

UNA ALTERNATIVA PARA LA DETERMINACIÓN DEL ANTIBIÓTICO MONENSINA EN PREMEZCLAS USADAS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Vicente, F.¹; Giraudó, M. ¹; Mora, V. ¹ y D., Scollo¹

¹ Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional de Lanús

RESUMEN

Se propone un método alternativo para determinar el contenido de monensina presente en premezclas que son usadas en la alimentación animal. Se desarrolla un método para obtener un estándar secundario monensina que después servirá para valorar el antibiótico mediante un método colorimétrico. Se valida además la metodología analítica desarrollada.

Palabras clave: Monensina, Absorciometría, Balanceados.

ABSTRACT

We propose an alternative method to determine the content of monensin presents in premixes that are used in animal feed. We develop a standard method for obtaining a secondary standards monensin that then could be used to assess the antibiotic by a colorimetric method. It also validates the analytical methodology developed.

Key words: Monensin, Absorptiometry, Concentrated animal feed.

INTRODUCCIÓN

El antibiótico monensina en su forma base tiene la siguiente estructura química (ver figura 1) siendo una mezcla de sustancias producidas por fermentación usando el microorganismo *Streptomyces*

cinnamomensis y presentando sus estereoisómeros Monensina A $C_{36}H_{62}O_{11}$ de peso molecular 670,87, Monensina B $C_{35}H_{60}O_{11}$ de peso molecular 656,84 y Monensina C $C_{37}H_{64}O_{11}$ de peso molecular 684,90.

MMonensina A

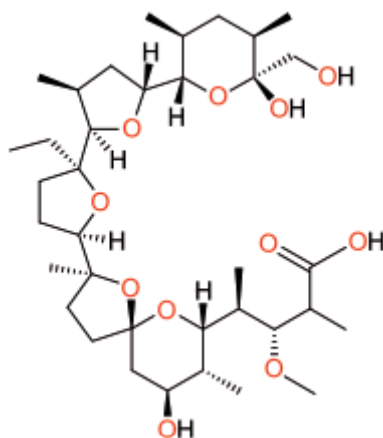


Figura 1. Estructura química de la monensina A

Comercialmente se presenta como sal sódica $C_{36}H_{61}O_{11}Na$ de peso molecular 692,90 (isómero A).

Existen numerosos trabajos de investigación que describen cómo en los sistemas pastoriles de Argentina está la posibilidad de mejorar la eficiencia de la conversión del alimento usando antibióticos. Con ello se están refiriendo al uso de ionóforos que son importantes herramientas para la nutrición animal de los bovinos: el más usado es el antibiótico Monensina como sal sódica (Van Nevel C. y Demexer, 1977;

Wallace R *et al.*, 1980; Rossi D. *et al.*, 1997; Odriozola N., 2004; Yoshida N. *et al.* (2008); Bretschneider G., 2009).

En los últimos años se ha generalizado el uso de este antibiótico en distintos animales para controlar la coccidiosis en bovinos, aves, cerdos, etc. Las malas prácticas de homogeneización han producido que animales reciban dosis altas y otros reciban dosis mínimas. En este último caso, no fue posible controlar la enfermedad por recibir niveles inadecuados.

Esta situación fue planteada por ingenieros zootecnistas a docentes investigadores de la UNLa para controlar el grado de homogeneidad de las premezclas comerciales usando una metodología analítica sencilla, rápida, exacta y que tuviera una sensibilidad hasta 10 ppm.

Se estudió la bibliografía disponible y a continuación se presentan las diferentes opciones:

Determinación por HPLC con derivatización postcolumna usando vainillina y leyendo el complejo formado a 520 nm: Blanchflower *et al.*, 1985; Martínez *et al.*, 1985; Martínez *et al.* 1986; Takatsuki *et al.*, 1986; Lapointe *et al.*, 1988; Moran *et al.*, 1994; Dusi *et al.*, 1999; Matabudul *et al.*, 2002; USP, 2010; AOAC, 2010; usando la misma técnica pero derivatizando con 9-antril diazometano (ADAM).

Determinación de monensina por HPLC-MSD: Song *et al.* 2007.

Determinación por TLC: Landgraf y Ross, 1998.

Determinación por ELISA: Kennedy D. *et al.*, 1995.

Todas las metodologías descriptas, salvo TLC, son complejas y el equipamiento resulta costoso y no es habitual hallarlo en los laboratorios comunes.

Otra dificultad fue disponer del estándar monensina con pureza garantizada: Sigma-Aldrich ofrece la sal sódica con pureza 90-95 % TLC pero nunca estuvo disponible en Argentina; Eli Lilly comercializa el producto al 20 % a través de ELANCO SA. El único producto disponible en nuestro país fue provisto por la industria china a través de Shandongh Jinyang Pharmaceutical Co,

Shandong Shunfengfan Biological Eng. Co. y Qingdao Fraden Internacional Trading Co. en concentraciones al 20 % expresado como base.

OBJETIVOS

Obtener un estándar secundario a partir de un premix comercial al 20 % p/p de monensina base.

Valorar el estándar secundario obtenido contra un estándar primario (de pureza conocida).

Desarrollar una técnica colorimétrica rápida y precisa.

Determinar la homogeneidad del premix.

MATERIALES Y MÉTODO

Los reactivos analíticos usados fueron adquiridos con calidad P.A.

Metanol P.A.

Acido sulfúrico conc. P.A.

Vainillina P.A.

Solución extemporánea de vainillina: 3 gramos de vainillina en 10 mL de metanol: H₂SO₄ conc 95:2)

Tolueno P.A.

Hexano P.A.

Cloroformo P.A.

Acido acético glacial P.A.

Acetato de etilo P.A.

Amoníaco P.A.

Espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Vis

Obtención de monensina base a partir de premix de monensina sódica del mercado

Se partió de un producto comercial conteniendo aproximadamente 20 %

de monensina base y se pesó 15,00 gramos del premix con una aproximación del 0,01 gramo, que se suspendió en 100 mL de metanol:agua (9:1) agitando continuamente durante 1 hora. Se filtró y el residuo se suspendió nuevamente en 50 mL del mismo solvente que se agitó durante una hora más. Finalmente se filtró.

Los filtrados se reunieron, se fijó la temperatura en 20 ° C y se le agregó agua destilada cantidad suficiente para mantener una concentración final de metanol del 50 %. En estas condiciones precipitó la monensina base (solubilidad en agua aproximadamente 3 ppm). Se filtró, secó a 56 ° C en estufa (punto de fusión 104 ° C). La droga obtenida se guardó en recipiente bien cerrado preservándola de la humedad y del calor excesivo.

Determinación de la pureza de la monensina base extraída en el laboratorio

Se realizó comparando por HPLC una solución de la misma (estándar secundario) con un estándar primario de monensina conteniendo 19,70 % de base valorada por el método oficial HPLC con derivatización por vainillina. La procedencia del estándar primario fue de un laboratorio privado que realiza controles continuos del antibiótico en muestras importadas.

Determinación de la linealidad del método desarrollado

Se preparó una solución madre de monensina base pesando exactamente, de modo de obtener una concentración final de alrededor de 1 mg/mL. Se construye la curva de calibración tomando 0,1-0,2-0,3 y 0,4 mL de la solución madre respectivamente a

las que se les agrega (blanco incluido) 1 mL de la solución extemporánea de vainillina y se enrasa a 5 mL con metanol:agua (9:1). Las concentraciones finales fueron de 2- 4- 6 y 8 ppm de monensina.

Se calentaron los tubos a baño maría a 98°C usando frasco de penicilina sellado con tapón de neoprene y cápsula de aluminio durante de 3-5 minutos, enfriar (durante de 1-2 minutos). Se leyó el color desarrollado a 520 nm (las absorbancias obtenidas estuvieron en el rango 0,1-0,8)

Nota: los plazos fijados son importantes para obtener repetibilidad de valores ya que el reactivo es altamente oxidable.

Determinación de monensina en premezclas comerciales

En el caso de muestras con contenido mayor a 1000 ppm de monensina sódica:

Se molió muy finamente el premix pelletizado y se tomó una cantidad de modo de entrar en el rango de linealidad de la curva de calibración. Se agregó 200 mL de metanol:agua (9:1) y se extrajo el antibiótico agitando continuamente durante 1 hora. Se dejó sedimentar y se filtró. Se tomó la alícuota correspondiente y se procedió según descrito en el paso anterior.

En el caso de muestras con contenido menor a 1000 ppm:

Se usó otro método de extracción del antibiótico ya que los premix contienen grasa y compuestos coloreados que interfieren en la determinación (interferencias debidas a la matriz). Se pesó una cantidad de muestra según las indicaciones previas y se la trató con 150 mL de metanol: agua

(9:1). Se tomó una alícuota y se la evaporó al vacío hasta sequedad. Se agregó 2 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y 1 mL de metanol PA. Se extrajo el antibiótico con 3 mL de hexano:tolueno (2:1). Se evaporaron bajo vacío los solventes orgánicos. Se retomó con metanol:agua (9:1) y se procedió como se describió antes.

Una variante probada fue el método propuesto por Landgraf *et al.* (1998) usando cartuchos de extracción en fase sólida (spe) de sílice (0,5 gramos) preacondicionados con 4 mL de cloroformo al que se hizo pasar una solución de monensina en hexano (item 11.2). Se eluyó con 10 mL de cloroformo, después 10 mL cloroformo-metanol (95:5) y finalmente cloroformo:metanol (90:10). Se juntaron los extractos y evaporaron a sequedad bajo vacío. Se retomó con metanol:agua (9:1).

Se optó por la variante de extracción con solvente por la mejor reproducibilidad de resultados.

RESULTADOS

Cristalización de monensina base a partir de un premix comercial

La primera cristalización dio 3,3 gramos de monensina expresados como base.

La recristalización (2 veces) dio 2,27 gramos de monensina base.

La precisión expresada como repetibilidad fue asegurada ya que fue analizada numerosas veces (5 análisis consecutivos). Ver Tabla.

El rendimiento de la extracción fue del 89 % expresado como base con un CV de 2,5 %.

Control de la pureza del estándar secundario contra un estándar primario.

Para 10 determinaciones consecutivas, se obtuvo una potencia promedio del producto recristalizado del 92,0 % con un CV del 1,8 %.

Obtención de la curva de calibración

Las Absorbancias a 520 nm de las soluciones de los estándares de 2, 4 y 6 ppm dieron valores comprendidos entre 0,1 y 0,8 siempre y cuando se respetaran los tiempos para obtener el desarrollo del color. Ver validación del método, linealidad.

Determinación de monensina sódica en las premezclas comerciales

Ver Precisión

Validación de la metodología analítica desarrollada

Especificidad o selectividad: Se determinó comparando los espectrogramas obtenidos para los dos estándares en el UV entre 200 y 400 nm usando el Metrolab 1700. El pico único aparece a 208 nm (datos no mostrados) a partir de soluciones de aproximadamente 20 mg de estándar/50 mL de metanol P.A.

Sensibilidad: Es la pendiente de la curva de calibración obtenida comparativamente usando ambos estándares. El factor respuesta o pendiente es el mismo (resultados no mostrados).

El límite de detección fue calculado con la fórmula $= 3,3 \times DS_{\text{blanco}} / \text{pendiente curva calibración}$. El valor numérico obtenido es de 0,5 ppm.

El límite de cuantificación se obtuvo con la fórmula $= 10 \times DS_{\text{blanco}} / \text{pendiente curva de calibración}$. El valor numérico obtenido fue de 1 ppm.

Precisión: Se determina midiendo la Repetibilidad para los estándares usados y para las muestras y se expresa por el CV porcentual. Ver la tabla 2.

Asimismo se determina la Reproducibilidad durante varios días y se expresa en CV %. Repetibilidad para los estándares (Tabla 1).

Exactitud: La exactitud se expresa como Por ciento de Recuperabilidad.

En la Tabla 2 se observan los datos de exactitud para las muestras analizadas (n = 5).

Se expresa también como Recuperabilidad realizando estudios intradías para 3 concentraciones diferentes de estándar y estudios interdías con 3 concentraciones

diferentes de estándares durante al menos 4 días consecutivos (en la Tabla 3 se observa la Precisión, expresada como Reproducibilidad y la Exactitud, expresada como porcentaje de Recuperabilidad para el estándar de 20 ppm).

Rango de linealidad: Se usan 3 concentraciones diferentes de estándar (de 2 a 6 ppm) que cubran las dispersiones de las muestras a analizar. Al realizar la regresión lineal se obtuvo el valor de la pendiente 0,05; el intercepto -0,01 y el coeficiente de correlación 0,98.

CONCLUSIONES

El método desarrollado es sencillo, rápido y de buena exactitud, lo que permite controlar la homogeneidad del antibiótico presente en los balanceados comerciales hasta valores de 10 ppm.

	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm
$\bar{x} \pm DS$	2,2 ± 0,1	3,9 ± 0,2	5,9 ± 0,2	8,2 ± 0,2
CV %	5,2	4,2	3,8	3,9

Tabla 1. Datos de repetibilidad para los estándares de monensina

Concentración calculada	Concentración obtenida	Recuperabilidad %
25 ppm	24	96
200 ppm	198	99
1000 ppm	1050	105

Tabla 2. Datos de la exactitud obtenida

	Agregado	5 ppm	10 ppm	20 ppm
Día 1	$\bar{x} \pm DS$	30,2 \pm 0,2	35,8 \pm 0,3	46,3 \pm 0,3
	CV %	1,9	2,0	1,2
	Recuperabilidad %	101	102	103
Día 2	$\bar{x} \pm DS$	29,8 \pm 0,2	34,5 \pm 0,2	46,6 \pm 0,4
	CV %	1,8	2,1	1,5
	Recuperabilidad	99	99	101
Día 3	$\bar{x} \pm DS$	28,9 \pm 0,3	36,1 \pm 0,4	46,0 \pm 0,4
	CV %	2,0	2,0	1,9
	Recuperabilidad %	97	103	102
Día 4	$\bar{x} \pm DS$	29,9 \pm 0,1	35,0 \pm 0,2	45,9 \pm 0,3
	CV %	2,0	2,0	1,9
	Recuperabilidad %	99	99	102

Tabla 3. Estudio de la exactitud del método desarrollado

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC International, Official Methods of Analysis (2010), Method 997.04: Monensin in premix and animal feeds.
- Blanchflower W., Rice D., Hamilton J. (1985), Simultaneous HPLC determination of monensin, naransin and salinomycin in feeds using post column derivatization, Analyst 110, 1283-1285.
- Blanchflower W., Kennedy D. (1996), Determination of monensin, salinomycin and naransin in muscle, liver and eggs from domestic fowl using LC- electrospray mass spectrometry, J. Chromatogr. B 675, 225-233.
- Bretschneider G. (2009), Beneficios del uso de monensina en la alimentación del ganado para carne, leche y cría, Estación experimental INTA Rafaela, Santa Fe, Argentina.
- Dusi G., Gamba V. (1999), Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization, J. Chromator. A 835, 243-246.
- Kennedy D., Blanchflower W. O´Dorman B. (1995), ELISA determination of monensin, Food Add. Contam. 12, 93-95.
- Landgraf W., Ross P. (1998), TLC determination of monensin in feeds: screening method, J. AOAC Int. 81, 844-847.

- Lapointe M., Cohen H. (1988), High speed HPLC determination of monensin, naransin and salinomycin in feeds using post column derivatization, *J. AOAC Int.* 71, 480-484.
- Martínez E., Shimoda W. (1985), Determination of the ionophors anticoccidiostats naransin, monensin, lasalacin and salinomycin in eggs by LC-MSD, *J. AOAC Int.* 68, 1149.
- Martínez E., Shimoda W. (1986), Determination of monensin by hplc, *J. AOAC Int.* 69, 637.
- Matabudul D., Lumley I., Points J. (2002), The determination of 5 anticoccidial drugs in animal livers and eggs by LC-MSD, *Analyst* 127, 760-768.
- Moran J., Rodewald J., Donoho A, Coleman M. (1994), Determination of monensin in chicken tissues by LC with post column derivatization, *J. AOAC Int.* 77, 885-888.
- Odriozola N. (2004), Intoxicación por monensina. En Blood D., Henderson I., Radotsis, 2000, *Medicina Veterinaria, Interamericana*, Bs As.
- Rossi D., Navarro F., Grivel C. (1997), Efecto de monensina sobre el aumento de peso y prevención del meteorismo en novillos sobre una pradera de alfalfa, *Arch. Med. Veter.* 29, 14-19.
- Song W., Huang M., Rumbelha W., Li H. (2007), Determination of monensin and tylosin in surface water by LC-MSD, *Rapid Comm. En Mass Spectr.* 21, 1944-1950.
- Takatsuki K., Suzuki S., Ushizawa I. (1986), Liquid chromatographic determination of monensin in chicken tissues with fluorimetric detection and confirmation by GC-MSD, *J. AOAC Int.* 69, 443-448.
- USP 2010, *Official Methods of Analysis: ficha técnica para Monensin, Monensin granulated, Monensin Premix, Monensin sodium.*
- Van Nevel C., Demeyer D. (1977), Effect of monensin on rumen metabolism in vitro, *App. Environm. Microbiol* 34, 251-255.
- Wallace R., Cheng K., Czerkawski J. (1980), Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen, *App. Environm. Microbiol.* 40, 672-674.
- Yoshida N., Moscuza C., Castro C., Fernández Cirelli A. (2008), Riesgo de contaminación ambiental con monensina en sistemas intensivos de engorde bovino, *Rev. Arg. Prod. Animal* 28, 112.120.