

Estudio de las propiedades fluorescentes de la vancomicina para el desarrollo de un nuevo método por HPLC, y su aplicación en la caracterización de polímeros impresos

Vancomycin Fluorescent Properties Studies to Develop a New HPLC Method Applied to Imprinted Polymer Characterization

Lic. Yanio E. Milián-Rodríguez; MSc. Alen N. Baeza-Fonte; Dr. Aristides C. Valdés-González 
yemr08@gmail.com; alen@imre.oc.uh.cu; camilo@imre.oc.uh.cu

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Materiales (IMRE), La Habana, Cuba

● Resumen

En el presente trabajo se realiza un estudio de las propiedades fluorescentes de la vancomicina en función del pH, el tipo y composición del disolvente y la naturaleza del buffer para el desarrollo de un nuevo método por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia molecular para su determinación. Las condiciones idóneas para medir la fluorescencia de la vancomicina se obtuvieron en una solución de 1-butanol al 5 % y pH 5 empleando $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ($0,04 \text{ molL}^{-1}$) como buffer. Las mediciones se realizaron en discontinuo a 302 y 335 nm de longitud de onda de máxima excitación y emisión, respectivamente. El conocimiento adquirido en el procedimiento se empleó en la preparación de un método por HPLC con detector de fluorescencia, empleando una columna Luna 5μ C18 (250 mm L · 2mm DI), a un flujo de $0,15 \text{ mLmin}^{-1}$ y adición post-columna de 1-butanol. El procedimiento resultó lineal entre $0,01$ - $10 \mu\text{gmL}^{-1}$, con límites de detección y cuantificación de 2 y 5 ngmL^{-1} , respectivamente. El mismo fue aplicado satisfactoriamente en la determinación de vancomicina en agua en estudios de reenlace de polímeros de impresión molecular.

Palabras clave: vancomicina, resistencia antimicrobiana, fluorescencia molecular, HPLC.

● Abstract

The present work describes the analysis of the vancomycin fluorescence properties related to pH, kind and proportion of solvent and buffer nature over vancomycin fluorescence intensity in order to further development of a sensitive new method by high performance liquid chromatography with molecular fluorescence detection for its quantification. Practical conditions to measure vancomycin fluorescence were obtained in a solution of 1-butanol 5 %, pH 5 employing a $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ($0,04 \text{ molL}^{-1}$) buffer in not continuous way. Measurements were acquired at 302 and 335nm of excitation and emission wavelengths, respectively. Knowledge obtained from these results was employed to develop a new high performance liquid chromatography method with fluorescence detection, using a Luna 5μ C18 (250 mm L · 2mm ID) column, with $0,15 \text{ mLmin}^{-1}$ flow, adding 1-butanol post column. This method resulted linear between $0,01$ - $10 \mu\text{gmL}^{-1}$ with detection and quantification limits of 2 and 5 ngmL^{-1} , respectively. This method was successfully applied to determine vancomycin in water samples from the rebinding studies of molecular imprinted polymers experiments.

Keywords: vancomycin, antibacterial resistance, molecular fluorescence, HPLC.

● Introducción

La vancomicina (VCM) es un antibiótico de última generación considerado hasta el momento como uno de los más efectivos /1/ (figura 1). Es un antimicrobiano natural producido por *Spectromices*

orientalis. La misma pertenece a la familia de los glicopéptidos y se aplica cuando la infección en pacientes es producida por bacterias Gram positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, o cuando existe resistencia a la meticilina /2, 3/.

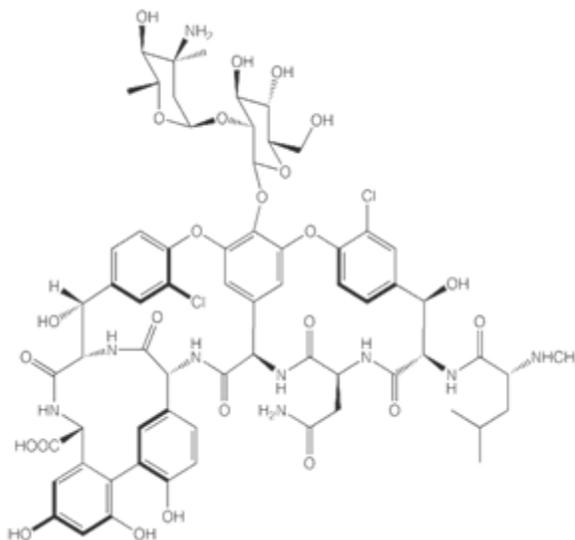


Fig. 1 Estructura de la molécula de vancomicina.

La fuente primaria de vertimiento de VCM al medio ambiente es su excreción debido a la metabolización incompleta por humanos y animales. Otras fuentes pueden incluir los desechos de las plantas de producción del fármaco, efluentes de plantas de tratamiento de aguas de desecho e instalaciones industriales. El vertimiento continuo e indiscriminado de antibióticos al medio ambiente se ha asociado a la aparición de resistencia bacteriana. En este sentido, se han descrito algunas cepas de *Enterococcus* (*E. Faecalis*, *E. Faecium* y *E. Gallinarum*), aislados de muestras clínicas con altos niveles de resistencia a VCM /3-7/.

Por estas razones es importante conocer y controlar los niveles de VCM en muestras de aguas que permitan la evaluación apropiada de los riesgos, efectos e impactos potenciales.

Se han publicado numerosos métodos para la determinación de VCM en muestras biológicas y de medicamentos como los espectrofotométricos, inmunológicos, biológicos y cromatográficos /8/. Entre las técnicas más empleadas para el análisis de VCM se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC) /9-16/, alcanzando límites de detección cercanos a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ /9-15/; sin embargo estos métodos convencionales son por lo general muy lentos y con una sensibilidad y selectividad insuficiente para el análisis en muestras tan complejas como las ambientales, donde los antibióticos se encuentran, por lo general, en el orden de los $\mu\text{g ng L}^{-1}$ /9-13/.

La solución actual a este problema requiere del empleo de HPLC con tándem de masas, pero esta técnica resulta cara y demanda el empleo de especialistas altamente calificados /16, 17/. En este sentido los Polímeros de Impresión Molecular (PIM) pueden ser una alternativa para la extracción y determinación selectiva de VCM en agua, los cuales, por su alto grado de selectividad, están jugando un papel significativo en los procesos de extracción en fase sólida en las últimas décadas /18/.

La combinación de los métodos cromatográficos con la detección fluorescente (HPLC-FL) /11, 19/, permite alcanzar valores adecuados de sensibilidad y selectividad, haciendo posible la realización de estudios de reconocimiento y preconcentración en polímeros impresos sintetizados para la determinación de

vancomicina. En este sentido, los pocos métodos de HPLC con detección por fluorescencia para VCM descritos se han aplicado solo en muestras de suero /11, 12/.

En el presente trabajo se realiza un estudio de las propiedades fluorescentes de la vancomicina en función del pH, el tipo y composición del disolvente así como de la naturaleza del buffer con vistas a la implementación de un nuevo método por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia molecular para la determinación de la vancomicina, con la selectividad y sensibilidad requerida, en estudios de reenlace durante la caracterización de polímeros de impresión molecular.

Experimental

Reactivos químicos

Vancomicina (90 %), CIPLA, India. Dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4), tetrahidrofurano, metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol y ácido ortofosfórico (grado analítico) UNI CHEM, China. Trietilamina y acetonitrilo (grado cromatográfico) obtenidos de Scharlab (Barcelona, España). 1,3,6-Hexanotriol, ácido etanoico (CH_3COOH , ácido acético), etanoato de sodio (CH_3COONa , acetato de sodio), hidróxido de sodio, ácido propanoico, ácido butílico (ácido butírico), ácido benzoico, ácido cítrico (CA), citrato de sodio, tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) y dodecilsulfato de sodio (grado analítico) fueron adquiridos de MERCK (Clonmel, Irlanda). Dimetilformamida y 2-propanol de BDH (London, Inglaterra); N, N-dimetilformamida, metoxietanol, alcohol bencílico y 2-butanol (grado analítico) de FLUKA (Buchs, Suiza). Agua purificada fue obtenida de un sistema de agua ultrapura Heal Force, China. Los polímeros molecularmente impresos de tipo sol-gel fueron sintetizados en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales de la Universidad de la Habana, Cuba.

Instrumentación

Se empleó un espectrofluorímetro convencional RF-5301-PC (SHIMADZU, Japón). Los ajustes de pH se realizaron con un pH-metro (PHSJ-3F, China), y además se utilizó un HPLC SHIMADZU

(Prominence High Pressure System, Japón) compuesto por dos bombas (LC-20AT), un inyector automático (SIL 20A), un horno (CTO-20A) y un detector de fluorescencia (RF-10A_{XL}). Para el estudio se empleó una columna Luna C18 (2mm DI · 25cm L), con partículas de 5 μ de tamaño. Para la adición post-columna se utilizó una bomba peristáltica modelo PRR-2A (SHIMADZU) a través de una conexión de acero en T.

Preparación de las disoluciones

Todas las disoluciones se prepararon en frascos volumétricos de 10mL, añadiendo 5mL de VCM (100 mgmL⁻¹), 1mL del buffer seleccionado (0,4 molL⁻¹) y diferentes volúmenes del disolvente orgánico especificado dependiendo del objetivo de la prueba, enrasando a volumen final con agua destilada. Todas las mediciones se realizaron con cubetas estándar de cuarzo de 1cm · 1cm de paso óptico.

Muestras a caracterizar: polímeros de impresión molecular (PIMs)

Los materiales poliméricos de tipo sol-gel analizados en este trabajo se sintetizaron previamente mediante catálisis ácida, empleando 3-glicidilpropiltrimetoxisilano (GPTMOS) y 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) como monómeros funcionales y tetrametoxisilano (TMOS) como entrecruzador, disueltos en etanol. La plantilla empleada fue la propia molécula de VCM. Se obtuvieron tres PIMs diferentes, uno empleando solo GPTMOS (PIM I), el segundo utilizando solo APTES (PIM III) y el tercero con una mezcla equimolar de ambos (PIM II), quedando listos para el estudio de HPLC-FL después de la remoción de la VCM de su interior mediante lavados continuos. Además se elaboraron los respectivos polímeros no impresos (PINs), sintetizados de la misma forma pero sin la adición de la plantilla.

Estudio de las propiedades fluorescentes de la vancomicina

Se investigó la influencia del pH, disolvente seleccionado y tipo de buffer empleado sobre la intensidad de fluorescencia de la vancomicina (IFV). Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo a las longitudes de onda óptimas determinadas a partir de

los espectros de excitación y emisión de la VCM, variando las rendijas del instrumento hasta obtener una señal suficientemente intensa.

Influencia de la naturaleza del disolvente

La influencia de la naturaleza del disolvente sobre IFV se verificó añadiendo separadamente 1 mL de cada disolvente, 5 mL de VCM (100 mg mL^{-1}) y 1 mL de KH_2PO_4 ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), enrasando a 10 mL con agua destilada. Los disolventes seleccionados fueron trietilamina, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 2-propanol, 1,3,6-hexanotriol (1 mol L^{-1}), metoxietanol, alcohol bencílico (saturado), 2-butanol, dodecilsulfato de sodio, ácido acético, propanoico y butírico. Debido a sus bajas constantes de solubilidad en agua se añadieron solamente 0,5 mL de 1-butanol y 0,1 mL de 1-pentanol.

Influencia de la proporción del solvente

Este estudio se llevó a cabo añadiendo 5 mL de vancomicina (100 mg mL^{-1}), 1 mL de KH_2PO_4 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) ajustado a pH 5 y volúmenes separados de metanol (0,1; 0,2; 0,5; 1, 2 y 3 mL). Un estudio similar fue realizado empleando etanol, 1-propanol y además con 0,1, 0,2 y 0,5 mL de 1-butanol. Todas las disoluciones se completaron hasta los 10 mL con agua destilada.

Influencia de la naturaleza del buffer y el pH

Se añadieron 5 mL de VCM (100 mg mL^{-1}), 1 mL de KH_2PO_4 , acetato de sodio, ácido cítrico o buffer Tris, separadamente en volumétricos de 10 mL diferentes, todos a $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, cada uno ajustado previamente a pH 3, 4, 5 y 6. Se adicionó 1-butanol para obtener una concentración final de 5 % (V/V).

Condiciones cromatográficas

Se estudiaron dos métodos diferentes:

Método 1: Se emplea como fase móvil KH_2PO_4 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 5 con 1-butanol al 5 % usado en un modo isocrático.

Método 2: Se estudian tres variantes del mismo. La variante 1 emplea: gradiente binario de dos fases móviles: A- acetonitrilo/trietilamina/tetrahidrofurano /agua (7/0,2/1/91,8 (v/v)), y B- con los mismos disolventes, pero en proporción (29/ 0,2/ 1/69,8 (v/v)), manteniendo A de 0 a 2 min 100 %; de 2 a 4 min A→B (100 %), sosteniendo B a 100 % durante 6 min hasta el final, utilizando en ambos casos una columna Luna 5 μ C18 (2 mm DI · 25 cm L) y fijando el flujo a $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ para un volumen de inyección de $100 \mu\text{L}$. La temperatura del horno se estableció en $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

La variante 2 utiliza estas mismas condiciones, pero adicionando buffer KH_2PO_4 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 5 con 1-butanol al 5 % post-columna. En la tercera variante, se mantienen las condiciones del método 2, pero añadiendo post-columna sólo butanol. En ambos casos la adición tiene lugar a través de una conexión en forma de T a un flujo total de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, manteniendo $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ de las bombas del HPLC y $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ de la bomba peristáltica con la disolución. Las medidas de fluorescencia se realizaron excitando a 302 nm y midiendo la emisión a 335 nm.

Aplicación de la variante de adición post-columna de butanol (método 2, variante 3,) a la determinación de vancomicina en agua

Las disoluciones de VCM en agua obtenidas del estudio de reenlace de los PIMs obtenidos en los laboratorios se midieron por HPLC-FL. Los experimentos de reenlace se realizaron añadiendo 2 mL de VCM (1 mg mL^{-1}) a 20 mg de los PIMs; posteriormente éstas se agitaron continuamente durante cuatro horas, para luego analizar el sobrenadante. La cantidad de VCM absorbida se calculó substrayendo la determinada por el método 2 de HPLC-FL del total añadido. Similar procedimiento se aplicó a los polímeros no impresos (PINs) para conocer la eficiencia del proceso de impresión.

● Resultados y discusión

Estudio de las propiedades fluorescentes de la vancomicina

En primer lugar se obtuvo el espectro de excitación y emisión de una disolución de VCM ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada con los diferentes disolventes, según acápite anterior. Los espectros de fluorescencia obtenidos no muestran diferencias importantes en los máximos de emisión y excitación con respecto al agua (figura 2) sin embargo, dentro de los disolventes que incrementaron en mayor medida la IFV los alcoholes

fueron los de mayor interés pues estos son ampliamente utilizados en HPLC y además pueden interactuar fácilmente con los grupos -OH fenólicos y los del carbohidrato de la VCM a través de la formación de enlaces por puentes de hidrógeno formando una caja o envoltura externa, tipo micela, que la protege de desactivadores externos /19, 20/. Este fenómeno le confiere cierta rigidez a la estructura de la molécula, lo cual provoca que disminuyan las interacciones de la misma, disminuyendo la probabilidad de desactivación de su estado excitado por una vía no fluorescente, lo cual produce un aumento en la intensidad de fluorescencia /19/.

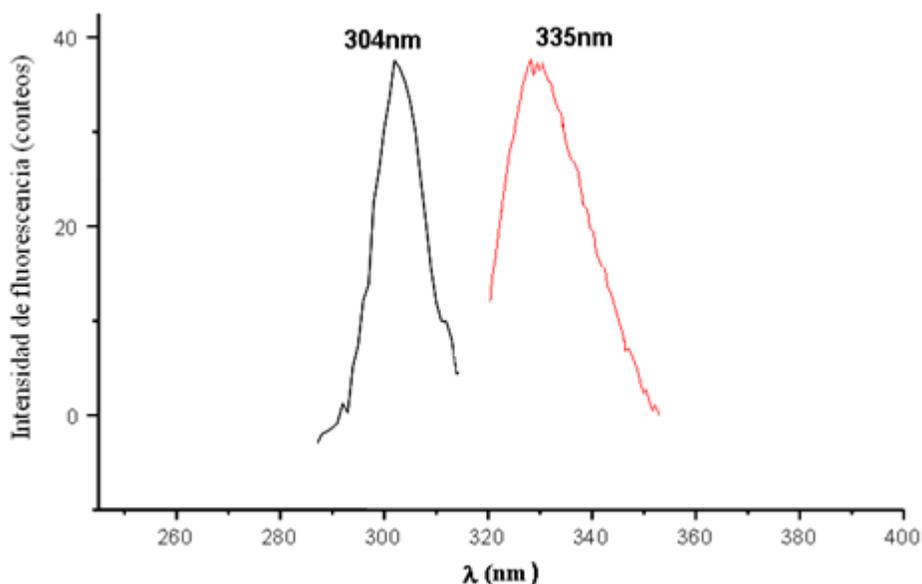


Fig. 2 Espectro de emisión y excitación de una disolución de vancomicina en agua (100 mg mL^{-1}), rendija de apertura de excitación y emisión de 5 nm.

En la figura 3 se puede observar que al aumentar la concentración de alcohol en la disolución, tiene lugar un incremento de la IFV, lo cual corrobora la explicación anterior. Por otra parte, al aumentar el número de átomos de carbono de la cadena alifática, al pasar del metanol al 1-butanol, se produce un incremento en la IFV (figura 3), lo cual puede explicarse a través del efecto de solvatación que tiene lugar cuando los grupos alifáticos rodean de forma

más efectiva al antibiótico, y por tanto lo aíslan de efectos externos, disminuyendo de esta forma la velocidad de desactivación por colisión molecular /19, 20/.

En el caso del pentanol la IFV obtenida es menor debido a que la cantidad de este disolvente añadida es incluso mucho menor que la adicionada de 1-butanol y el resto de los alcoholes, debido a su constante de solubilidad en agua (ver sección 2.4.1).

TABLA 1. VALORES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LA VANCOMICINA
(100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) EN DIFERENTES SOLVENTES A pH 5, CON KH_2PO_4 (0,4 MOLL^{-1}),
RENDIJA DE APERTURA DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN DE 5 nm

<u>Solvente</u>	<u>λ_{exc}(nm)</u>	<u>λ_{em}(nm)</u>	<u>I_{em}</u>
Agua	304	334	37
Metanol	303	336	59
Etanol	303	335	61
Propanol	303	336	66
2-Propanol	303	336	71
Butanol	302	335	92
Pentanol	302	334	75
Metoxietanol	303	335	73
Alcohol Bencílico	304	335	41
Alcohol Isobutílico	303	334	88
Hexanotriol	304	334	50
Acid Acético	303	334	50
Acid Propanóico	304	334	70
Acid Butírico	304	335	52
Tetrahidrofurano	303	339	58
Dimetilformamida	304	344	72
Dodecilsulfato de sodio	303	333	53

Como se puede apreciar en la figura 3, el 1-butanol incrementa en mayor medida IFV, sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua (7,9 g/100g H_2O), no se puede añadir por encima de 5 %; por esta razón, se comparó la IFV en 1-butanol al 5 % con la obtenida en 1-propanol al 30 %, para el cual se obtienen los mejores resultados.

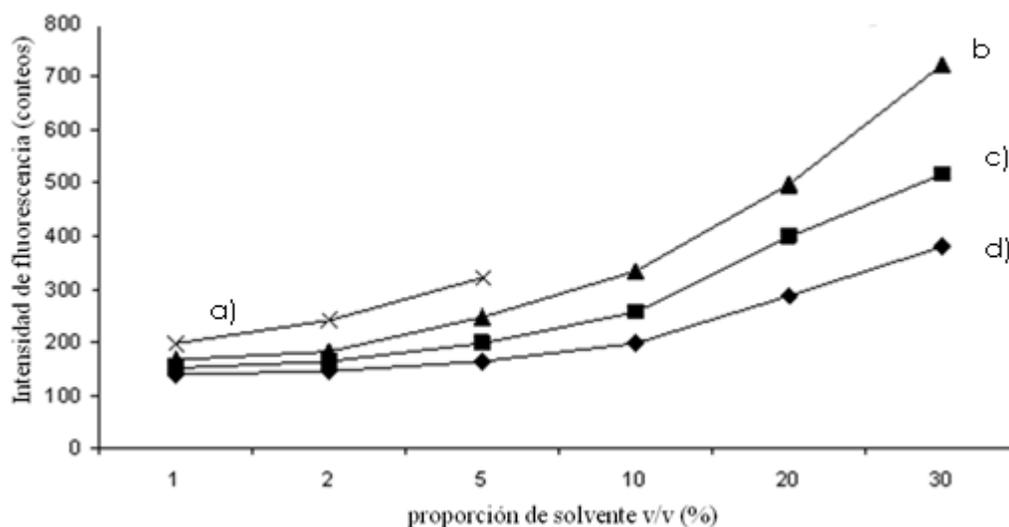


Fig. 3 Influencia de la proporción del disolvente en la intensidad de la fluorescencia de la vancomicina. (a) 1-butanol, (b) 1-propanol, (c) etanol y (d) metanol. Rendiija de apertura de excitación y emisión, 5 y 10 nm respectivamente.

En opinión de los autores, a concentraciones de VCM de 100 mgmL^{-1} (figura 4), el 1-propanol 30 % puede cubrir un gran número de las moléculas presentes evitando la agregación o asociaciones múltiples con lo cual se favorece la fluorescencia ya que disminuye la probabilidad de desactivación del estado excitado por vías no fluorescentes (p.ej choques intramoleculares), contrariamente a lo que ocurre para el 1-butanol al 5 %. Sin embargo,

cuando el antibiótico se encuentra a concentraciones entre 1 y 10 mgmL^{-1} el 1-butanol al 5 % las solvata eficientemente por lo que presentan mayor IFV que las solvatadas por el 1-propanol al 30 % por tanto, el 1-butanol es mejor modificador de la IFV, en función de obtener límites de detección (LD) y cuantificación (LC) menores para analizar VCM en muestras ambientales /20/.

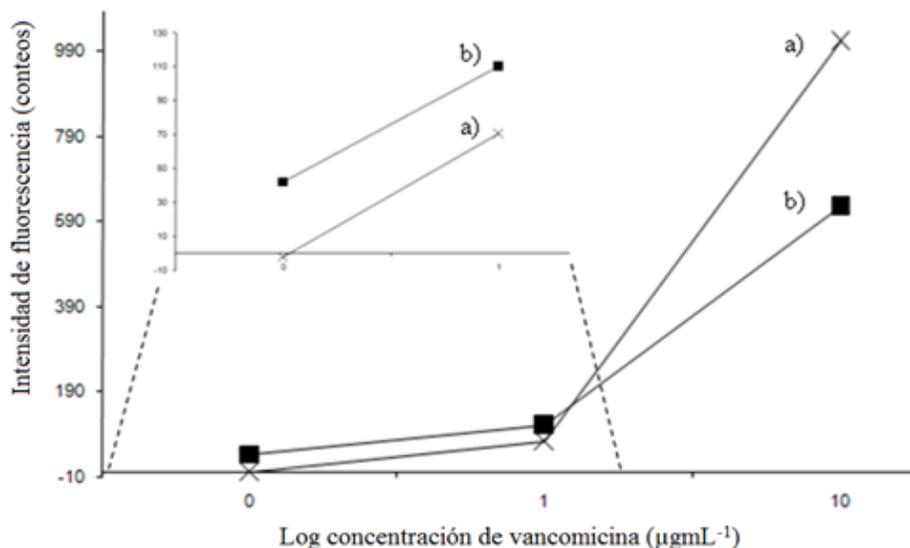


Fig. 4 Influencia del disolvente sobre la intensidad de fluorescencia de la vancomicina: (a) 1-propanol 30 % y (b) 1-butanol 5 %. Rendija de apertura de excitación y emisión de 10 nm.

Por último, se estudiaron la influencia de la naturaleza del buffer y el pH sobre la IFV, para lo cual se seleccionaron las disoluciones tampones de (a) KH_2PO_4 , (b) ácido cítrico, (c) ácido acético y (d) Tris,

todas de $0,4 \text{ molL}^{-1}$, previamente ajustadas a los pH de trabajo, adicionando en cada caso 1 mL a la disolución que contiene a la VCM. En KH_2PO_4 se obtuvieron las mayores IFV (figura 5).

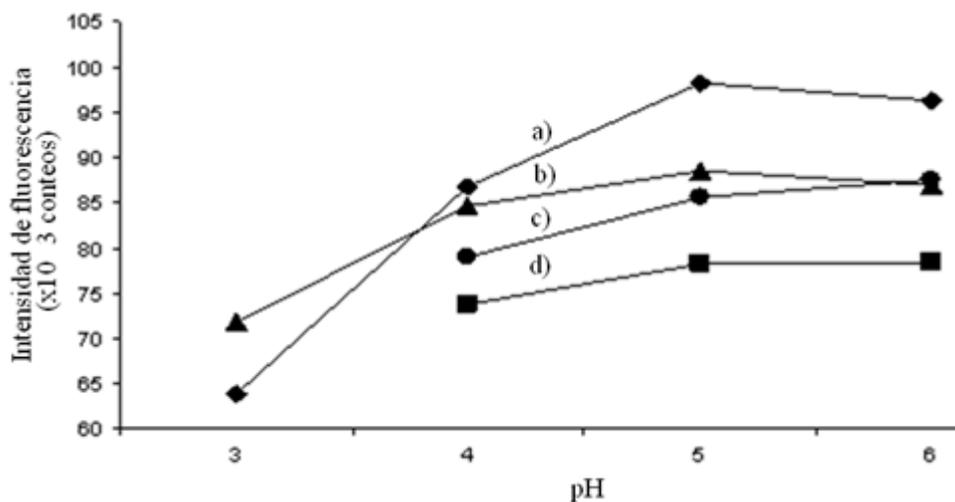


Fig. 5 Influencia del buffer y el pH en la intensidad de fluorescencia de la vancomicina en 1-butanol 5 % (100 mgmL^{-1}), con (a) KH_2PO_4 , (b) ácido cítrico, (c) ácido acético y (d) Tris a $0,4 \text{ molL}^{-1}$.

Por otra parte, el estudio del efecto del pH sobre la IFV mostró que de los valores estudiados para el buffer fosfato (3, 4, 5 y 6), la mayor señal se obtiene para pH 5 (figura 5), probablemente debido a que el grupo carboxilo cercano al anillo fenólico pasa a la forma ionizada por encima de pH 4 aumentando la coplanaridad de estos dos anillos y, por tanto, se incrementa ligeramente la fluorescencia de la molécula (ver figura 1).

Aplicaciones cromatográficas

Los resultados obtenidos previamente fueron empleados para demostrar su aplicación en HPLC-FL mediante dos pruebas, empleando los métodos descritos. En el método 1, se logra un tiempo de retención de la VCM de 7,5 min, para un tiempo de análisis total de 15 minutos. Este método permite la determinación de VCM en disoluciones estándares por HPLC-FL, pero no logra parámetros cromatográficos aceptables, especialmente la resolución y especificidad, debido a que no separa las diferentes formas estructurales que presenta el antibiótico natural, obteniéndose un pico impuro.

Se probó el método desarrollado por Khalid / 11/ para la determinación de VCM en suero por HPLC-FL el cual emplea un gradiente de una mezcla metanol-buffer fosfato, excitando a 225

nm y midiendo a 258 nm. Este procedimiento fue aplicado a la determinación de VCM en muestras acuosas sin resultados satisfactorios.

La aplicación del método 2, permitió la obtención de un pico puro del componente principal de la VCM, mejorando la selectividad del método 1 pero no la sensibilidad. Al aplicar la segunda variante del método 2, no se logra un mayor incremento en la sensibilidad del mismo, debido a un efecto de dilución del 1-butanol en la fase móvil empleada en este método y a la presencia de otros disolventes que afectan la formación de las micelas sobre la VCM al favorecer el incremento de la solubilidad del 1-butanol en la mezcla final que llega al detector.

Para lograr un incremento de IFV, se empleó una tercera variante del método 2, añadiendo post-columna sólo 1-butanol. Se obtuvo así, un aumento en la sensibilidad del método indicando que la forma más efectiva de lograr un incremento de la IFV es la adición de un agente que solvate eficazmente a la VCM como el 1-butanol, antes limitado por la solubilidad, llegando en este caso a un 33 % en la disolución que atraviesa la celda del detector. Este proceso se favorece por la existencia de los otros disolventes orgánicos que actúan como coadyuvantes de la solubilización en la mezcla.

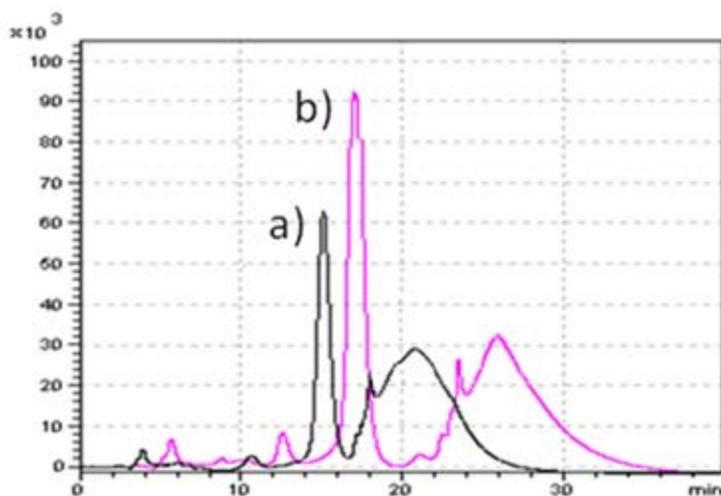


Fig. 6 Cromatogramas de una disolución de vancomicina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por HPLC-FL. (lex y lem de 302 y 335nm) obtenidos por método 2. Volumen de inyección: $10 \mu\text{L}$. a) Sin adición post-columna, y b) con adición de 1-butanol post-columna.

Para evaluar el desempeño del método 2, variante 3, se determinaron los parámetros de linealidad, LD y LC. Se obtuvo un comportamiento lineal con una recta de calibrado $y = 72\,176x + 1\,345$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,999$. La estimación de LD y LC se situó en 2 y 5 ngmL^{-1} , respectivamente en el intervalo trabajado de 0,01 a 10 μgmL^{-1} .

Posteriormente, este método se empleó para la determinación de VCM de disoluciones obtenidas en estudios de reenlace con los PIMs sintetizados en nuestro laboratorio. Los polímeros fueron evaluados a través del parámetro de eficiencia de impresión Q (ecuación 1) /21/, el cual da una medida de cuán

efectivo fue el proceso de impresión durante la síntesis de estos materiales.

$$Q = 100 \cdot (I_{PIM} - I_{PIN}) / I_{PIN} \quad (1)$$

donde:

Q: eficiencia de impresión,

I_{PIM} : masa (mg) de VCM absorbida por gramo de polímero impreso,

I_{PIN} : masa (mg) de VCM absorbida por gramo de polímero no impreso.

La Tabla 2 muestra las cantidades de VCM absorbida (I) por cada PIM y su respectivo PIN.

TABLA 2. CANTIDAD DE VANCOMICINA (I) ABSORBIDA POR GRAMO DE POLÍMERO, DONDE S ES LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR, CV EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN Y Q LA EFICIENCIA DE IMPRESIÓN (%)

Polímeros	I	s	CV	Q
MIP I	1,42	0,16	11,26	7,1
NIP I	1,33	0,15	11,27	
MIP II	0,69	0,04	5,79	15,9
NIP II	0,6	0,07	11,66	
MIP III	1,69	0,19	11,24	-38,9
NIP III	2,76	0,25	9,05	

Se puede observar que para el PIM II se obtiene la mayor eficiencia de impresión Q según la ecuación 1. Este polímero puede ser seleccionado entre los demás para la extracción y preconcentración en fase sólida de la VCM en muestras naturales.



Conclusiones

Los estudios del efecto del pH, naturaleza, proporción del disolvente orgánico y tipo de buffer permitieron establecer que aunque se obtienen aumentos en la IFV a pH 5 o superiores y empleando un buffer de KH_2PO_4 , el parámetro más importante en este incremento es la adición de butanol lo que permitió desarrollar un nuevo método analítico mediante HPLC-FL en gradiente con adición post columna de 1-butanol para determinar VCM durante los estudios de reenlace de polímeros de impresión molecular selectivos a este antibiótico.

Este método resultó ser sensible y lineal en el intervalo de concentraciones estudiado permitiendo su aplicación con éxito en la determinación de VCM en los estudios de reenlace con polímeros de impresión molecular a bajas concentraciones lo cual no fue posible con otros métodos reportados. Los LD y LC obtenidos hacen posible la aplicación del mismo para la determinación del antibiótico en muestras de aguas superficiales y de materia prima en la industria farmacéutica; obteniéndose una sensibilidad igual o superior comparado con otros métodos reportados /11, 12/.

Agradecimientos

A la Empresa laboratorio Farmacéutico "Julio Trigo", por suministrar la vancomicina, y al Laboratorio Universitario de Caracterización y Estructura de la Sustancia (LUCES), del Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE-UH), por el apoyo en la instrumentación.

Nomenclaturas

- **VCM**: vancomicina.
- **HPLC-FL**: Cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente.
- **Tris**: tris (hidroximetil)-amino metano.
- **IFV**: intensidad de fluorescencia de la vancomicina.



Bibliografía

1. CHAKRABORTY, S. P. *et al.* "Nanoconjugated Vancomycin: New Opportunities for the Development of Anti-VRSA Agents". *IOP Publishing. Nanotechnology. India.* 2010, 21, 105103.
2. MONTAÑÉS, P. B. "Farmacocinética de la vancomicina en administración intraperitoneal en pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria". *Servei Publicacions. Valencia.* 2009, 250, ISBN:978-84-370-7430-6.
3. KRUZEL, M. C. *et al.* "Determination of Vancomycin and Daptomycin MICs by Different Testing Methods for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus". *Journal of Clinical Microbiology.* 2011, 22, 2272–2273
4. KUMMERER, K. *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risk.* 3ra. Edición. Berlin: Pringer-Verlag, 2008. 521 p. ISBN: 978-3-540-74663-8
5. KÜMMERER, K. "Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II". *Chemosphere.* El Sevier. 2009, 12, 6, 1-7.
6. SONG, J. Y. *et al.* "Vancomycin-resistant Enterococcus colonization before admission to the intensive care unit: A clinico-epidemiologic analysis» *American Journal of Infection Control.* 2009, 37, 734-40.
7. CHANG, X. *et al.* "Determination of Antibiotics in Sewage from Hospitals, Nursery and Slaughter House, Wastewater Treatment Plant and Source Water in Chongqing Region of Three Gorge Reservoir in China". *Environmental Pollution.* 2010, 158, 1444-1450.
8. CARVALHO, M., MACHADO, R., GONÇALVES, M. "Analytical Methods for Vancomycin Determination in Biological Fluids and in Pharmaceuticals" *Quim. Nova.* 2007, 30, 2, 395-399.
9. FATTA, D.; A. NIKOLAOU; A. ACHILLEOS. "Analytical Methods for Tracing Pharmaceutical Residues in Water and Wastewater". *Trends in Analytical Chemistry.* 2007, 26, 6, 515-533.
10. LAKI, M.; M. HAJDÚ; K. LUDÁNYI. "Evaluation of a New LC Method for Analysis of Vancomycin Released from an Orthopaedic Drug Carrier System" *Chromatographia.* 2008, 68, S141-S144.
11. ABU-SHANDI, K. H. "Determination of Vancomycin in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection". *Anal Bioanal chem.* 2009, 395, 527-532.
12. BRUNETO, M. R. *et al.* "Determination of Losartan, Telmisartan and Valsartan by Direct Injection of Human Urine Into Acolumn-Switching Liquid Chromatographic System with Fluorescence Detection". *J. Pharm Biomed Anal.* 2009, 50, 194–199.
13. CHENG, G. *et al.* "Determination of Vancomycin in Human Plasma by HPLC with Solid-phase Extraction". *Central South Pharmacy.* 2010, 10, 8, (DOI)j CNKI:SUN:ZNYX.0.2010-10-008.
14. ABU, T. *et al.* "Development and Validation of High Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Ceftriaxone and Vancomycin in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples". *Science Asia.* 2010, 36, 297–304.
15. RAKESH, D. *et al.* "Development of Method of Analysis for Estimating the Vancomycin in Blood Plasma by RP-HPLC Method: Application to *in vivo* Studies". *Der Pharmacia Lettre.* 2010, 2, 1, 201-210.
16. DINH, Q. T.; F. ALLIOT; E. MOREAU-GUIGON. "Measurement of Trace Levels of Antibiotics in River Water Using on-Line Enrichment and Triple-Quadrupole LC⁻MS/MS". *Talanta.* 2011, 85, 3, 1238-1245.
17. FARQUHARSON, S.; CH. SHENDE; A. SENGUPTA. "Rapid Detection and Identification of Overdose Drugs in Saliva by Surface-Enhanced Raman Scattering Using Fused Gold Colloids". *Pharmaceutics.* 2011, 3, 3, 425-439.
18. ALEXIADOU, D. K. *et al.* "Molecularly Imprinted Polymers for Bisphenol A for HPLC and SPE from Water and Milk". *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2272 - 2282.
19. LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 2da Edición. New York: Kluwer Academic/Plenum publisher, 1999. 10-14. ISBN 0-306-46093-9.
20. HERTZ P., M. R.; L. B. MCGOWN. "Organized Media for Fluorescence Analysis of Complex Samples: Comparison of Bile Salt and Conventional Detergent Micelles in Coal Liquids". *Analytical Chemistry.* 1992, 64, 23, 2920-2928.
21. GUARDIA, L.; R. BADÍA; M. E. DÍAZ-GARCÍA. "Molecular Imprinted Ormosils for Nafcillin Recognition by Room Temperature Phosphorescence Optosensing". *Biosensors and Bioelectronics.* 2006, 21, 1822–1829.