



Informe Técnico

Desarrollo y validación de un método de cuantificación de ciprofloxacino mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para su aplicación en reacciones de degradación fotocatalítica en agua

M. en C. Mario Ricardo Israel Rodríguez Varela

20/01/2022

Desarrollo

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología

Financiamiento interno

Desarrollo y validación de un método de cuantificación de ciprofloxacino mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para su aplicación en reacciones de degradación fotocatalítica en agua

Mario Ricardo Israel Rodríguez Varela

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Departamento de Micro y Nanotecnologías, Catálisis y Fenómenos de Superficie

Resumen

En el presente trabajo se muestra el desarrollo, optimización y validación de un método para cuantificar ciprofloxacino en agua Milli-Q mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada con espectrometría de masas (CLAE-EM). Se determinaron dos intervalos lineales del método que están comprendidos entre los 0.005-10 mgL⁻¹ y 20-60 mgL⁻¹ con una linealidad aceptable mostrando coeficientes de correlación $r > 0.99$. El límite de detección (LD) es de 0.001 mgL⁻¹ y los límites de cuantificación (LC) para ambos intervalos son 0.05 mgL⁻¹ y 20 mgL⁻¹, respectivamente. La precisión del método se evaluó a tres niveles de concentración a lo largo del intervalo lineal mostrando porcentajes de desviación estándar relativa (%RSD) entre 1.8-3.6 %. Las magnitudes determinadas en cada parámetro de desempeño evaluado fueron aceptables de acuerdo con las guías de validación del CCAYAC-CR-03, 2017 y EURACHEM, 2016 para niveles de concentración de mg L⁻¹. El método fue utilizado para cuantificar la degradación de ciprofloxacino en agua, derivado de experimentos de fotocátalisis heterogénea, utilizando un catalizador de Ag₂O/TiO₂.

Índice

Resumen.....	2
1 Introducción	1
2 Metodología analítica para la cuantificación de ciprofloxacino	3
2.1 Propiedades físicas y químicas del ciprofloxacino	3
2.2 Establecimiento y optimización de las condiciones y parámetros experimentales del espectrómetro de masas para la identificación selectiva de ciprofloxacino	4
2.3 Evaluación de la estabilidad del estándar analítico de ciprofloxacino	6
2.4 Validación del método analítico para la cuantificación de ciprofloxacino en agua.....	7
2.4.1 Intervalo lineal y de trabajo	8
2.4.2 Límite de detección (LD)	8
2.4.3 Límite de cuantificación (LC)	9
2.4.4 Precisión.....	10
2.4.5 Aplicación del método. Evaluación de la actividad de fotodegradación de CPX en reacciones fotocatalíticas	10
3 Resultados	11
3.1 Establecimiento y optimización de las condiciones y parámetros experimentales del espectrómetro de masas para la identificación selectiva de ciprofloxacino	11
3.1.1 Identificación estructural y selección del ion fragmento específico de la molécula de ciprofloxacino	11
3.1.2 Optimización de los parámetros y condiciones instrumentales de cromatógrafo y espectrómetro de masas (CLAE-EM). Fase móvil, parámetros de fragmentación y volumen de inyección.....	13
3.1.3 Estabilidad del estándar analítico de ciprofloxacino	18
3.2 Desarrollo y validación del método de cuantificación de ciprofloxacino en agua.....	20
3.2.1 Linealidad	20
3.2.2 Precisión.....	23

3.2.3	Límites de detección	23
3.2.4	Límites de cuantificación	24
3.3	Evaluación del desempeño del método en la cuantificación de CPX en reacciones de degradación fotocatalítica.	25
3.3.1	Primera etapa. Evaluación de la repetibilidad del método en reacciones de degradación fotocatalítica.	25
3.3.2	Segunda etapa. Estabilidad de las muestras de CPX después de una reacción de degradación.....	27
4	Conclusiones.....	28
5	Bibliografía.....	28

Nomenclatura

Símbolo (orden alfabético)	Significado
α	<i>Riesgo estadístico, a un nivel de confianza dado</i>
σ	<i>Desviación estándar</i>
$\bar{X}$	<i>Media estadística</i>
CCAyAC	<i>Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura</i>
C_F	<i>Concentración de analito en muestra fortificada</i>
C_A	<i>Concentración de analito añadido</i>
C_B	<i>Concentración del blanco de muestra</i>
CLAE	<i>Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia</i>
EM	<i>Espectrometría de Masas</i>
EURACHEM	<i>Guía de validación de métodos internacional europea</i>
IBP	<i>Ibuprofeno</i>
LD	<i>Límite de Decisión</i>
LC	<i>Límite de Cuantificación</i>
L	<i>Litros</i>
mg	<i>Miligramos</i>
%RSD	<i>Desviación estándar relativa</i>
r	<i>Coeficiente de correlación de Pearson</i>
SCAN	<i>Barrido completo de iones</i>
SIM	<i>(Single Ion Monitoring, Monitoreo de Ion Simple)</i>
u.a.	<i>Unidades de Área</i>

1 Introducción

El ciprofloxacino (CPX) es un antibiótico de amplio espectro de segunda generación, clasificado dentro de la familia de las fluoroquinolonas (Prabodh Chander Sharma, 2010). El CPX es uno de los antibióticos más potentes utilizados, ya que ha mostrado una gran eficacia y seguridad en más de 250 millones de pacientes alrededor del mundo (Anquetin, et al., 2006), (Brunner, 2004), por ejemplo: (D. D'Antonio, 1994) señalan que el ciprofloxacino fue más eficaz que sus análogos oxofloxacino y pefloxacino en prevenir infecciones vinculadas a bacterias Gram negativo en pacientes neutropénicos. Si bien, el CPX es un compuesto muy seguro y no produce metabolitos y/o subproductos de degradación perniciosos contra el ser humano, no se sabe si a nivel medioambiental, podría inhibir procesos fundamentales mediados por microorganismos tales como: la regeneración de nutrientes, así como los ciclos del nitrógeno y el carbono (Girardi, 2011).

Adicionalmente, el antibiótico podría inhibir la microbiota de los tratamientos biológicos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), reduciendo así, la efectividad de esta (Girardi, 2011).

Con el fin de reducir y/o eliminar la descarga continua de este tipo de fármacos al medio ambiente y de auxiliar a los tratamientos de agua residual convencionales, la comunidad científica se ha focalizado en producir procesos que permitan oxidar, reducir contaminantes en agua para propiciar su degradación y mineralización; dando como resultado la implementación de procesos de oxidación avanzada como la fotocatalisis heterogénea (J. C. Durán-Álvarez, 2019). La fotocatalisis propició e impulsó la creación de múltiples compuestos tales como: TiO_2 , ZnO , Bi_2WO_6 , AgBr , entre otros que aún siguen siendo sintetizados (Marschall, 2014), a causa de ello, evaluar su capacidad degradativa es fundamental.

La eficiencia degradativa de un catalizador se evalúa al someter a una molécula modelo, tales como: fármacos (ciprofloxacino, ibuprofeno, oxitetraciclina), plastificantes (bisfenol A-F), compuestos industriales (ácido perfluorooctanoico) a un proceso de degradación fotocatalítica, en donde; la molécula seleccionada es adicionada a un

reactor con agua, mezclada con el catalizador por probar e irradiada con algún tipo de luz, tal como: luz visible (380-780 nm) o luz ultravioleta (100-400 nm).

La evaluación de la capacidad degradativa requiere por lo tanto del desarrollo de un procedimiento o método experimental de análisis apto para identificar y cuantificar los cambios en la concentración de la molécula modelo. Este método debe de cubrir al menos tres características fundamentales: 1) Elevada sensibilidad. El método tendrá la capacidad de medir a la molécula objetivo en los niveles de concentración más bajos posibles, garantizando su correcta identificación y cuantificación, 2) Baja variabilidad. La metodología analítica desarrollada está obligada a ofrecer los resultados más repetibles y menos dispersos que sea posible, con el fin de garantizar la funcionalidad de esta y 3) Alta aplicabilidad. Es fundamental que el método pueda ser utilizado en la evaluación de múltiples fotocatalizadores, sin que su eficiencia se vea disminuida.

En el caso del ciprofloxacino, el desarrollo de metodologías analíticas abarca un amplio número de técnicas como: la inyección de flujo con detección por quimiluminiscencia (IF-QL), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), electroforesis capilar de zona (ECZ), cromatografía de líquidos con detección ultravioleta-visible (CL-UV/vis) (Prabodh Chander Sharma, 2010) y el más utilizado cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada con espectrometría de masas (CLAE-EM). Este último ofrece tres grandes ventajas; 1) La cromatografía permite la separación física del analito de interés en una mezcla simple y/o compleja, 2) la espectrometría de masas faculta al método de una detección selectiva al medir la masa molecular específica del compuesto de interés y 3) el acoplamiento de ambas técnicas promueve un incremento en la sensibilidad analítica, capaz de medir al analito de estudio en concentraciones que oscilan entre los $\mu\text{g L}^{-1}$ y los mg L^{-1} brindando un extenso intervalo lineal de hasta 4 órdenes de magnitud.

Tomando en cuenta todo lo anterior, en el presente trabajo se desarrolló, optimizó y validó una metodología analítica basada en cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada con espectrometría de masas (CLAE-EM) para cuantificar la molécula modelo ciprofloxacino en agua, para evaluar la capacidad degradativa de diversos catalizadores

en ensayos de degradación fotocatalítica. El desarrollo experimental tuvo por objetivos: 1) desarrollar y optimizar una metodología CLAE-EM para determinar ciprofloxacino en agua de forma selectiva en concentraciones comprendidas en el intervalo de 0.001-50 mg L⁻¹, 2) estudiar la estabilidad del CPX con el que se desarrollarán los experimentos catalíticos bajo diferentes condiciones, como son: a) condiciones de almacenamiento, b) estabilidad de la disolución patrón, c) tiempo de degradación y 3) evaluar la aplicabilidad del método en una reacción de degradación fotocatalítica de ciprofloxacino por triplicado de forma independiente con un catalizador de Ag₂O/TiO₂.

2 Metodología analítica para la cuantificación de ciprofloxacino

2.1 Propiedades físicas y químicas del ciprofloxacino

El ciprofloxacino es una fluoroquinolona (C₁₇H₁₈FN₃O₃) con forma de polvo blanco con una masa molecular de 331.34 g mol⁻¹ (Figura 1). El punto de fusión está comprendido entre 255-257 °C. Es un compuesto poco soluble en agua y etanol, pero su análogo hidrolórico (C₁₇H₁₈FN₃O₃ • HCl) presenta una solubilidad en agua < 1 mg mL⁻¹ ≈ 36 mg mL⁻¹ a 25 °C, es medianamente soluble en metanol o acetona. No obstante, la solubilidad es dependiente del pH, debido a que posee dos disociaciones ácidas, pKa₁ (6.1) y pKa₂ (8.6), motivo por el cual, es altamente soluble en medios mediana o fuertemente ácidos (pH < 5) e.g., HCl, H₂NO₃ (1 mol L⁻¹). Es una molécula no volátil con una presión de vapor de 2.85 × 10⁻¹³ mmHg ≈ 2.16 × 10⁻¹⁰ atm a 25 °C y altamente susceptible a la degradación por fotólisis y temperatura (< 25 °C) (PubChem, 2004), (Prabodh Chander Sharma, 2010).

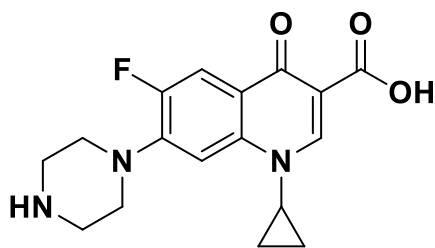


Figura 1. Estructura química del Ciprofloxacino.

2.2 Establecimiento y optimización de las condiciones y parámetros experimentales del espectrómetro de masas para la identificación selectiva de ciprofloxacino

La identificación estructural del ciprofloxacino se realizó empleando un espectrómetro de masas Agilent 6420, triple cuadrupolo (Agilent Technologies®) operado en el modo de adquisición de ionización positiva (ESI+). Para ello, se prepararon 50 mL de una disolución acuosa de 1 mg L⁻¹ de un estándar analítico de ciprofloxacino (grado HPLC >98 %, Sigma-Aldrich) añadiendo 100 µL de HCl concentrado (37 %v/v). Después, se transfirió una alícuota de 1 mL de la disolución a un vial ámbar de HPLC para su posterior análisis espectrométrico; mientras tanto, la disolución madre fue almacenada en refrigeración a -4 °C.

La alícuota de ciprofloxacino se analizó empleando dos modos de adquisición; 1) Barrido completo de iones (full SCAN), empleado para identificar la fragmentación molecular específica del analito y 2) Monitoreo de Ion Simple (SIM), utilizado para realizar el seguimiento cuantitativo y específico del ion molecular [M+H]⁺ correspondiente al CPX.

Una vez seleccionado el ion molecular que será usado como ion fragmento de seguimiento en los experimentos de cuantificación, se establecieron y optimizaron las condiciones de operación instrumentales del espectrómetro de masas con el objetivo de incrementar la señal analítica (área del pico espectrométrico). Para ello se consideraron: 1) el efecto en la fragmentación producido por la composición de la fase móvil (Tabla 1) y 2) la fragmentación molecular intrínseca del CPX, obtenida al modificar los parámetros instrumentales (Tabla 2). Esta última optimización se realizó utilizando el modo de adquisición de monitoreo de ion simple (SIM) sobre el ion molecular del ciprofloxacino [M+H]⁺ 332.1 m/z.

Tabla 1. Composición de la fase móvil.

Composición de Fase móvil (%V/V)	No. de réplicas (n)	Intentos (Exitosos/Fallidos)
Agua (CHO ₂ H, 0.1%):AcCN (50:50)	3	(3/0)
Agua (CHO ₂ H, 0.1%):AcCN (5:95)	7	(7/0)

Tabla 2. Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas optimizados.

Parámetro	Nivel evaluado	No. de réplicas (n)	Intentos (Exitosos/Fallidos)
Temperatura de ionización (°C)	150	3	(3/0)
	200	3	(3/0)
	250	3	(3/0)
	300	3	(3/0)
	325	3	(3/0)
	350	7	(7/0)
Presión del nebulizador (psi)	3	3	(3/0)
	13	3	(3/0)
	20	3	(3/0)
	25	3	(3/0)
	30	7	(7/0)
Voltaje de fragmentación (V)	60	3	(3/0)
	7	3	(3/0)
	80	3	(3/0)
	90	3	(3/0)
	95	7	(7/0)
	100	7	(7/0)
	105	3	(3/0)
	115	3	(3/0)
	135	3	(3/0)

Análisis por segundo o Dwell (ms⁻¹)	100	3	(3/0)
	200	3	(3/0)
	250	3	(3/0)
	300	3	(3/0)
Voltaje de aceleración (V)	0	3	(2/1)
	3	3	(3/0)
	5	3	(3/0)
	7	7	(7/0)
Voltaje capilar (V)	-1000	3	(3/0)
	-4000	7	(7/0)
	-7000	3	(3/0)
	0.5	3	(3/0)
Volumen de inyección (μL)	1	3	(3/0)
	2	3	(3/0)
	3	7	(7/0)
	4	3	(3/0)

2.3 Evaluación de la estabilidad del estándar analítico de ciprofloxacino

La estabilidad del reactivo analítico (estándar analítico) de ciprofloxacino se evaluó a través de pruebas de degradación molecular, tomando en cuenta los siguientes factores: 1) las condiciones de almacenamiento (sensibilidad a la fotólisis y a la temperatura) y 2) el color del frasco donde se guarda la muestra (transparente o ámbar), en ambos casos se consideró la estabilidad de la disolución patrón a través del tiempo, tal como se muestra en la Tabla 3. Para ello, se prepararon disoluciones de 1 mgL⁻¹ de CPX. Los resultados experimentales fueron comparados con una concentración control de 1 mgL⁻¹.

Tabla 3. Parámetros evaluados para el establecimiento de la estabilidad del estándar de Ciprofloxacino.

Parámetro	Condiciones evaluadas	No. de réplicas (n)	Intentos (Exitosos/Fallidos)
*Almacenamiento	Vial transparente sin luz	3×3 (9)	(9/0)
	Vial transparente con luz		
	Vial ámbar sin luz	3×3 (9)	(9/0)
	Vial ámbar con luz		
	Vial ámbar sin refrigeración (21 °C)	3×3 (9)	(9/0)
	Vial ámbar con refrigeración (-4 °C)		

*** Las muestras se analizaron a las 0, 3, 6 y 12 h**

Con los resultados se construyeron gráficos de área bajo la curva del tipo A/A_0 en función del tiempo (h), con los que se establecieron las tendencias de degradación y se optimizaron las condiciones de almacenaje de la muestra; donde: A es el área determinada y A_0 es el área inicial.

2.4 Validación del método analítico para la cuantificación de ciprofloxacino en agua

La validez del funcionamiento del método desarrollado, se realizó mediante una curva de calibración del tipo estándar externo, la cual fue probada, evaluada y aceptada de acuerdo con la guía nacional de validación de la (Comisión de Control Y Ampliación de Cobertura CCAyAC, 2020), la cual lleva por nombre “Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos”, a través de la evaluación de los siguientes parámetros de desempeño del método cromatográfico: 1) Intervalo lineal, 2) límite de detección (LD), 3) límite de cuantificación (LC), 4) precisión (%RSD, desviación estándar relativa), 5) Análisis de residuales, a lo largo de la curva de calibración.

2.4.1 Intervalo lineal y de trabajo

El intervalo lineal de la curva de calibración CPX se estableció mediante la construcción de un gráfico de concentración de CPX (mgL^{-1} , variable independiente) vs la señal analítica obtenida (unidades de área, variable dependiente), dentro del intervalo de concentraciones comprendido entre $0.001\text{-}60 \text{ mgL}^{-1}$. La linealidad de la curva de calibración se estableció en base en tres criterios:

- 1) La inspección visual del gráfico. Donde se consideraron como aceptables a todos aquellos niveles que siguieran una tendencia lineal y se descartaron a los que presentaban desviaciones a la linealidad.
- 2) Se calculó la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación de la recta (Ecuación 1), asimismo, se evaluó la correlación lineal entre las variables como criterio de aceptación de la curva de calibración; para ello, se calcularon 1) el coeficiente de correlación (r , Ecuación 2) y 2) el gráfico de residuales, considerando como aceptables los valores de correlación $r \geq 0.99$ y la distribución aleatoria de los residuos, respectivamente. En ambos casos los niveles de confianza utilizados fueron del 95 % ($\alpha=0.05$) y con una dispersión del 99.7 % ($\bar{X} \pm 2\sigma$).

$$\text{Área}_{LD} = m * \text{Concentración}_{CPX} + B \quad (1)$$

$$r = \frac{\Sigma(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\Sigma(X_i - \bar{X})^2 \Sigma(Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (2)$$

NOTA. Durante el experimento se determinaron 2 intervalos lineales de trabajo que están comprendidos entre: 1) $0.05\text{-}10 \text{ mgL}^{-1}$ y 2) $20\text{-}60 \text{ mgL}^{-1}$

2.4.2 Límite de detección (LD)

El establecimiento del límite de detección se obtuvo implementando dos criterios: 1) Dado que los blancos de muestra no presentan una señal detectable, fue necesario inyectar al equipo concentraciones bajas de ciprofloxacino con el objetivo de identificar cuál de ellas brinda una señal analítica diferenciable con respecto al ruido de fondo proveniente del blanco de muestra y 2) la precisión (el porcentaje de desviación estándar relativa %RSD) deberá ser menor al 5%, con el fin de garantizar la repetibilidad del nivel de concentración evaluado. El mismo criterio se utilizó para evaluar los dos intervalos lineales determinados durante el experimento.

Para ello, se prepararon e inyectaron en el instrumento tres disoluciones de ciprofloxacino por triplicado de forma independiente con las siguientes concentraciones: 0.0005, 0.001 y 0.005 mgL⁻¹. Las áreas determinadas para cada uno de los niveles de concentración fueron utilizadas para calcular la relación entre la señal analítica del analito con respecto al ruido de fondo (SNR), considerando como una señal analítica correspondiente al CPX a aquella que fuera diferenciable con respecto al área del ruido de fondo por un factor de 3 (Ecuación 3).

$$SNR = \frac{\text{Área de la señal del analito}}{\text{Área del ruido de fondo}} \geq 3 \quad (3)$$

Una vez identificado el nivel de concentración cuyo $SNR \geq 3$, este se utilizó para calcular el límite de detección (LD). Para alcanzar este objetivo, se prepararon e inyectaron al instrumento siete disoluciones independientes de CPX con una concentración de 0.001 mgL⁻¹.

Las áreas generadas para cada inyección se utilizaron para calcular las áreas promedio asociadas al límite de detección (A'_{LD}) de acuerdo con la ecuación 4. En donde Y representa al valor medio de las áreas y σ la desviación estándar.

$$A'_{LDD} = Y + 3\sigma \quad (4)$$

Posteriormente, la magnitud del área promedio calculada en la Ecuación 4 se sustituyó en la ecuación de la recta determinada en la curva de calibración (Ecuación 1). En donde, al despejar la concentración de CPX, se obtiene el límite de detección (Ecuación 5).

$$Y'_{LD} = m * \text{Concentración}_{CPX} + B \quad (5)$$

2.4.3 Límite de cuantificación (LC)

Entretanto, se consideró como límite de cuantificación al nivel de concentración más bajo de la curva de calibración que cumpliera con dos requisitos: 1) El punto más bajo de la curva forme parte del intervalo lineal y 2) la precisión (medida en unidades %RSD, apartado 2.4.4) exhibiera valores ≤ 10 %.

2.4.4 Precisión

La precisión del método se determinó evaluando tres niveles de concentración a lo largo del intervalo lineal de la curva de calibración, 0.05, 1 y 10 mgL⁻¹ para el intervalo de concentraciones de 0.05-10 mgL⁻¹ y 20, 40 y 60 ngL⁻¹ para el intervalo 2, comprendido entre 20-60 mgL⁻¹. Cada nivel de concentración fue preparado de forma independiente e inyectado por heptuplicado. La precisión de cada nivel se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación (%CV) usando la ecuación 6. Donde, X es el valor medio de las áreas obtenidas para cada nivel y σ es la desviación estándar.

$$\%RSD = \frac{\sigma}{X} * 100 \quad (6)$$

2.4.5 Aplicación del método. Evaluación de la actividad de fotodegradación de CPX en reacciones fotocatalíticas

La aplicabilidad del método se evaluó midiendo la concentración de CPX en agua Mili-Q durante una reacción de degradación fotocatalítica. El desempeño del método se evaluó en dos etapas. La primera etapa consistió en evaluar la repetibilidad de las mediciones durante un experimento de fotocatálisis (triplicado de forma independiente), Mientras que, la segunda etapa consistió en examinar la estabilidad de las muestras en función del tiempo de almacenado, con el objetivo de identificar por cuánto tiempo es posible almacenar las muestras derivadas de una reacción de degradación sin que afecte el resultado.

Por un lado, la evaluación de la repetibilidad se hizo evaluando la degradación de CPX en una reacción donde se utiliza un fotocatalizador de Ag₂O/TiO₂. Para ello, se prepararon 250 mL de ciprofloxacino con una concentración de 30 mgL⁻¹. La disolución fue transferida a un reactor vidrio de doble cara conectado a un recirculador a una temperatura constante de 25 °C. Durante la reacción se incidieron 100 mLmin⁻¹ de aire de ultra alta pureza (Praxair, 5.0 UAP). Posteriormente se añadieron 125 mg del catalizador bajo agitación constante. Una vez que el experimento fue puesto en marcha, se tomaron 13 muestras de 1 mL en tiempos establecidos a lo largo de la reacción en los tiempos: 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos; estas muestras fueron transferidas a un vial ámbar de HPLC para su posterior análisis cromatográfico.

Por otro lado, la estabilidad de las muestras se hizo repitiendo el mismo procedimiento experimental, la diferencia consistió en que las tres cinéticas fueron inyectadas al

instrumento en diferentes tiempos. La primer cinética se inyectó de forma inmediata a la culminación del tiempo de reacción, la segunda y tercer cinética fueron inyectadas a las 12 y 18 h posteriores, respectivamente. Las muestras que se inyectaron después de terminar la reacción fueron almacenadas en frío a una temperatura de -4 °C.

3 Resultados

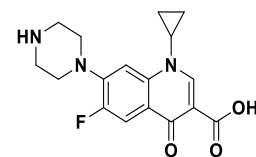
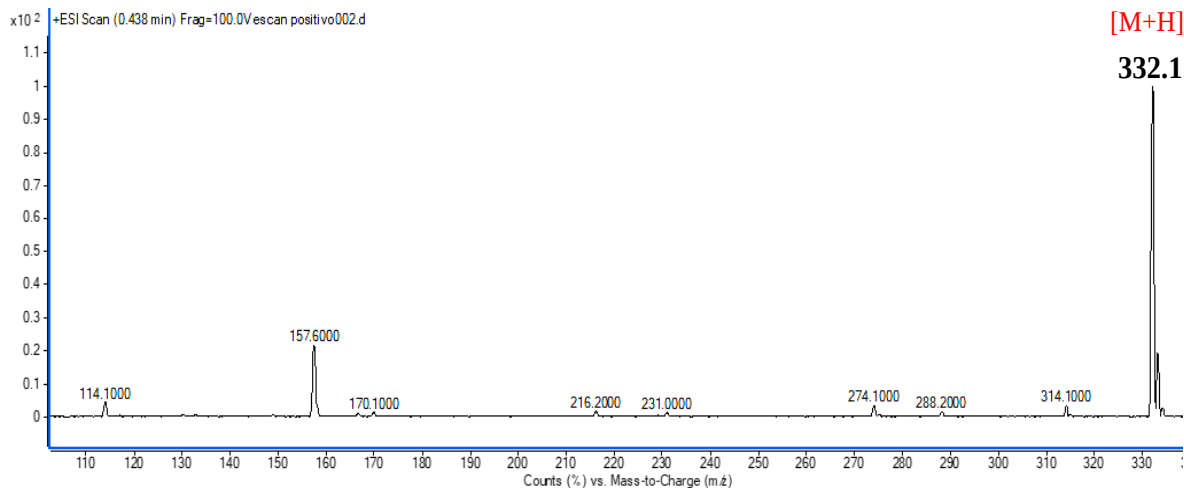
3.1 Establecimiento y optimización de las condiciones y parámetros experimentales del espectrómetro de masas para la identificación selectiva de ciprofloxacino

3.1.1 Identificación estructural y selección del ion fragmento específico de la molécula de ciprofloxacino

La identificación estructural de CPX utilizando el modo de ionización positivo (ESI +) operado en el modo de adquisición de barrido completo de iones (full SCAN) es mostrada en la Figura 1A. Este modo de ionización produjo como pico base; es decir, el ion fragmento más estable durante la fragmentación, al ion molecular $[M+H]^+=302.1$ m/z. La fragmentación específica del ion molecular ofrece la selectividad requerida para realizar el seguimiento de una reacción de fotodegradación de forma cuantitativa. Este ion fragmento ha sido previamente seleccionado por otros autores para realizar el seguimiento de la reacción (H. Yuan, 2021).

No obstante, durante la reacción de fotodegradación es normal que se produzcan subproductos que podrían interferir en un análisis; razón por la cual, se decidió utilizar el modo de adquisición de monitoreo de ion simple (SIM) con el objetivo de medir selectivamente el ion molecular y reducir notablemente las posibles interferencias durante el análisis, con ello, se logró medir exclusivamente la fragmentación 302.1 m/z (Figura 1B).

A)



B)

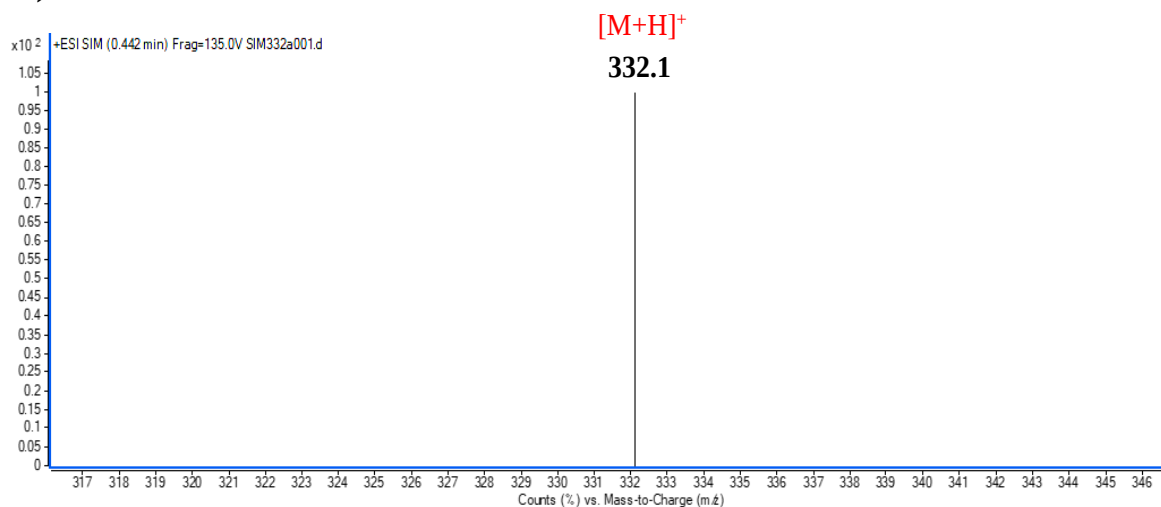


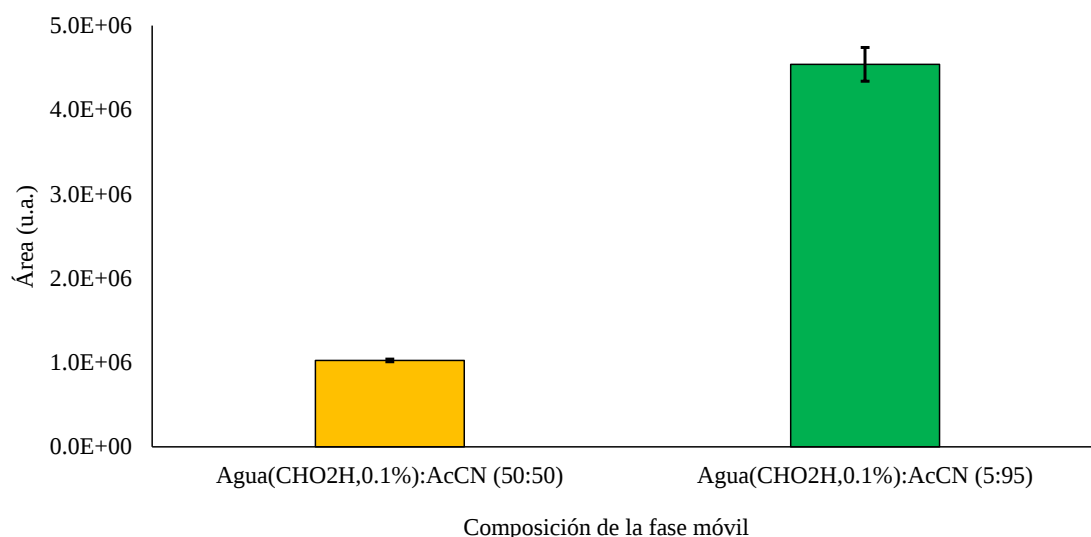
Figura 1. Espectros de masa correspondientes a la molécula de ciprofloxacino. A) Análisis de barrido completo de iones (full SCAN), B) Análisis de monitoreo de ion simple (SIM).

3.1.2 Optimización de los parámetros y condiciones instrumentales de cromatógrafo y espectrómetro de masas (CLAE-EM). Fase móvil, parámetros de fragmentación y volumen de inyección

3.1.2.1 Efecto de la fase móvil

Los resultados correspondientes a la evaluación de la fase móvil se muestran en la Figura 2. Como se puede observar, al incrementar el contenido de disolvente orgánico (acetonitrilo) en la fase móvil se promueve un incremento en el área del pico cromatográfico observado (Figura 2A). Además, se logró eluir el pico cromatográfico con un tiempo de retención de 4.4 min, lo que permite hacer una análisis de muestra en un periodo máximo de 5 min (Figura 2B).

A)



B)

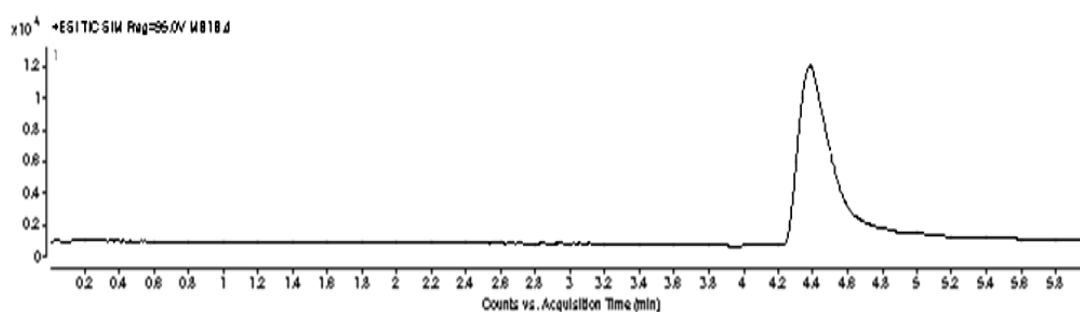


Figura 2. Efecto de la fase móvil en la elución cromatográfica del ciprofloxacino.

3.1.2.2 Efecto de los parámetros de fragmentación instrumentales CLAE-EM

Seleccionado el ion fragmento a seguir $[M-H]^+$ 302.1 m/z y establecida la fase móvil por utilizar, se optimizaron las condiciones instrumentales del espectro de masas que promueven un área de pico máxima (señal analítica), las cuales son mostradas en la Figura 3. En la Figura 3, se observa que el voltaje de fragmentación (Fig. 3A), la temperatura del gas de secado N_2 (Fig. 3B) y la presión del nebulizador (Figura 3C) son las variables que exhiben un mayor efecto en la señal analítica.

Con respecto al voltaje de fragmentación, se observa un comportamiento gaussiano, en donde la mayor señal analítica se obtiene entre los 95-100 °C. En contraste, tanto la temperatura del N_2 como la presión del nebulizador muestran un comportamiento proporcional al incremento en las magnitudes de sus respectivas variables, promoviendo un incremento en la señal analítica a los 350 °C y 30 psi, respectivamente. Mientras que el voltaje de aceleración se muestra como la variable más robusta del instrumento al exhibir un comportamiento constante entre los voltajes comprendidos entre 0-3 V, en donde presenta la mayor señal analítica (Figura 3D). Entretanto, no se observó una diferencia significativa en el intervalo de mediciones por segundo evaluados (Figura 3E).

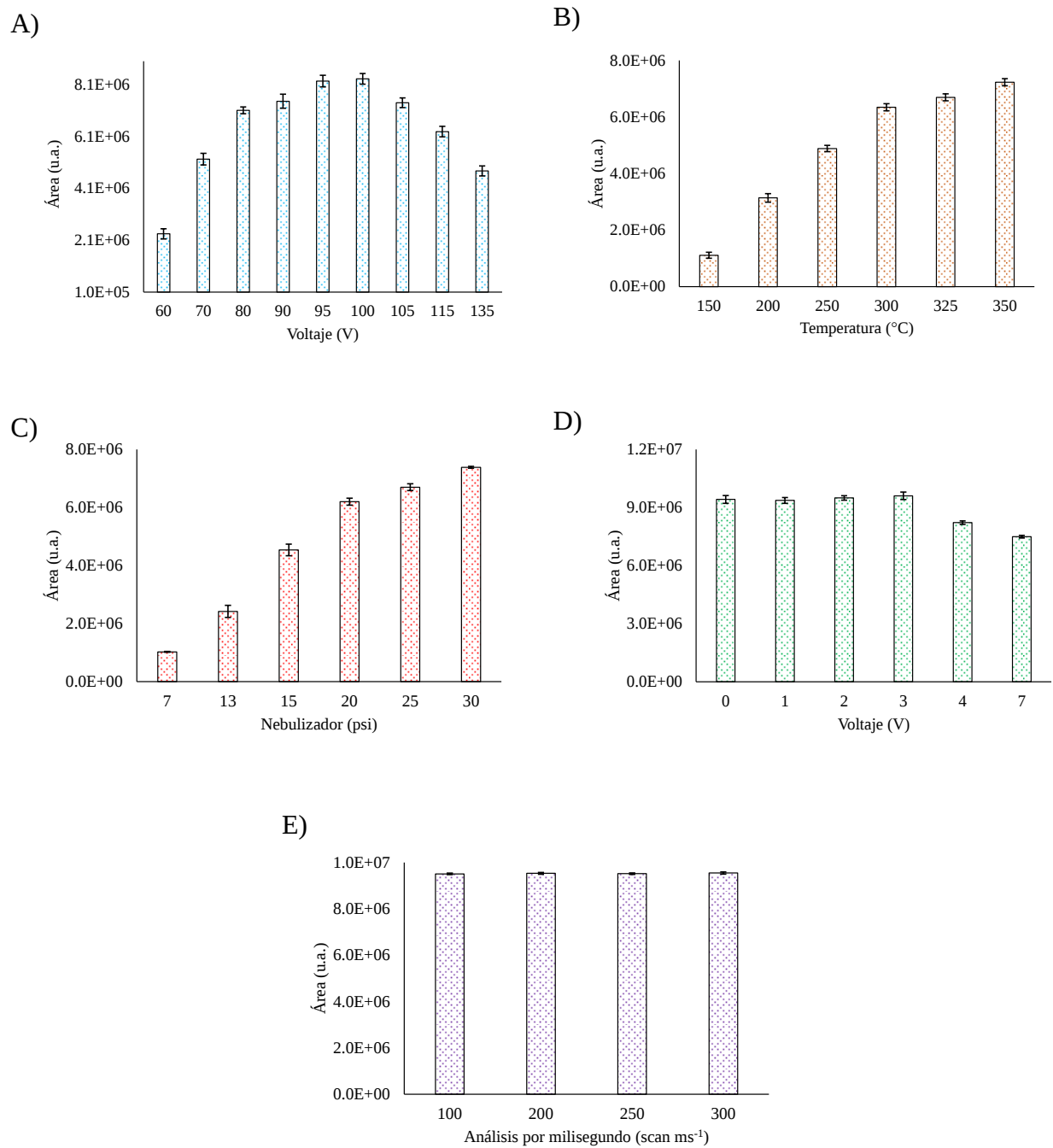


Figura 3. . Condiciones de operación óptimas del espectrómetro de masas. a) voltaje de fragmentación (V), b) temperatura del N₂ (°C), c) presión del nebulizador (psi), d) voltaje de aceleración (V) y e) Análisis por segundo (Dwell, ms⁻¹).

3.1.2.3 Efecto del volumen de inyección

El volumen de inyección es uno de los factores más importante por optimizar ya que promueve un incremento en la señal analítica al aumentar la cantidad de analito que puede ser ingresada al instrumento. No obstante, el ingreso de una mayor cantidad de muestra puede provocar la pérdida de simetría del pico cromatográfico, lo que se traduce en una mayor dispersión de los datos durante el análisis. En este sentido, en la Figura 4 se muestra el efecto del volumen de inyección sobre la respuesta analítica del instrumento.

Como se puede observar en la Figura 4, el área resultante muestra un comportamiento proporcional al volumen de inyección; sin embargo, es posible observar un sensible ensanchamiento del área del pico cromatográfico (Figura 4 A-D), este ensanchamiento aumenta el tiempo de residencia del analito en la columna cromatográfica, debido a una saturación en la columna provocada por el exceso de ciprofloxacino inyectado. Debido a esto, el volumen de inyección seleccionado debe brindar la mayor señal analítica y reducir el ensanchamiento del pico cromatográfico, razón por la que se seleccionó inyectar un volumen de 2 μL .

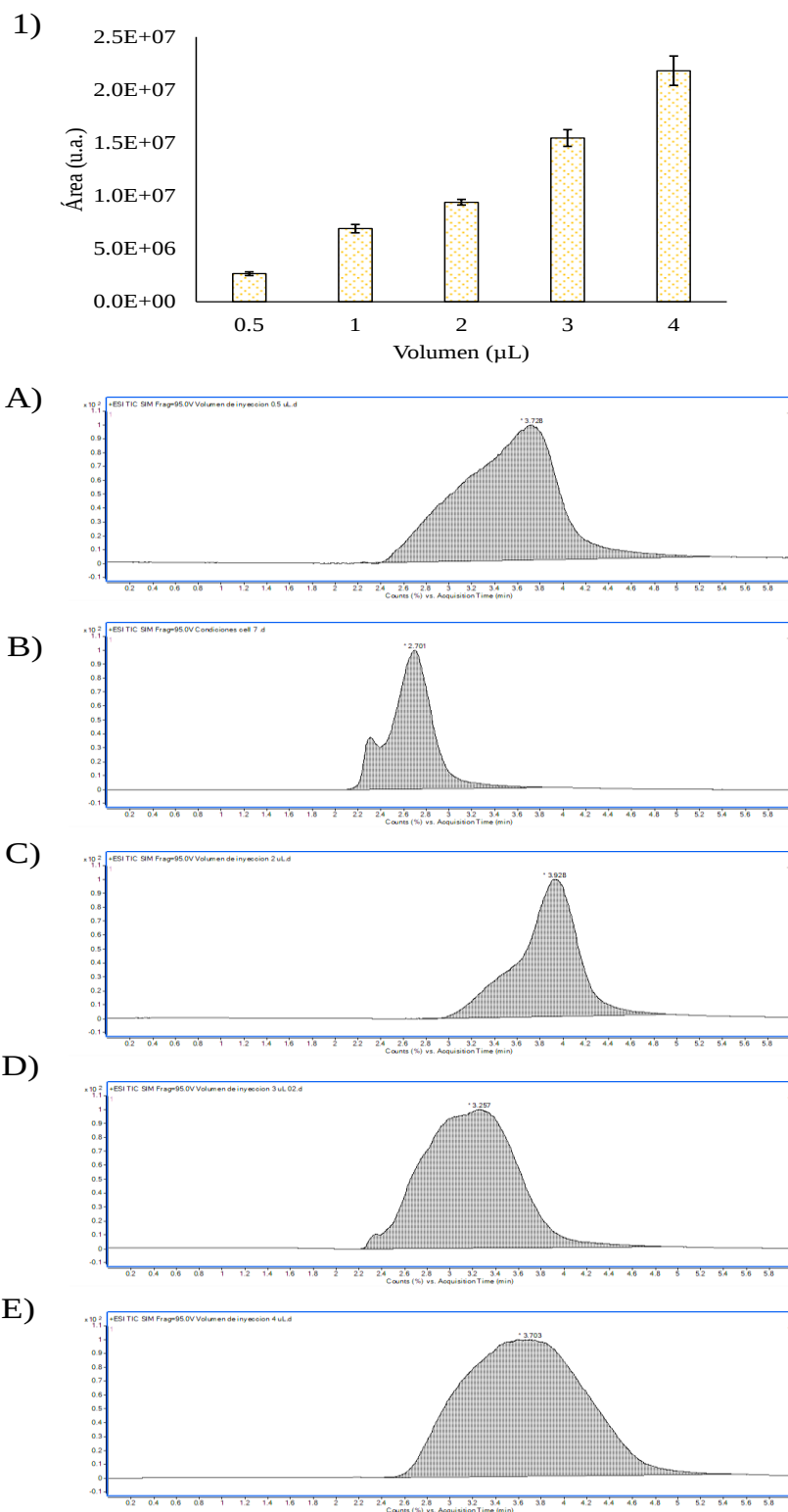


Figura 4. Selección del volumen de inyección cromatográfico. A) 0.5 μL , B) 1 μL , C) 2 μL , D) 3 μL y E) 4 μL .

3.1.3 Estabilidad del estándar analítico de ciprofloxacino

La estabilidad del estándar analítico de CPX debe ser considerada uno de los principales factores por evaluar al desarrollar el método de cuantificación, ya que, como se indicó en la metodología (Sección 2.1) este compuesto es susceptible a degradarse ya sea por fotólisis o por efecto de la temperatura. En la Figura 5, se muestran las cinéticas de degradación de CPX a lo largo de 12 h.

En las Figuras 5A y 5B se presenta el efecto de la fotólisis sobre las disoluciones del estándar analítico de CPX almacenadas en los frascos transparente y ámbar, respectivamente. En ambos casos se observa un decremento en la cantidad de ciprofloxacino (determinada de forma semicuantitativa a través de las unidades de área) a lo largo del tiempo conforme la luz de la lámpara incide en la disolución, siendo el vial transparente el que presentó el mayor efecto de fotólisis, exhibiendo una reducción >50%, mientras que en el frasco ámbar la reducción fue del 40%. Estos resultados sugieren que el frasco ámbar es un mejor material para almacenar la disolución de CPX, lo cual se puede constatar al comparar la degradación de CPX en ambos frascos cuando no existe fotólisis (Figura 5C). Con base en lo anterior, es evidente que la opacidad producida por el frasco ámbar reduce la degradación de CPX, no obstante, en este último caso la degradación de CPX es atribuida a la temperatura del ambiente (20-23 °C).

El efecto de la temperatura del ambiente sobre la cantidad de CPX almacenada en frascos ámbar sometidos a diferentes temperaturas se muestra en la Figura 5D, donde: se observa que en las dos temperaturas evaluadas (-4 y 21 °C) existe un decremento en el área obtenida, sin embargo, la temperatura de -4 °C mostró una reducción comprendida entre 5-7%, mientras que a los 21 °C la degradación fue superior, dentro del intervalo del 9-11 %.

Con base en los resultados, se estableció que las mejores condiciones de almacenamiento es cuando la muestra se guarda en un frasco ámbar, alejado de cualquier fuente de luz y refrigerado a -4 °C. Asimismo se puede concluir, que para utilizar una disolución patrón de CPX en un proceso de cuantificación, es mejor hacerlo con una disolución fresca que no exceda un tiempo de preparación de 6 horas.

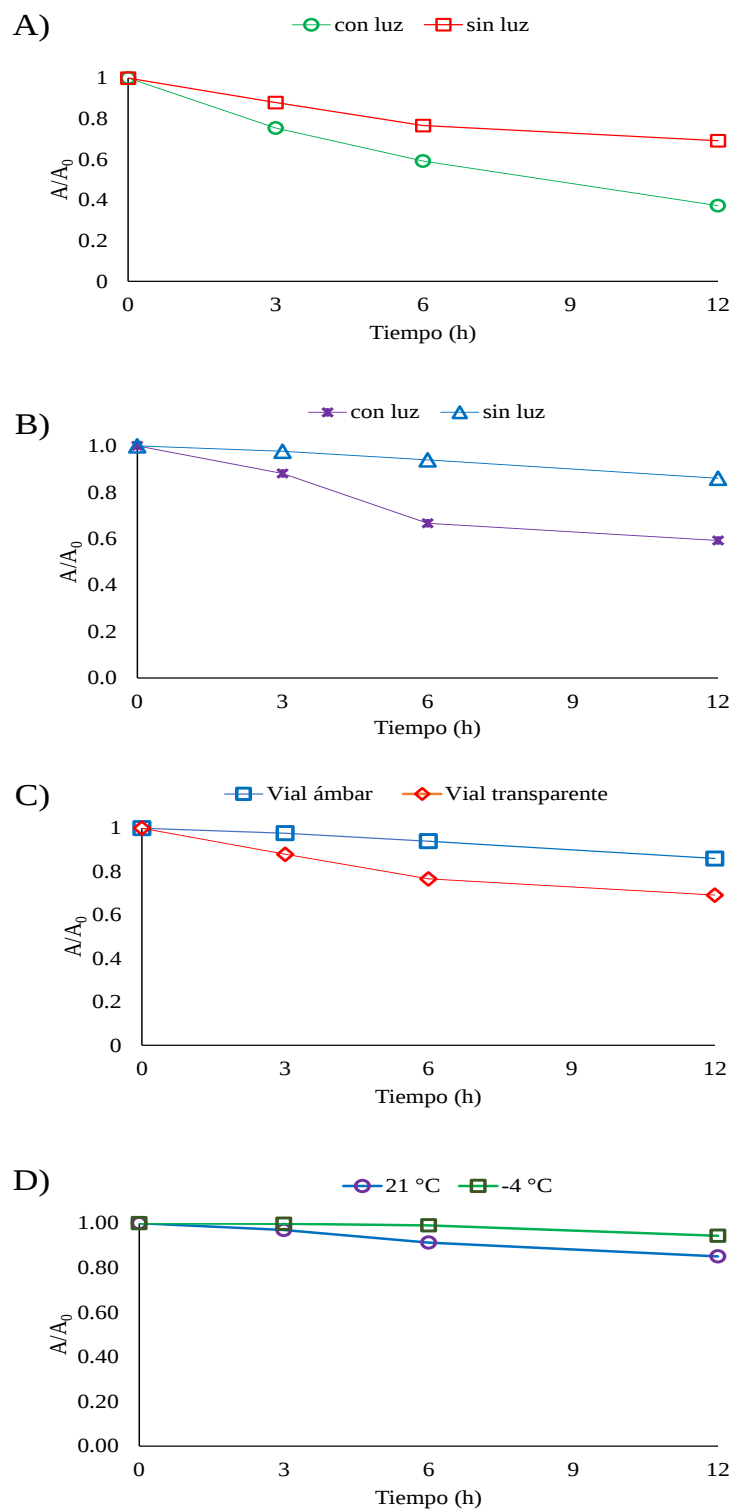


Figura 5. Cinéticas de degradación de ciprofloxacino en función del tiempo (experimentos de fotólisis). A) frasco transparente, B) frasco ámbar, C) comparación entre frascos transparente y ámbar sin luz, D) efecto de la temperatura.

3.2 Desarrollo y validación del método de cuantificación de ciprofloxacino en agua

3.2.1 Linealidad

La inspección visual del gráfico de concentración contra área obtenida se presenta en la Figura 6. En la Figura 6A se observa que el CPX no exhibe una linealidad constante dentro del intervalo de 0.001-60 mgL⁻¹, ya que, cuando la concentración de CPX es superior a 10 mgL⁻¹, la linealidad se abate ligeramente en un factor de 1.3. No obstante, es posible diferenciar 2 intervalos de concentración diferentes que presentan un cambio de pendiente, el primero está comprendido entre 0.05-10 mgL⁻¹ y el segundo de 20-60 mgL⁻¹, tal como se muestran en las Figuras 1B y 1C.

Ambos intervalos lineales mostraron coeficientes de correlación (r) ≥ 0.99 demostrando así la existencia de una buena correlación lineal entre la concentración y el área obtenida. Esta linealidad se comprobó al evaluar el valor de los residuales para cada nivel de concentración tratado en ambos intervalos (Figura 7); en donde, la distribución aleatoria de los residuos confirma la linealidad de ambos intervalos lineales evaluados (Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, 2015). Bajo este contexto en la Tabla 4 se presentan las ecuaciones de la recta determinadas para calcular la concentración de ciprofloxacino en agua.

Tabla 4. Parámetros de desempeño de linealidad evaluados en la determinación de CPX en agua.

Parámetros de desempeño (linealidad)	Intervalo lineal evaluado	
	0.05-10 mgL ⁻¹	20-60 mgL ⁻¹
Ecuación de la recta	$Y=784732 \cdot \text{Conc} + 51372$	$Y=593693 \cdot \text{Conc} - 436924$
Pendiente (m)	784732 ± 16217	593693 ± 25634
Ordenada (b)	51372 ± 7655	-436924 ± 111738
Coeficiente de correlación (r)	0.999	0.998

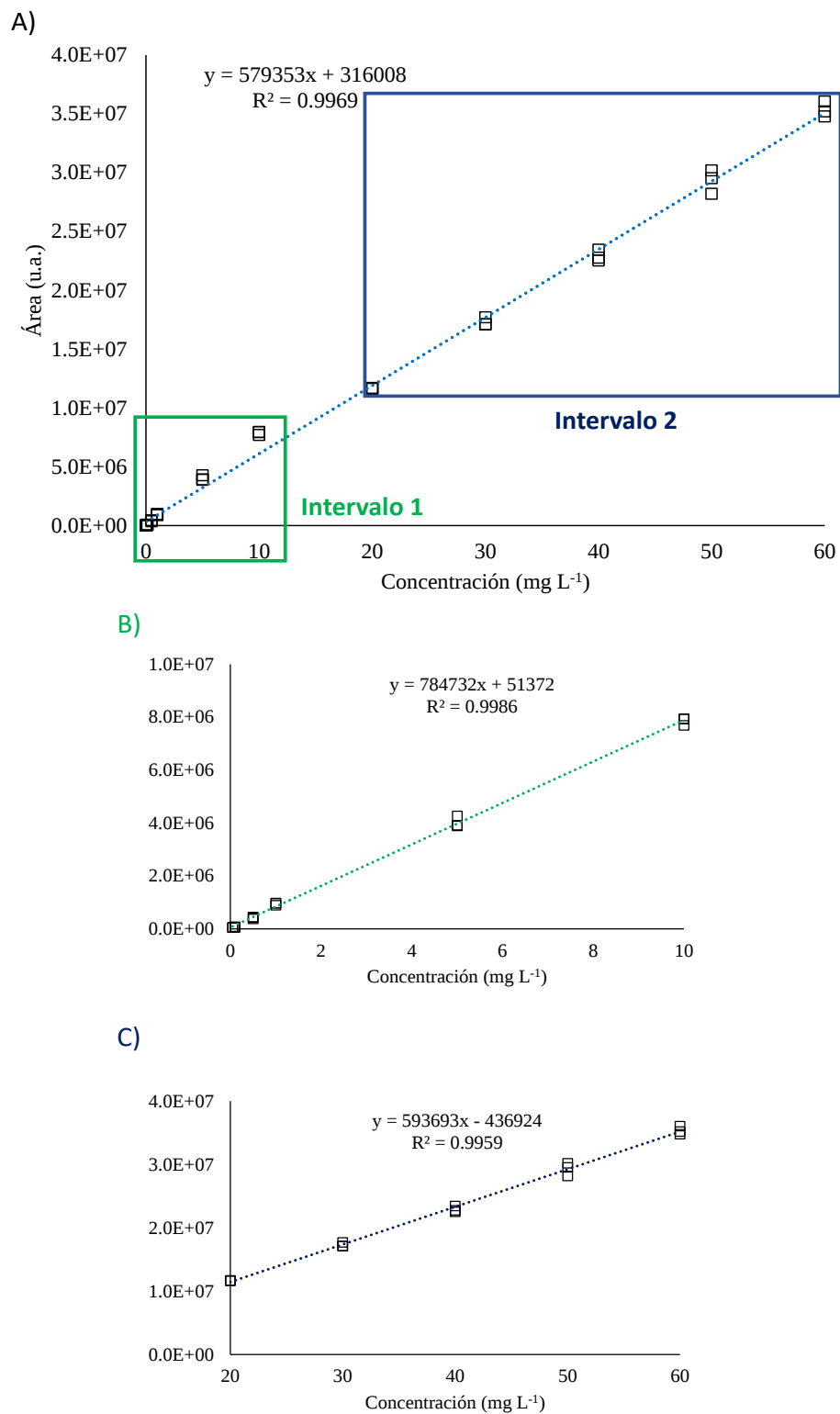


Figura 6. Intervalos lineales de concentración para la determinación de ciprofloxacino en agua. A) intervalo (0.05-10 mgL⁻¹), B) intervalo (20-60 mgL⁻¹).

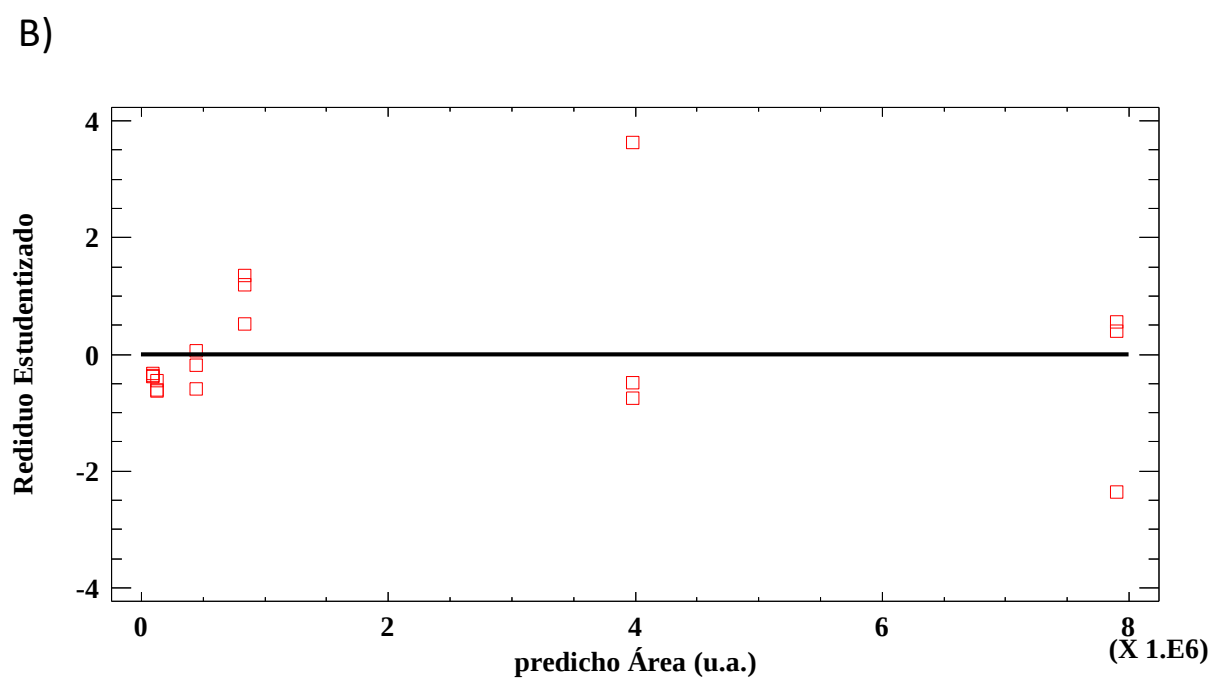
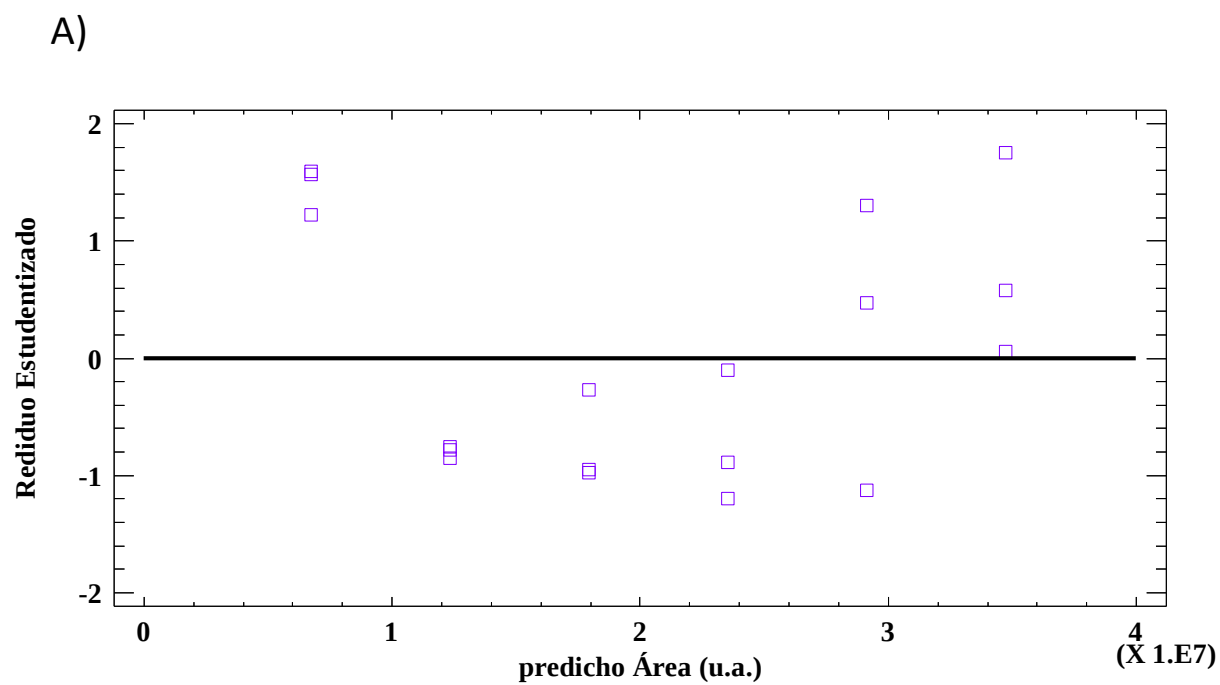


Figura 7. Gráficos de residuales. A) intervalo (0.05-10 mgL⁻¹), B) intervalo (20-60 mgL⁻¹).

3.2.2 Precisión

Los resultados de precisión (medidos en %RSD) para los dos intervalos de trabajo lineales evaluados son mostrados en la Tabla 5. En los dos intervalos de concentración se determinaron desviaciones estándar relativas menores al 5 %, magnitudes que de acuerdo con (Taverniers, 2004) y la (Comisión de Control Y Ampliación de Cobertura CCAyAC, 2020) son aceptables para un nivel de concentración de partes por millón. Asimismo, la menor variación se observó en la parte intermedia de la curva de calibración; en contraste, las variaciones más altas se observaron al extremo de ambas curvas de calibración.

Tabla 5. Cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) para los intervalos 0.05-10 y 20-60 mgL⁻¹.

Intervalo evaluado	Nivel de concentración evaluado (mgL ⁻¹)	%RSD
0.05-10 mgL ⁻¹	0.05	2.8
	1	1.2
	10	3.1
20-60 mgL ⁻¹	20	2.4
	40	1.8
	60	3.6

3.2.3 Límites de detección

El límite de detección se calculó empleando los criterios mencionados en la sección 2.4.2, los resultados están descritos en la Tabla 6 y 7. Tal como se presenta en la tabla 6, las 3 concentraciones evaluadas fueron detectadas en el instrumento utilizado, sin embargo, solamente las concentraciones 0.001 y 0.005 mgL⁻¹ cumplieron con los dos criterios establecidos para observar la cantidad mínima detectable con precisión. Bajo este contexto, la concentración de 0.001 mgL⁻¹ fue seleccionada como el límite de detección del método de cuantificación ya que cumple con los criterios de aceptación establecidos por la (Comisión de Control Y Ampliación de Cobertura CCAyAC, 2020) y (Morillas, 2017).

Tabla 6. Precisión del método de cuantificación de ciprofloxacino en agua.

Precisión	Concentración (mgL ⁻¹)		
	0.0005	0.001	0.005
SNR	2.6	3.1	6.9
	2.1	3.6	7.1
	2.9	3.5	6.5
SNR (promedio)	2.5	3.4	6.8
(%RSD)	8.4	4.3	3.7

*SNR= Relación Señal/Ruido (criterio 1, la SNR ≥ 3), (criterio 2, %RSD ≤ 5 %)

Tabla 7. Concentración calculada del Límite de detección.

Concentración (mgL ⁻¹)	Área de CPX (u.a.) (n=7)							Media del área (u.a.)	Desviación estándar (σ)
0.001	18571	10550	18941	15018	15633	13845	12440	15426	3065
Límite de detección (LD)									
Concentración LD (mgL ⁻¹)		0.001							

3.2.4 Límites de cuantificación

Se seleccionaron dos límites de cuantificación, uno para cada intervalo lineal observado, siempre y cuando cumplan los criterios descritos en la sección 2.4.3. Bajo este contexto, las concentraciones de 0.05 mgL⁻¹ (dentro del intervalo 0.05-10 mgL⁻¹) y 20 mgL⁻¹ (en el intervalo 20-60 mgL⁻¹) exhibieron valores altamente precisos (%RSD < 5%) y cumplen con los parámetros de linealidad aceptables. Motivo por el cual fueron seleccionados como los límites de cuantificación para cada curva de calibración evaluada.

Finalmente, en la Tabla 8 se resumen los parámetros de desempeño del método validados para la determinación de ciprofloxacino en agua.

Tabla 8. Parámetros de desempeño validados para la determinación de CPX en agua.

Parámetro de desempeño establecidos	Intervalos de concentración (mg L⁻¹)	
	0.05-10	20-60
Intervalo lineal de trabajo	0.05-10	20-60
Límite de detección (LD)	0.001	
Límite de cuantificación (LC)	0.05	20
Precisión (%RSD)	1.2-3.1	1.8-3.6

3.3 Evaluación del desempeño del método en la cuantificación de CPX en reacciones de degradación fotocatalítica.

3.3.1 Primera etapa. Evaluación de la repetibilidad del método en reacciones de degradación fotocatalítica.

La curva de calibración validada en el método de cuantificación desarrollado se utilizó para hacer el seguimiento de la degradación de ciprofloxacino en agua. Los resultados de las concentraciones calculadas y el gráfico de las cinéticas construidas se muestran en la Tabla 9 y Figura 8. En la Tabla 9 se puede observar que, para las tres cinéticas de degradación evaluadas de forma independiente, las desviaciones estándar oscilan entre 0.03-0.44 unidades y son sustancialmente menores con respecto a sus valores medios, esto demuestra que el método opera en condiciones adecuadas para analizar las muestras de ciprofloxacino en agua sin ocasionar errores que pudieran conducir a un mal resultado.

Esta afirmación se comprueba visualmente al observar las cinéticas de degradación (Figura 8), en donde, se observa que a cada nivel de concentración evaluado en función del tiempo no hay desviaciones en las tendencias producidas por la degradación catalítica.

Tabla 9. Concentraciones de ciprofloxacino calculadas en reacciones de degradación.

Tiempo	Concentración (mgL ⁻¹)			X	σ
	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3		
0	27.5	27.2	27.0	27.23	0.24
5	24.7	24.5	25.1	24.78	0.30
10	23.9	23.7	23.3	23.63	0.30
15	21.9	21.2	21.4	21.49	0.35
30	22.6	22.2	22.5	22.42	0.19
45	19.9	19.4	19.6	19.62	0.23
60	18.2	17.7	18.0	17.98	0.26
90	10.7	11.3	10.5	10.84	0.42
120	7.33	7.80	8.20	7.78	0.44
180	4.39	4.27	4.00	4.22	0.20
240	1.50	1.42	1.48	1.47	0.04
300	0.65	0.70	0.67	0.67	0.03

X= Media, σ= desviación estándar

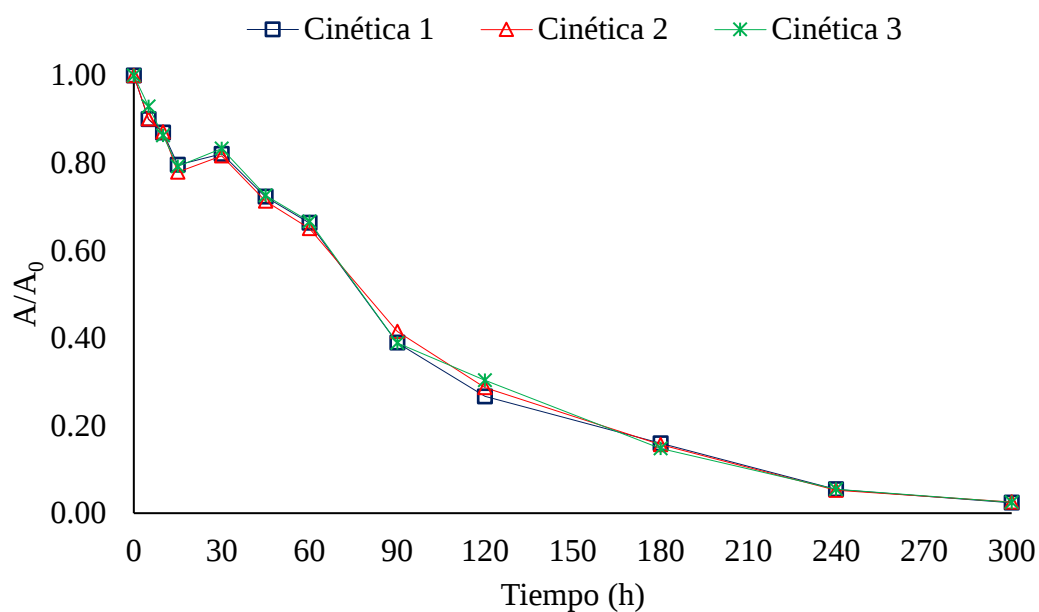


Figura 8. Cinéticas de degradación de ciprofloxacino en agua en tres reacciones independientes.

3.3.2 Segunda etapa. Estabilidad de las muestras de CPX después de una reacción de degradación

La estabilidad del ciprofloxacino presente en las muestras después de implementar una reacción de degradación se evaluó a diferentes horas de análisis (0, 12 y 18 h). Como es posible observar en la figura 9, si las muestras son inyectadas 12h después de haberlas generado se observa un decremento importante en la concentración de CPX determinada mediante el método. Esto puede ser ocasionado por 1) la degradación continua del ciprofloxacino (tal como se observó en la evaluación de la estabilidad de los estándares analíticos del compuesto, sección 3.1.3) y 2) posiblemente, existan especies reactivas en la disolución que continúan con la reacción de degradación tales como los grupos radicales hidroxilo $\text{OH}^\bullet$ que promueven la hidrólisis de la molécula en el medio acuoso.

Derivado de este estudio, se puede concluir que las muestras deberán ser inyectadas al instrumento analítico a la brevedad. Por lo que debe coordinarse el tiempo de experimentación entre la reacción de degradación fotocatalítica y el análisis de las muestras.

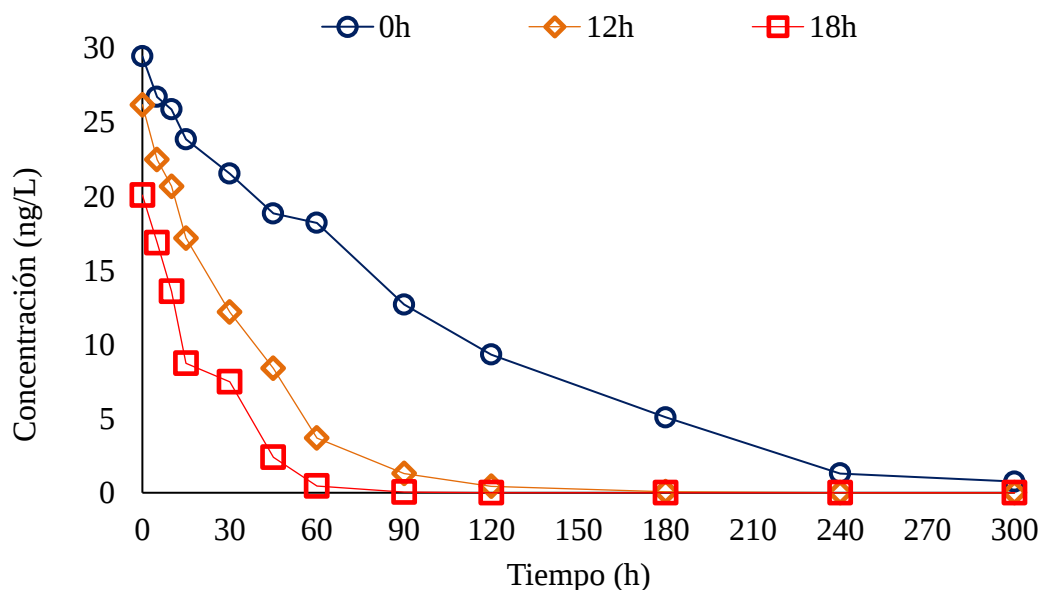


Figura 9. Concentraciones de CPX calculadas después de aplicar una reacción de degradación a diferentes tiempos de inyección

4 Conclusiones

El método de cuantificación de ciprofloxacino en agua Mili-Q se validó satisfactoriamente de acuerdo con la guía nacional CCAYAC-CR-03/1 dentro del intervalo de concentraciones comprendido entre 0.05 y 60 mgL⁻¹. Mediante el uso de dos curvas de calibración, una enfocada en calcular las concentraciones más bajas (0.05-10 mgL⁻¹) y otra en concentraciones elevadas (20-60 mgL⁻¹). El método desarrollado es robusto y eficiente para analizar cambios en la concentración de ciprofloxacino productos de reacciones de degradación fotocatalítica.

Los estudios de estabilidad del ciprofloxacino en la disolución patrón sugieren que, para el almacenamiento de los estándares analíticos, estos deberán guardarse en refrigeración a -4 °C, utilizando viales color ámbar y sin exponerse a la luz. Esto, con el fin de obtener curvas de calibración confiables para una determinación analítica.

Los estudios de estabilidad de las concentraciones de ciprofloxacino después de recibir un procedimiento de degradación indican que las muestras deberán ser evaluadas a la brevedad, en un periodo menor de al menos 12h. Esto, con el fin de reducir la degradación de las muestras después de aplicarse un proceso de fotodegradación.

5 Bibliografía

Anquetin, G., Greiner, J., Mahmoudi, N., Santillana-Hayat, M., Gonzalbes, R., Farhati, K., Derouin, F., Aurby, A., Cambau, E., Vierling, P., 2006. Design synthesis and activity against *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., and *Mycobacterium tuberculosis* of new 6-fluoroquinolones. *Journal of Medical Chemistry*, pp. 1478-1493.

Brunner, M. Langer, O., Dobrozemsky, G., Müller, U., Zeitlinger, M., Mitterhauser, M., Wadsak, W., Dudzack, R., Kletter, K., Müller, M., 2004. 18[F]Ciprofloxacin, a New Positron Emission Tomography Tracer for Noninvasive Assessment of the Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Ciprofloxacin in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 3850-3857.

Comisión de Control Y Ampliación de Cobertura CCAYAC, C., 2020. *CRITERIOS PARA LA VALIDACIÓN INTERNA Y CONFIRMACIÓN DE MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS*. Ciudad de México(Ciudad de México): COFEPRIS.

D'Antonio, D., Piccolomini. R., Iacone, A., Fioritoni, G., Parruti, G., Betti, S., Quaglietta, A. M., Accorsi, P., Dell'Isolla, M., Favalli, C., 1994. Comparison of ciprofloxacin,

ofloxacin and pefloxacin for the prevention of the bacterial infection in neutropenic patients with haematological malignancies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pp. 837-844.

Girardi, C. Greve, J., Lamshöft, M., Fetzner, I., Miltner, A., Schäffer, A., Kästner, M., 2011. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*, pp. 22-30.

Yuan, H., Yu, S., Chai, G., Liu, J., Zhou, Q., 2021. A LC-MS/MS method for simultaneous analysis of the cystic fibrosis therapeutic drugs colistin, ivacaftor and ciprofloxacin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(6), pp. 732-738.

J. C. Durán-Álvarez, Mendez-Galván, M., Lartundo-Rojas, L., Rodríguez-Varela, M., Ramírez-Ortega, D., Guerrero-Araque, D., Zanella, R., 2019. Synthesis and Characterization of the All Solid Z-Scheme Bi₂WO₆/Ag/AgBr for the Photocatalytic Degradation of Ciprofoxacin in Water. *Topics in Catalysis*, Volumen 62, p. 1011–1025.

Marschall, R., 2014. Semiconductor Composites: Strategies for Enhancing Charge Carrier Separation to Improve Photocatalytic Activity. *Advanced Functional Materials*, Volumen 24, pp. 2421-2440.

Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores., 2017. *Guía Eurachem: La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos-Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Eurachem: Eurolab España.

Prabodh Chander Sharma, A. J. S. J. R. P. & M. S. Y., 2010. Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(4), pp. 577-589.

PubChem, 2004. *Pubchem*. [En línea] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>

Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele., E., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 8(23), p. 535–552.