

Research Article

Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonídeos

Cristian Aguilera¹, Carlos Herrera¹ & Jorge Ponce²

¹Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción
Casilla 297, Concepción, Chile

²Centro Tecnológico del Salmón (CETECSAL), Ruta 5 Sur Km 1170, Castro, Chile

RESUMEN. Se implementa y valida un método para identificar y cuantificar la oxitetraciclina en músculo de salmón, cuantificar los niveles de recuperación de oxitetraciclina y estudiar su fármaco cinética en diferentes órganos de salmones. La implementación correspondió a la detección y cuantificación de residuos del antibiótico en el tejido muscular de salmonídeos. El principio de la metodología HPLC incluyó la determinación de una serie de soluciones representativas de los estándares utilizados en la fortificación de las muestras. El tiempo de retención fue de 5,7 min. La validación del método, busca confirmar y documentar que los resultados entregados por el método implementado sean confiables. Para esto se llevaron a cabo análisis de parámetros tales como: selectividad, precisión, exactitud, sensibilidad e incertidumbre. Los resultados obtenidos señalan que el porcentaje de recuperación, es de un 96%. El coeficiente de correlación (R^2) de la curva de calibrado es 0,9946 y el coeficiente de variación 1,86%.

Palabras clave: HPLC, oxitetraciclina, salmonídeos, metodología, validación, Chile.

Implementation, validation, and application of a new HPLC method to determine oxytetracycline in salmonid muscle tissue

ABSTRACT. A method for identifying and quantifying oxytetracycline in salmon muscle, for quantifying oxytetracycline recovery levels, and for studying its pharmacokinetic in different organs of salmonids was implemented and validated. During implementation, antibiotic residues were detected and quantified in salmon muscle tissue. The principle of the HPLC methodology included determining a series of representative solutions of the standards, used to fortify the samples. The retention time was 5.7 min. The validation of the method sought to confirm and document the reliability of the results obtained with this method. For this, several parameters (selectivity, precision, accuracy, sensitivity, uncertainty) were analyzed. The results obtained indicated 96% recovery. The coefficient of correlation (R^2) of the calibration curve was 0.9946 and the coefficient of variation was 1.86%.

Keywords: HPLC, oxytetracycline, salmon, method, validation, Chile.

Corresponding author: Cristian Aguilera (caguilerapinto@gmail.com)

INTRODUCCIÓN

Chile ha experimentado durante la última década una tendencia al crecimiento en la producción de salmones y truchas desde una cifra de exportación de 207.000 ton el año 2000 a 445.000 ton el año 2008 (SalmonChile, 2009). La producción está destinada principalmente al mercado externo y de esta manera el país se ha convertido en el segundo exportador a nivel mundial, después de Noruega (Doren, 2001).

Junto con el desarrollo de la salmonicultura en Chile, se inició el uso de antibióticos y quimioterápicos en el tratamiento de enfermedades que aparecen como consecuencia de una producción intensiva (Gesche *et al.*, 2004). Dos son las familias de antibióticos más utilizadas como agentes antibacterianos, la primera las quinolonas, la cual incluye medicamentos tales como: el ácido oxolínico y la flumequina; y la segunda corresponde a la familia de las tetraciclinas. El principal antibiótico pertene-

ciente a esta agrupación y que se utiliza para el control de microorganismos es la oxitetraciclina.

Las tetraciclinas fueron descubiertas en 1945 por Benjamín Duggar, luego se sucedieron nuevos descubrimientos de antibióticos similares en su origen y efectos, reunidos todos con el nombre de tetraciclinas, que se caracterizan por tener una estructura común de octahidronaftaceno formado por cuatro anillos condensados y por su amplio espectro de actividad. Su estructura general y configuración absoluta posee varios centros asimétricos.

La oxitetraciclina es un antibiótico de amplio espectro, es decir activa frente a dos o más grupos microbianos (Ingraham & Ingraham, 2004). Los gérmenes sensibles son: gonococos, *Hemophilus ducreyi*, Brucella, Shigellas, Rickettsias, *Mycoplasma pneumoniae*, Micoplasmas, Chlamydias, *Ureaplasma urealyticum*. No actúa sobre *Pseudomonas*, *Proteus*, cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiellas*, *Enterobacter* y *Haemophilus Influenzae* (Martínez, 1997).

Con respecto al mecanismo de acción, se puede enunciar que inhiben la síntesis proteica bacteriana por su unión reversible a la unidad ribosomal 30S y de esta forma bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo ribosoma-RNA. Adicionalmente las tetraciclinas también se unen reversiblemente a la subunidad 50S. Existe también evidencia que sugiere que las tetraciclinas alteran la membrana citoplasmática de organismos susceptibles, permitiendo la salida de componentes intracelulares. A altas concentraciones las tetraciclinas también inhiben la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos. Cabe mencionar que la oxitetraciclina para usos veterinarios puede ser inyectable o agregada al alimento. Esta última forma, por problemas logísticos, de la primera, es la más utilizada en cultivos. El empleo de antibacterianos en la acuicultura, conlleva la posibilidad de retención de residuos de estos fármacos en el producto final y consecuentemente, el riesgo de provocar transferencia no deseada al consumidor (Booth & Mc Donald, 1988).

De lo anterior se hace necesario que se desarrollen metodologías para la determinación del fármaco y de esta forma garantizar que el producto final se encuentre bajo los niveles que exigen las normas japonesas o de la comunidad europea. Por esta razón, en el país impulsados por la garantía de calidad del producto de exportación, se ha puesto énfasis en la determinación de residuos de antibacterianos en productos pesqueros (Gesche *et al.*, 2001). Para la detección de residuos de inhibidores de microorganismos en alimentos se han desarrollado variadas técnicas físicas, químicas e inmunológicas que hacen uso de materiales y equipos especializados,

permitiendo, además de la identificación, la cuantificación del antibacteriano extraído del alimento (Silva & Anhalt, 1980).

Considerando la importancia de la salmonicultura en Chile y su relevancia en los mercados internacionales, se hace necesario que se cuente con una metodología adecuada, para la cuantificación de la oxitetraciclina en la matriz muscular de salmonídeos y como prueba de su efectividad, desarrollar la validación de dicha metodología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación del antibiótico oxitetraciclina Merck 99% de pureza, se utilizó un equipo HPLC Merck Hitachi, con bomba cuaternaria e inyector automático. La separación fue realizada utilizando una columna LichroCART® 250-4 HPLC Merck. Para mostrar la presencia del analito se empleó un detector UV-VIS modelo L-7420 LaChrom. La longitud de onda de máxima absorción se determinó utilizando un espectrofotómetro Gilford, modelo Stasar III, con resolución de 1 nm y lectura digital con 0,001 unidades de absorbancia. El método utilizado en este trabajo, para calcular los límites de detección y de cuantificación, consistió en multiplicar por 3 y por 10 respectivamente las desviaciones estándar del blanco, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Límite de detección} : (Y_{bl} + 3 S_{bl})/b * (1/\sqrt{n})$$

$$\text{Límite de cuantificación} : (Y_{bl} + 10 S_{bl})/b * (1/\sqrt{n})$$

Donde:

Y_{bl} = estimado de la respuesta del blanco

S_{bl} = desviación estándar del blanco

b = pendiente de la curva de calibrado

El método implementado, consiste en extraer la oxitetraciclina a partir de $5 \pm 0,0001$ g de matriz muscular fortificada de salmonídeos, en proporción músculo: piel 92:8, con 20 mL de solución extractante Mc Ilvaine pH $4,0 \pm 0,5$. La mezcla se procesa en disruptor celular Ultra-Turrax IKA Labortechnik T25 Basic a 8.000 rpm por un tiempo de 3 min. A continuación el homogenizado se centrifuga a 4.000 rpm por un tiempo de 20 min en centrífuga BOECO Germany C-28 A, el sobrenadante se trasvasija a tubos plásticos de 50 mL. Al residuo sólido se le añaden 10 mL de solución extractante tampón citrato/fosfato (McIlvaine), pH 4,0 recientemente preparada, se vuelve a procesar en el disruptor Ultra-Turrax y se centrifuga en idénticas condiciones a las anteriores. Al sobrenadante obtenido (aproximadamente 30 mL) se agregan 2 mL de ácido tricloro acético para análisis Winkler al 10% y se deja reaccionar por 30 min en

frío y oscuridad, con el fin de desnaturalizar las proteínas presentes en la matriz.

A continuación se realiza una segunda centrifugación de 3.000 rpm por 15 min, el nuevo sobrenadante se eluye por columnas de extracción sólido-líquido Waters, Oasis HLB (lipofílica-hidrofílica) de 3 mL, previamente activadas por el paso de 1 mL de metanol para análisis Winkler y equilibradas por el paso de 1 mL de agua calidad HPLC y recibidos en tubos de plástico de 15 mL dispuestos en una cámara de vacío Visiprep Supelco, conectada a una bomba de vacío Medi-Pump modelo 1136. Una vez eluida la muestra se renueva los tubos de 15 mL y se hace pasar por las columnas 6 mL de ácido oxálico para análisis 0,01 M, con el objetivo de extraer el antibiótico que fue separado de la matriz en estas columnas. El líquido recibido se trasvasija a un matraz redondo y se concentra en rotavapor Buchi a 60°C hasta sequedad. La reconstitución de la muestra se realiza con 2 mL de fase móvil ácido oxálico-2-hidrato para análisis Winkler 0,01M: acetonitrilo grado HPLC, Fischer Scientific (80:20) y finalmente, se inyecta al HPLC.

RESULTADOS

Con respecto a la validación de la metodología implementada para la detección y cuantificación de la oxitetraciclina en tejido muscular de salmonídeos, se realiza por medio de fortificaciones de la matriz en estudio, utilizando estándar de oxitetraciclina marca Sigma 99% de pureza. Los resultados obtenidos mostraron que la longitud de onda de máxima absorción (λ máximo), para la presente metodología correspondió a 365 nm (Fig 1). Esta es la longitud de onda de trabajo utilizada en el detector UV-VIS del equipo HPLC.

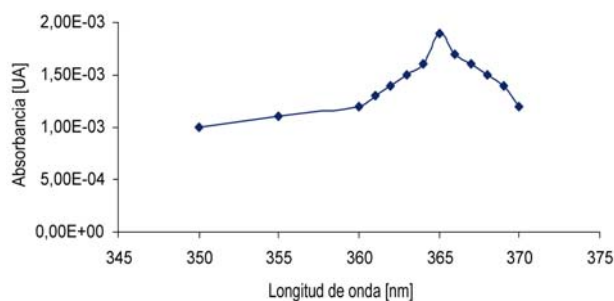


Figura 1. Espectro de absorción de la oxitetraciclina, para la determinación del λ máximo a 365 nm.

Figure 1. Absorption spectra of oxytetracycline for the determination of λ maximum at 365 nm.

Con respecto a las condiciones cromatográficas, que se seleccionaron para el desarrollo de la metodología se indica que luego de haber realizado un estudio previo, para determinar la óptima composición de fase móvil se obtuvo la relación siguiente: ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo (80:20). La velocidad de flujo óptima, para la metodología en implementación fue de 1 mL min⁻¹. El tiempo de retención encontrado para la oxitetraciclina en la matriz muscular fue de 5,7 min (Fig. 2). La curva de calibrado comprendió valores de entre los 5×10^{-5} y los 5×10^{-4} g kg⁻¹, obteniéndose un R² de 0,9946 (Fig. 3, Tabla 1). El porcentaje de recuperación obtenido (promedio) fue de un 96,9% con un SD de 1,8 y un RSD de 1,86 (Tabla 2). La repetibilidad del método indicó como resultado un $8,45 \times 10^{-5}$ con un SD de 4,35 y un RSD de 5,14 (Tabla 3). La repetibilidad sobre el sistema fue de $7,34 \times 10^{-5}$ y tuvo un SD 0,31 y un RSD de 0,43 (Tabla 3). El límite de detección, vale decir la mínima concentración que causará efecto alguno durante el análisis fue de $5,86 \times 10^{-6}$ g kg⁻¹ (Tabla 4) y se determinó vía 3 veces el tiempo de retención del estándar de concentración menor. Además, el límite de cuantificación, o sea la mínima cantidad informada en la aplicación del método fue de $1,95 \times 10^{-5}$ g kg⁻¹ (Tabla 4). La incerteza combinada y expandida fue de 3,6521 y 7,3042 respectivamente (Tabla 5).

DISCUSIÓN

Es necesario señalar que el método propuesto, presenta ventajas sobre el desarrollado por Meinertz *et al.* (1998), estas ventajas son discutidas a continuación y hacen referencia a que el nuevo método presenta una mayor sensibilidad con respecto al ya establecido y

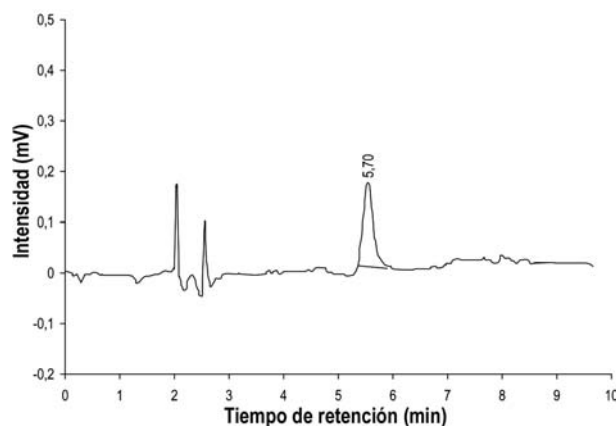


Figura 2. Tejido muscular de salmonídeo fortificado con un estándar de 50 µg kg⁻¹.

Figure 2. Salmonid muscular tissue fortified with standard of 50 µg kg⁻¹.

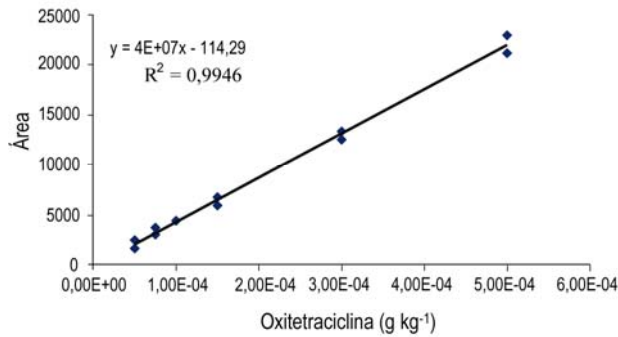


Figura 3. Curva de calibración por duplicado en HPLC, para oxitetraciclina (99%) en 0,01 M de ácido oxálico.

Figure 3. Calibration curve, duplicate in HPLC, for oxytetracycline (99%) in 0.01 M oxalic acid.

Tabla 1. Datos de la curva de calibración de la oxitetraciclina.

Table 1. Data calibration curve of the oxytetracycline.

| Oxitetraciclina g kg ⁻¹ | Área |
|------------------------------------|-------|
| 5,00E-05 | 2529 |
| 5,00E-05 | 1655 |
| 7,50E-05 | 3651 |
| 7,50E-05 | 2983 |
| 1,00E-04 | 4431 |
| 1,00E-04 | 4431 |
| 1,50E-04 | 6784 |
| 1,50E-04 | 5853 |
| 3,00E-04 | 12481 |
| 3,00E-04 | 13275 |
| 5,00E-04 | 22945 |
| 5,00E-04 | 21200 |

Tabla 2. Porcentaje de recuperación del analito.

Table 2. Recovery percentage of analite.

| Nº inyección | Analito adicionado g kg ⁻¹ x 10 ⁻⁵ | Analito encontrado g kg ⁻¹ x 10 ⁻⁵ | Porcentaje de analito recuperado |
|----------------------|--|--|----------------------------------|
| 1 | 5 | 4,81 | 96,28 |
| 2 | 5 | 4,80 | 96,02 |
| 3 | 5 | 4,86 | 97,30 |
| 4 | 5 | 4,78 | 95,60 |
| 1 | 10 | 9,59 | 95,93 |
| 2 | 10 | 9,44 | 94,44 |
| 3 | 10 | 9,57 | 95,74 |
| 1 | 50 | 49,0 | 98,13 |
| 2 | 50 | 49,8 | 99,70 |
| 3 | 50 | 49,9 | 99,83 |
| Nº muestras promedio | | 10 | |
| SD | | 0,9690 | 96,90 |
| RSD | | 0,0180 | 1,80 |
| | | 0,0186 | 1,86 |

aprobado por la AOAC. Un punto relevante, radica en que la técnica implementada es para HPLC, este instrumento se ha masificado en los últimos años y ya está disponible en la mayoría de los laboratorios de análisis y control de calidad.

Para la determinación de la longitud de onda, se hace un barrido desde 350 a 370 nm, efectuando mediciones cada 5 nm. En las cercanías de la mayor absorbancia, se hacen mediciones por cada nanómetro, obteniéndose el máximo a 365 nm, en forma similar a lo señalado por Allison *et al.* (2005).

Se estudiaron diferentes proporciones de fase móvil, con la finalidad de establecer la más apta para la separación y buena apreciación del peak cromatográfico. Las fases probadas fueron ácido oxálico: acetonitrilo en proporciones de 90:10, 80:20 y 70:30.

Para el estudio de óptimo flujo se realizaron inyecciones de 0,8, 1,0 y 1,2 mL min⁻¹. La razón por la cual se optó por el flujo de 1,0 mL min⁻¹ fue porque permite una mejor pureza y visualización del máximo cromatográfico. Es decir, deja la señal correspondiente

Tabla 3. Análisis de la precisión del sistema y del método propuesto.**Table 3.** Precision analysis of the system and the proposed method.

| Repetibilidad /sistema | | Repetibilidad /método | |
|------------------------|--|-----------------------|--|
| N° inyección | Concentración g kg ⁻¹ x 10 ⁻⁵ | N° inyección | Concentración g Kg ⁻¹ x 10 ⁻⁵ |
| 1 | 7,34 | 1 | 8,61 |
| 2 | 7,34 | 2 | 8,65 |
| 3 | 7,35 | 3 | 8,66 |
| 4 | 7,36 | 4 | 7,57 |
| 5 | 7,38 | 5 | 8,64 |
| 6 | 7,28 | 6 | 8,60 |
| Promedio | 7,34 | Promedio | 8,45 |
| SD | 0,31 | SD | 4,35 |
| RSD | 0,43 | RSD | 5,14 |

Tabla 4. Cálculo del límite de detección y límite de cuantificación. Y_{bl}: estimado del límite de detección del blanco, S_{bl}: desviación del estándar blanco.**Table 4.** Calculation of the detection limit and quantification limit. Y_{bl}: Estimated detection limit of the blank, S_{bl}: standard deviation of the blank.

| Y _{bl} | S _{bl} | M | Factor | Límite de cuantificación g kg ⁻¹ x 10 ⁻⁵ |
|-----------------|-----------------|------|--------|---|
| 0,0 | 86,2 | 44,1 | 10 | 19,55 |
| Y _{bl} | S _{bl} | M | Factor | Límite de detección g kg ⁻¹ x 10 ⁻⁵ |
| 0,0 | 86,2 | 44,1 | 3 | 5,86 |

al analito en estudio, libre de cualquier tipo de interferente que entregue información errónea.

El estudio del tiempo de retención, sirve como primera línea de base para la identificación del máximo (Quattrochi, 1992). Este resultado se obtuvo por medio de la inyección de un estándar de 5×10^{-5} g kg⁻¹ además de la inyección de una muestra de tejido muscular más piel fortificada, para la confirmación del tiempo de retención. De este modo, se estudia la especificidad del método para producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes (Quattrocci, 1992). La curva de calibración, para oxitetraciclina se estableció, en un rango de 5×10^{-5} a 5×10^{-4} g kg⁻¹. Esta

Tabla 5. Incerteza total estimada, expresada en µg kg⁻¹.**Table 5.** Total estimated uncertainty, expressed as µg kg⁻¹.

| Descripción | valor x | valor x | Incertidumbre STD | Incertidumbre RSD | Incertidumbre RSD |
|---------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Precisión | 1 | 1 | 3,6517 | 3,6517 | 13,33 |
| Exactitud | 0,9690 | 0,9690 | 0,0508 | 0,0524 | 0,0027 |
| Pureza | 0,9900 | 0,9900 | 0,0058 | 0,0058 | 0,000034 |
| Suma | | | | | 13,3379 |
| Incerteza combinada | | | | 3,6521 | |
| Incerteza expandida | | | k=2 | 7,3042 | |

curva fue realizada con muestras de piel y músculo fortificados. El valor del coeficiente de correlación ($R^2 = 0,995$) permite señalar una buena linealidad entre la concentración de analito y su área asociada de respuesta. Se debe dejar en claro que entre más cercano a la unidad sea el valor de R^2 , mayor será la coherencia y reciprocidad entre los datos de la curva de calibrado.

La recuperación se estudió a tres niveles de adición, dentro del rango lineal del método, por medio de adición del estándar. Se realizaron contaminaciones a la matriz con oxitetraciclina. Los niveles de concentración del estándar fueron de 5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 5×10^{-4} g kg⁻¹. Los errores que derivan en una diferencia en la recuperación, con respecto al esperado, pueden estar relacionados con factores tales

como, una absorción no óptima del antibiótico durante la fortificación, el método de extracción no cumplió a cabalidad su objetivo o el método cromatográfico no logró la óptima separación.

Al hacer una comparación con los resultados obtenidos según la metodología oficial de determinación de oxitetraciclina de la AOAC y el método aquí propuesto, la recuperación estimada fue de 90% y 96,9% con RSD de 5,8 y 1,86 respectivamente (Meinertz *et al.*, 1998). Estos resultados señalan que la sensibilidad del método aquí implementado es mayor y por consiguiente, entrega datos con menor inexactitud. De lo anterior se tiene que los errores asociados al estudio y descritos en el párrafo anterior son mínimos y permiten afirmar que los datos obtenidos por medio de la metodología propuesta son de alta fidelidad.

En el estudio de exactitud (recuperación), hay que considerar, que el verdadero valor de concentración no puede conocerse sino que estimarse. Por lo tanto, la recuperación en un método, consiste en la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia. La inexactitud, debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia. Esto significa que, la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o a su tendencia. Cuando existen interferencias en el método por falta de selectividad (desviación por exceso en los resultados), o cuando se trata de métodos analíticos muy laboriosos, con varias etapas, como extracciones, purificaciones, etcétera (desviación por defecto en los resultados), el método se considera sesgado.

La repetibilidad o precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método se refleja, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa RSD), esta última fue utilizada en este trabajo. Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

La linealidad del método, corresponde a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Además, con estos cálculos se obtiene un rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado (Quattrochi, 1992).

Si se compara el método oficial con el método propuesto, el límite de cuantificación fue $2,2 \times 10^{-5}$ y $1,9 \times 10^{-5}$ g kg⁻¹ respectivamente (Meinertz *et al.*, 1998). Con el resultado anteriormente señalado, si bien se establece cierta cercanía de los datos, se debe dejar en claro que por el método propuesto se pueden considerar cuantificables valores de menor magnitud.

La incerteza corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc. (Quattrochi, 1992). De lo anterior, se puede establecer que la incerteza corresponde al parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de valores, que razonablemente pueden ser atribuidos a una medición.

En líneas generales, a partir de los datos obtenidos se puede señalar, con respecto al tiempo de retención, que las variaciones que se puedan obtener entre el resultado entregado y los análisis posteriores realizados por terceros, obedecen a diferencias que se puedan dar durante el desarrollo del análisis, como temperatura del ambiente, variación de pH, efectividad de la columna, etc.

Con relación a los cálculos de la incerteza, se tiene que los valores calculados se encuentran dentro de rangos bastante aceptables, por lo cual, el método implementado es muy confiable ante diferencias operativas de distinta índole, tales como cambio de analista, cambio de equipo, cambio de laboratorio, u otras, esto considerando un intervalo de confianza de un 95%, esto queda de manifiesto al considerar un factor $k = 2$. Los valores de una incerteza combinada y una incerteza expandida señalan que considerando las desviaciones estándar relativas, existe una fluctuación en la exactitud de valores entre 3,6 y 7,3%. Nuevamente en base a los datos de Meinertz, donde se menciona que la precisión es de un 80%, se refuerza la idea de una más fidedigna entrega de datos por parte del método aquí propuesto.

CONCLUSIONES

- El método implementado para la determinación de residuos de oxitetraciclina en músculo de salmón, resultó ser realmente eficaz y rápido, lo cual es

primordial para su utilización en laboratorios de análisis.

- La recuperación obtenida, a partir de la matriz fortificada, fue de 96,90% \pm 1,8. A partir del alto porcentaje de recuperación, es posible determinar la alta efectividad del método desarrollado.
- Para obtener un tiempo de retención acorde a las necesidades del laboratorio, se determinó una fase móvil compuesta por ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo, en proporciones de 80:20 respectivamente. El tiempo encontrado fue de 5,7 min.
- El límite de cuantificación determinado para el método propuesto fue de $1,95 \times 10^{-5}$ g kg⁻¹ y el límite de detección fue de $5,86 \times 10^{-6}$ g kg⁻¹. Con respecto a la precisión, el estudio de repetibilidad sobre el sistema, muestra que el promedio fue de 73,47; el RSD fue de 0,43 y en la repetibilidad sobre el método, el promedio correspondió a 86,34 con un RSD de 0,28.

REFERENCIAS

- Booth, N.H. & L.E. McDonald. 1988. Farmacología y terapéutica veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 41-66.
- Doren, D. 2001. Salmonicultura en Chile: desarrollo, proyecciones e impacto. Fundación Terram, Santiago, pp. 1-2.
- Gesche, E., M. Vega, R. Saelzer & M. Mayor. 2004. Influencia del pH del medio de cultivo en la detección microbiológica de residuos de antibióticos. *Fleischwirtschaft*, 1: 10-16.
- Gesche, E., E. Madrid & C. Águila. 2001. Efecto del pH, cepa bacteriana y tipo de muestra, en la detección microbiológica, de ácido oxalónico y oxitetraciclina en peces. *Arch. Med. Vet.*, 33(1): 21-29.
- Ingraham, J.L. & C.A. Ingraham. 2004. Introducción a la microbiología, Reverté, Barcelona, 492 pp.
- MacKay, A.A. & B. Canterbury. 2005. Oxytetracycline sorption to organic matter by Metal-Bridging. *J. Environ. Qual.*, 34: 1964-1971.
- Martínez, J.L. 1997. Antibióticos y quimioterápicos antimicrobianos. SF Impresos, Universidad de Concepción, Concepción, 243 pp.
- Meinertz, J.R., G.R. Stehly & W.H. Gingerich. 1998. Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish. *AOAC International*, 81(4): 702-708.
- Quattrochi, O., S. Abelaira & R. Laba. 1992. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, 422 pp.
- SalmonChile. 2009. SalmonChile estadísticas. <http://estadisticas.intesal.cl/informes.aspx?type=101&padding=yes>. Revisado: 24 marzo 2009.
- Silva, J. & G. Anhalt. 1980. Determinación de oxitetraciclina en cobayos infectados intramuscularmente comparando algunos métodos. *Arch. Med. Vet.*, 12: 79-106.

Received: 10 January 2008; Accepted: 6 May 2010