 demuestran claramente que las recuperaciones de las tetraciclinas se pueden mejorar sustancialmente con este protocolo alternativo. Sin embargo, los resultados del protocolo que usa el pulido (como se muestra en la Figura 2) para las tetraciclinas podrían ser aceptables, ya que la precisión es para la cuantificación. Las bajas recuperaciones se pueden corregir con el uso de un patrón interno marcado, estable y adecuado. En este estudio dividimos las muestras extraídas para el protocolo alternativo sin pulido tras la limpieza con EMR—Lipid, y se notificaron tres resultados para las tetraciclinas (oxitetraciclina, clortetraciclina, y doxiciclina) con el protocolo alternativo.

Comparación de métodos

A continuación se comparó el método EMR-Lipid optimizado con un método QuEChERS tradicional con limpieza dSPE con C18 y limpieza con absorbente de circonio. El método QuEChERS se utiliza frecuentemente para la extracción de analitos o residuos, y utiliza una etapa de limpieza dSPE. La Figura 9 muestra los resultados estadísticos de comparación de la recuperación, y la Figura 10 muestra la comparación para algunos analitos problemáticos seleccionados. El protocolo EMR—Lipid optimizado proporciona mejoras significativas en la recuperación y en la precisión de analitos problemáticos, especialmente en lo que respecta al absorbente de circonio, que proporciona bajas recuperaciones para las clases fluoroquinolona y tetraciclina. Solamente la oxitetraciclina y la niclosamida proporcionaron

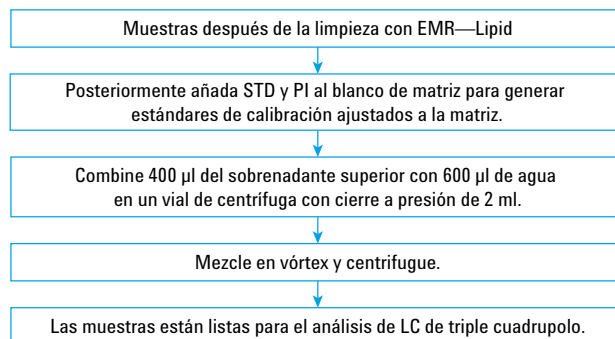


Figura 7. Procedimiento opcional después de la limpieza con Bond Elut EMR—Lipid de Agilent para mejorar las recuperaciones de tetraciclinas.

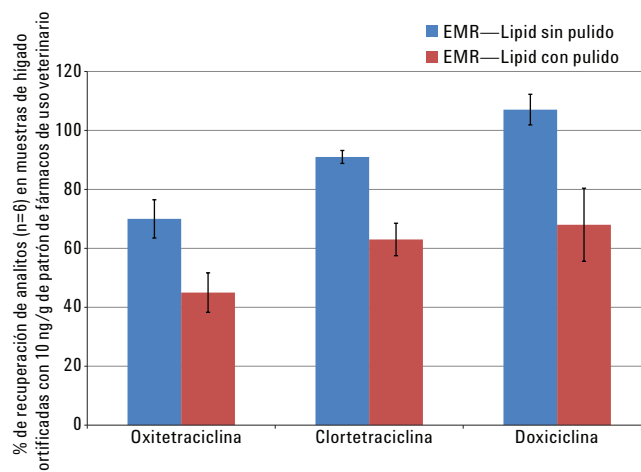


Figura 8. Comparación de la recuperación y precisión de la tetraciclina para muestras de hígado preparadas con y sin una etapa de pulido después de la limpieza Bond Elut EMR—Lipid de Agilent.

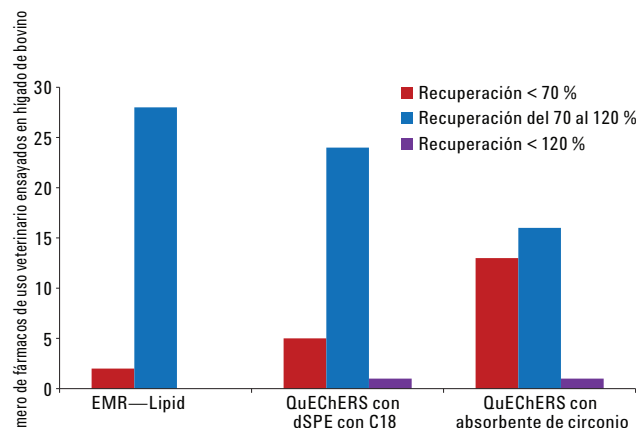


Figura 9. Resultados estadísticos de recuperación para la comparación entre el protocolo Bond Elut EMR—Lipid de Agilent y los protocolos tradicionales QuEChERS.

recuperaciones absolutas de 67 % y 68 %, respectivamente. Sin embargo, la precisión de estos dos compuestos para las seis réplicas fue aceptable, con un valor de DER de 12,8 % y 2,0 %, respectivamente, considerados aceptables según las directrices SANCO[9]. Estos resultados son mejores que los obtenidos con los otros dos protocolos que utilizaban dSPE con C18 y absorbentes de circonio.

Validación de métodos

El método EMR—Lipid optimizado se validó analizando un lote de cuantificación completo, usando el método descrito en la sección de preparación de muestras. Se usó un patrón interno (flunixinad₃ para el modo positivo y negativo) para la cuantificación de la exactitud y la precisión. La recuperación absoluta de la flunixinad₃ fue del 90 al 100 %. Por tanto, la exactitud se corresponde

estrechamente con las recuperaciones absolutas. La Tabla 4 muestra los resultados de cuantificación. Se generó un gráfico resumen (Figura 11) determinado la exactitud y la precisión para 24 QC en cuatro niveles diferentes (G1 = 10, 50, 250, y 750 ppb y G2 = 2, 10, 50, y 150 ppb; véase la sección de patrón de calibración), con seis réplicas para cada nivel. Se consiguieron precisiones aceptables (de 70 a 120 %) para el 93 % de los analitos, salvo para dos valores atípicos, que tuvieron una recuperación ligeramente inferior al 70 % con buenos valores de DER. Los valores de DER para las seis réplicas de cada nivel fueron excepcionales, inferiores al 10 % para la mayoría de los compuestos. Debe indicarse que la ractopamina y el ketoprofeno se detectaron a bajas concentraciones en el blanco de hígado de bovino, dando como resultado un intervalo de calibración modificado.

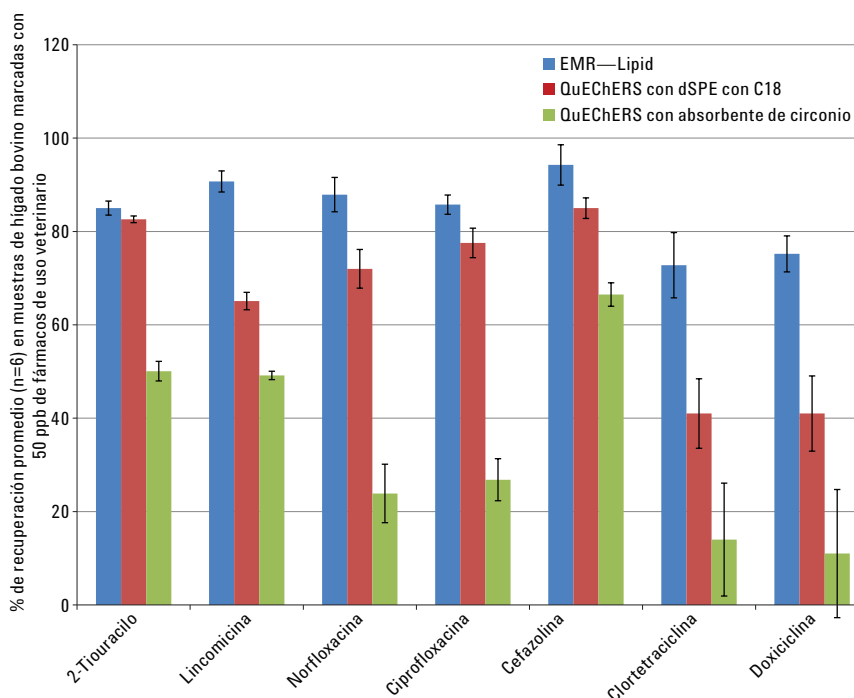


Figura 10. Resultados de recuperación de los analitos seleccionados comparando el protocolo Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos con los protocolos tradicionales. Los resultados para clortetraciclina y doxiciclina se generaron con un protocolo alternativo mostrado en la Figura 6. El resto de los compuestos usaron el protocolo de la Figura 1.

Tabla 4. Resultados de cuantificación de analitos objetivo usando el sistema Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos. Cada analito se evaluó en cuatro niveles de concentración con seis réplicas para cada nivel.

N.º de grupo	Analito	Curva de calibración			Recuperación y precisión del método (ng/g QC)											
		Ajuste de regresión/peso	R ²	Intervalo cal. (ng/g)	2		10		50		150		250		750	
					% Rec	DER	% Rec	DER	% Rec	DER	% Rec	DER	% Rec	DER	% Rec	DER
1	2-Tiouracilo	Lineal, 1/x	0,9976	5-1.000	—	—	106,6	4,9	93,6	5,4	—	—	87,0	3,0	85,4	8,3
1	Amoxicilina	Lineal, 1/x	0,9978	5-1.000	—	—	65,9	12,1	74,3	8,8	—	—	79,5	4,1	79,7	4,8
1	Metonidazol-OH	Lineal, 1/x	0,9981	5-1.000	—	—	92,6	15,1	89,4	6,6	—	—	89,4	3,5	89,7	3,3
1	Oxitetraciclina	Lineal, 1/x	0,9963	5-1.000	—	—	73,9	19,1	71,2	14,0	—	—	67,0	12,8	63,4	9,0
1	Cefazolina	Lineal, 1/x	0,9966	5-1.000	—	—	72,1	9,4	81,2	2,7	—	—	86,7	3,8	82,9	3,0
1	Difloxacina	Lineal, 1/x	0,9978	5-1.000	—	—	79,0	8,3	86,5	5,9	—	—	104,4	5,1	97,7	6,3
1	Clortetraciclina	Lineal, 1/x	0,9928	5-1.000	—	—	100,6	14,1	96,9	9,5	—	—	93,8	14,0	85,0	11,6
1	Doxiciclina	Lineal, 1/x	0,9972	5-1.000	—	—	118,9	12,0	102,7	10,0	—	—	110,0	7,7	104,5	8,6
1	Florfenicol	Lineal, 1/x	0,9942	5-1.000	—	—	103,4	6,2	107,9	6,0	—	—	115,2	13,5	107,0	4,0
1	Cloranfenicol	Lineal, 1/x	0,9962	5-1.000	—	—	103,6	6,6	107,1	7,9	—	—	113,7	9,8	100,9	5,2
1	Closulon	Lineal, 1/x	0,9954	5-1.000	—	—	77,9	10,3	104,4	6,0	—	—	102,2	7,1	94,3	3,3
1	Prednisona	Lineal, 1/x	0,9984	5-1.000	—	—	105,9	9,1	92,1	11,1	—	—	103,9	10,5	94,5	2,3
1	Oxifenbutazona	Lineal, 1/x	0,9903	5-1.000	—	—	93,6	3,4	91,9	5,2	—	—	93,7	5,6	97,0	4,6
1	Acetato de melengestrol	Lineal, 1/x	0,9994	5-1.000	—	—	70,6	1,4	77,3	3,0	—	—	82,8	2,1	77,1	2,6
1	Bitionol	Cuadrática, 1/x	0,9981	5-1.000	—	—	69,4	6,2	90,4	2,9	—	—	91,3	4,3	83,1	3,7
2	Levamisol	Lineal, 1/x	0,9967	1-200	84,5	11,3	95,5	5,1	103,8	5,2	89,4	9,7	—	—	—	—
2	Lincomicina	Lineal, 1/x	0,9950	1-200	89,5	16,4	79,6	10,6	74,1	4,5	74,8	11,2	—	—	—	—
2	Norfloxacina	Lineal, 1/x	0,9960	1-200	89,5	9,7	89,2	4,7	95,8	7,4	93,5	7,2	—	—	—	—
2	Ciprofloxacina	Lineal, 1/x	0,9980	1-200	81,0	5,6	83,6	6,9	96,9	4,1	99,5	5,9	—	—	—	—
2	Danofloxacina	Lineal, 1/x	0,9985	1-200	78,2	7,8	86,2	5,8	99,5	7,8	96,9	4,8	—	—	—	—
2	Ractopamina	Lineal, 1/x	0,9961	10-200 ^b	—	—	98,1	15,5	105,0	10,4	102,5	6,8	—	—	—	—
2	Morantel	Lineal, 1/x	0,9960	1-200	89,5	4,9	95,1	4,5	101,0	8,6	94,1	7,4	—	—	—	—
2	Sulfametizol	Lineal, 1/x	0,9928	1-200	85,7	14,6	89,2	8,1	93,9	4,9	88,0	10,4	—	—	—	—
2	Sulfametoxipiridazina	Lineal, 1/x	0,9973	1-200	84,7	8,1	84,4	2,9	89,9	5,7	84,9	6,2	—	—	—	—
2	Tilosina	Lineal, 1/x	0,9967	1-200	80,6	11,2	75,6	2,7	71,0	4,5	65,3	2,3	—	—	—	—
2	Acetopromizina	Lineal, 1/x	0,9973	1-200	74,1	6,3	73,5	3,0	77,2	4,9	75,2	5,3	—	—	—	—
2	Clorpromazina	Lineal, 1/x	0,9967	1-200	66,1	6,1	67,8	3,8	73,4	4,3	72,7	6,5	—	—	—	—
2	Fenbendazol	Lineal, 1/x	0,9988	1-200	74,6	7,7	82,3	4,6	97,9	9,9	84,9	3,5	—	—	—	—
2	Ketoprofeno	Lineal, 1/x	0,9978	5-200 ^c	—	—	88,3	7,2	98,1	6,9	94,5	3,8	—	—	—	—
2	Niclosamida	Lineal, 1/x	0,9996	1-200	60,0	15,3	66,6	4,7	71,7	2,0	67,6	3,1	—	—	—	—

^a Los analitos del grupo 1 tienen un intervalo de calibración de 5 a 1.000 ng/g, y niveles de aparición de picos fantasmas de 10, 50, 250, y 750 ng/g. Los analitos del grupo 2 tienen un intervalo de calibración de 1 a 200 ng/g, y niveles de aparición de picos fantasmas de 2, 10, 50, y 150 ng/g.

^b Intervalo de calibración modificado debido a la ractopamina detectada en el blanco de control de HB.

^c Intervalo de calibración modificado debido al ketoprofeno detectado en el blanco de control de HB.

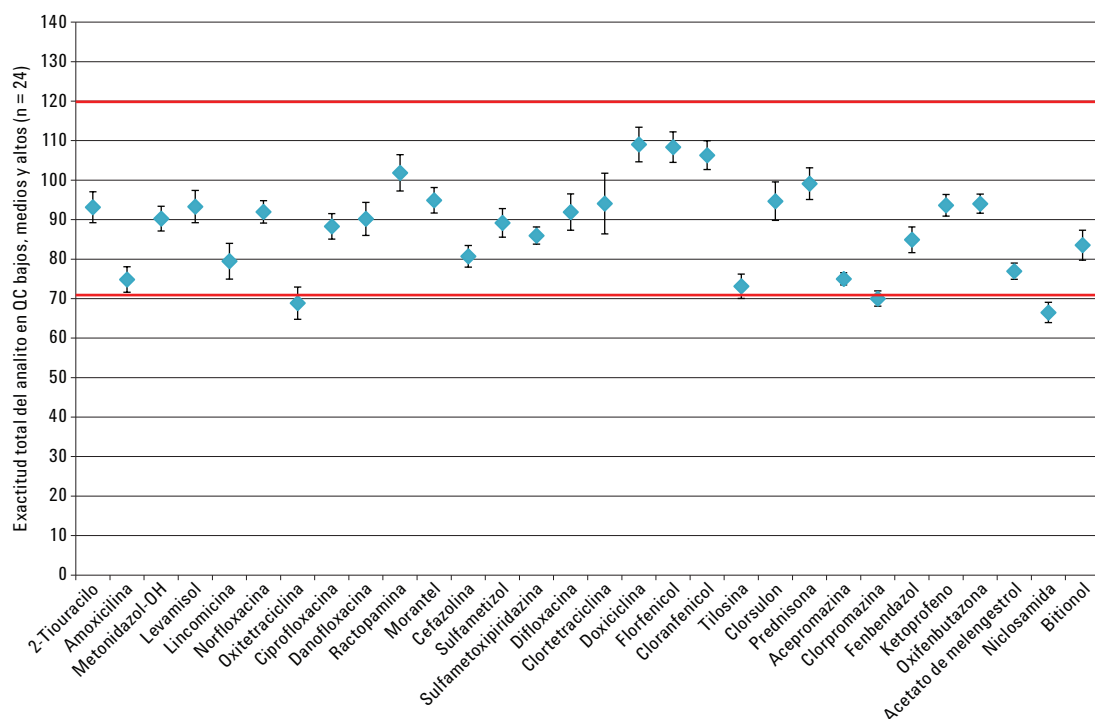


Figura 11. Cuantificación de 30 fármacos de uso veterinario representativos analizados en HB usando el protocolo optimizado Bond Elut con extracción mejorada en matriz de lípidos de Agilent. Los datos de exactitud y precisión se calcularon usando un total de 24 réplicas en cuatro niveles de marcado diferentes (n = 6 en cada nivel). Barra de error = IC del 95 %. Se generaron tres resultados para compuestos de tetraciclina con un protocolo alternativo mostrado en la Figura 6. El resto de los compuestos usaron el protocolo de la Figura 1.

Conclusiones

Se ha optimizado y validado un método rápido, fiable y robusto usando la extracción con precipitación de proteínas seguida de limpieza mediante el sistema Bond Elut EMR—Lipid y pulido con EMR—Lipid para el análisis de multiresiduos de fármacos de uso veterinario en hígado de bovino. Los efectos de la matriz se evaluaron cuidadosamente, y compararon con la limpieza dSPE tradicional con C18/PSA y absorbente de circonio. Los resultados demuestran que el método EMR-Lipid optimizado proporciona una limpieza de la matriz superior y una excelente recuperación y precisión en este tipo de aplicación.

Es importante destacar que se usó dilución directa con agua antes de la inyección para que las muestras pudieran analizarse mediante LC/MS/MS y mantener la integridad de pico en los primeros analitos eluidos. El sistema LC/MS/MS usado en este estudio proporcionó una sensibilidad adecuada para utilizar la dilución directa de la muestra cumpliendo al mismo tiempo los

requisitos de límite de detección. En comparación con los métodos habituales de secado y reconstitución, este flujo de trabajo ahorra mucho tiempo y esfuerzo, y también evita la posible desviación y pérdida de analitos. Si la sensibilidad del instrumento no puede satisfacer las exigencias por el método de dilución directa de la muestra se deberá considerar la aplicación de una etapa final de concentración de la muestra. Esto se consigue habitualmente mediante evaporación y reconstitución de la muestra. Esta aplicación demuestra que la extracción selectiva de la matriz usando EMR-Lipid proporciona ventajas significativas para muestras complejas tales como hígado de bovino en cuanto a muestras más limpias, con mayores recuperaciones y mejor precisión para el análisis de multiresiduos de fármacos de uso veterinario.

En futuros trabajos investigaremos otras matrices complejas grasas, así como otros analitos objetivo, para demostrar las ventajas de limpiar las muestras cuando se usa extracción mejorada en matriz.

Referencias

1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System, Marzo 2000*; U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC.
www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm.
2. Anon. Comisión Europea, Decisión del 12 de agosto de 2002 que implementa la Directiva del Consejo Europeo 96/23/CE relativa a la realización de métodos analíticos y la interpretación de los resultados; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L122, 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada, May 2012*; Health Canada, Ottawa. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf.
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, 25, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. J. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. J. *Chromatogr. A* **2008**, 1202, 118-123.
7. Geis-Asteggianti, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. J. *Chromatogr. A* **2012**, 1258, 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; Comisión Europea, Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria, Bruselas, Bélgica.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web
www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
30 de julio de 2015
5991-6096ES



Agilent Technologies