

## EVALUACION DE UN METODO DE ANALISIS DE RESIDUOS DE SULFAMIDAS, EN MIEL, POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO

Jessica Pozo K., Nimia Manquian T., Miguel Neira C., Ramón Mansilla T.

Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Casilla 567. Valdivia. Chile, mmanquia@uach.cl

### ABSTRACT

**Evaluation of a sulphonamides residues analysis method in honey by high performance liquid chromatography.**

**Key words:** Sulfonamides, residues detection, HPLC.

A method of analysis using HPLC for the simultaneous detection and quantification of residues of sulphonamides in bee honeys was evaluated for the following sulphamides: sulphamethizole, sulphadimetoxine, sulphadiazine, sulphamerazine, sulphanylamide, sulphathiazole, sulphachloropyridazine and sulphametazine. Acetonitrile with 0.1% TFA was used for the extraction of sulphonamide residues as well as for the mobile phase with a gradient of elution.

Percentage recoveries lie within a range of 49 to 117%, with a detection limit of 0.05 ppm. The evaluated method is simple, fast and reliable within the established limits.

### RESUMEN

**Palabras claves:** Sulfamidas, detección de residuos, HPLC.

Se evaluó una nueva metodología para la detección y cuantificación simultánea de residuos de las siguientes sulfamidas en mieles de abejas: sulfametizol, sulfametoxina, sulfadiazina, sulfameracina, sulfanilamida, sulfatiazol, sulfachloropiridacina y sulfametacina, mediante Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC) en fase reversa. Se empleó acetonitrilo con TFA al 0.1%, tanto para la extracción de los residuos de sulfamidas, como en la fase móvil en gradiente de elución.

Los porcentajes de recuperación obtenidos variaron desde 49 hasta 117%, con un límite de detección de 0.05 ppm. El método desarrollado es simple, rápido y confiable, dentro de los límites establecidos.

### INTRODUCCION

La presencia de residuos de antibióticos y/o quimioterapéuticos en alimentos puede provocar hipersensibilización en los consumidores, causando en algunos casos reacciones alérgicas, trastornos gastrointestinales y erupciones en la piel, entre otros (Grimalt y Romaguera, 1980). Es por este motivo que FAO/OMS recomienda establecer "límites máximos de residuos (LMR)<sup>1</sup> para asegurar la salud de la población (FAO/OMS, 1994). La Unión Europea según la Regulación EU 2377/90 no permite el uso de antibióticos ni quimioterápicos en apicultura (Beckh, 2001)<sup>2</sup>.

En el caso de las sulfamidas los límites máximos de detección fluctúan, según la técnica utilizada, en 10 partes por billón (ppb) o sobre 50 ppb (Beckh, 2001). En estos países europeos la reglamentación se aplica rigurosamente y se sancionan los embarques de miel que no cumplen o exceden las concentraciones indicadas, lo que se traduce en una disminución del precio pagado y, en casos extremos, lleva al rechazo de la partida.

En Chile la actividad apícola se ha proyectado al mercado europeo con una exportación de 19.236.265 de dólares FOB en los últimos 5 años (CHILE, MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES. DIRECCION DE

Recepción originales: 13 de junio de 2003.

1 "límite máximo de residuos": el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario autorizada en la comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio y que no producirá daño al ser humano a lo largo de su vida.

2 BECKH, G. (2001). Testmanager, Institut für Honig-Analytik, Bremen, Alemania. (04/06/01), comunicación personal

PROMOCION DE EXPORTACIONES (PROCHILE), s.f.). Debido a que en el país no existe un control del tipo de sulfamida utilizada, se implementará una técnica de detección y cuantificación para estos residuos.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar una técnica de HPLC en fase reversa para determinar residuos de sulfamidas, específicamente para la detección simultánea de las siguientes sulfamidas en mieles de abejas: sulfametizol, sulfadimetoxina, sulfadiacina, sulfameracina, sulfanilamida, sulfatiazol, sulfacloropiridacina y sulfametacina.

## MATERIAL Y METODO

Se usó un Cromatógrafo Líquido de Alto Desempeño marca MERCK-HITACHI, modelo LichroGraph L-6200 A Intelligent pump, Detector UV-VIS modelo L-4250, Chromo-integrador modelo D-2500, con una columna LiChroCART® 250-4 HPLC-Cartridge, LiChrospher® 100 RP-18 (5 mm). Flujo: 1,0 mL/min, longitud de onda: 254 nm; loop: 100 mL a temperatura ambiente (20-22°C). Fase móvil: (a) Ac. Trifluoroacético (TFA), 0.1%: (b) Acetonitrilo+TFA 0.08% en forma de gradiente (desde 94% hasta 60% de (a) durante 40 minutos).

Se emplearon estándares de 8 sulfamidas (sulfas) marca SIGMA (St. Louis, MO 63178 USA): Sulfametizol, Sulfadimetoxina, Sulfadiacina, Sulfameracina, Sulfanilamida, Sulfatiazol, Sulfacloropiridacina, Sulfametacina.

De cada estándar se pesaron 10 mg, mezclándolos y solubilizándolos en acetonitrilo, completando a un volumen de 100 mL. De esta solución se tomaron alícuotas y se prepararon las siguientes concentraciones: 0,05; 0,10; 0,20, 0,40; 1,00 ppm, diluidas en fase móvil (95:5) para la curva de calibración de cada estándar. Previamente se determinaron los tiempos de retención de los estándares de sulfamidas en forma individual y luego se corrieron las 8 sulfamidas homogéneamente mezcladas. Se inyectaron 100 mL al equipo HPLC.

Para calcular la precisión se evaluó la dispersión de 6 inyecciones de la mezcla de los 8 estándares de sulfas, a 0,05 ppm.

Se midió la exactitud como el *Porcentaje de Recuperación*; para ello se agregaron los estándares a la miel (estándar interno) en concentraciones conocidas y se determinaron los porcentajes de recuperación para cada una de las sulfas estudiadas.

Con el propósito de probar la técnica se tomaron al azar 10 muestras de miel tomadas al azar, provenientes de un Proyecto SAG, proporcionadas por apicultores de la VIII y X regiones. Las muestras fueron obtenidas por centrifugación, almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz, en envases plásticos.

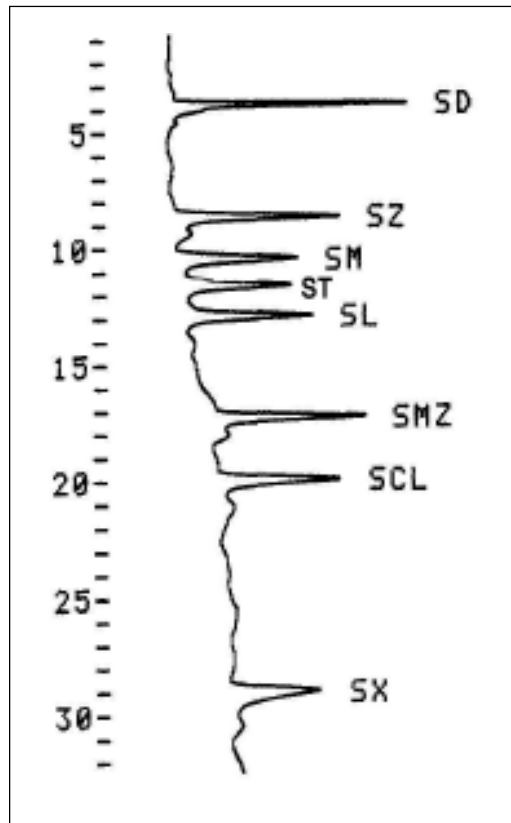
Para la extracción de muestras se pesaron 5 g de miel, los que se trataron con 20 mL de acetonitrilo más TFA al 0.1% y se mezclaron manualmente por 30 s; luego se filtró el sobrenadante en un papel Whatmann N° 1. Se evaporó el acetonitrilo a 40° C en un rotavapor, al vacío; luego se resuspendieron en 1 mL de fase móvil (95:5). De este volumen final se inyectaron 100 mL al equipo HPLC.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Basados en los trabajos de Belliaro (1981), Barry y Mac Eachern (1983) y Pagliuca *et al* (1999) y la experiencia obtenida en el transcurso de este montaje se realizó la extracción con acetonitrilo puro, ya que se constató empíricamente que la miel no se disuelve en este solvente y que además los estándares de cada una de las sulfas se solubilizan homogéneamente en acetonitrilo en forma individual, o como mezclas. El acetonitrilo, probado empíricamente, es capaz de solubilizar las sulfas estudiadas y no así la miel, lo que permite obtener un extracto con menos contaminantes.

Se determinaron los tiempos de retención para las 8 sulfas estudiadas en la columna del HPLC (Cuadro 1). En el perfil cromatográfico (Figura 1) se observa que las ocho sulfas estudiadas pueden separarse, con una buena resolución, bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente.

Durante el transcurso de este trabajo se observó que no todas las muestras presentaban el mismo perfil. Cuando una muestra de miel presentó



**Figura 1:** Perfil cromatográfico de los estándares de las 8 sulfamidas.

**Figure 1:** Chromatography profile of 8 sulphonamides standards

**Cuadro 1:** Tiempos de retención para cada sulfamida en la columna HPLC

**Table 1:** Retention time for each sulphonamide in the HPLC column

Sulfamida	Sigla	RT (min)
Sulfanilamida	SD	3,8
Sulfadiazina	SZ	8,7
Sulfameracina	SM	10,6
Sulfatiazol	ST	11,7
Sulfametizol	SL	13,1
Sulfametacina	SMZ	17,5
Sulfacloropiridacina	SCL	20,5
Sulfadimetoxina	SX	29,9

**Cuadro 2:** Coeficientes de determinación y ecuación de la curva, para cada sulfamida.

**Table 2:** Coefficients of determination and curve equation for sulphonamides.

Sulfamida	R <sup>2</sup>	Ecuación de la curva
Sulfanilamida□	0,9995	Y = 38335X + 1000
Sulfadiacina	0,9992	Y = 43322X - 991
Sulfameracina	0,9999	Y = 36872X - 259
Sulfatiazol	0,9982	Y = 36321X - 1051
Sulfametizol	0,9990	Y = 47068X + 228
Sulfametacina	0,9976	Y = 38547X + 1044
Sulfacoropiridacina	0,9995	Y = 41849X - 570
Sulfadimetoxina	0,9993	Y = 40901X - 591

demasiada interferencia por contaminantes, se agregó una cantidad conocida de estándar y se verificó si el área correspondiente al tiempo de retención aumentaba proporcionalmente. En la mayoría de los casos el perfil cromatográfico se va aplanando después de los primeros 15 minutos.

#### Curva de calibración

Se calcularon los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) y la ecuación de las curvas

(Cuadro 2), obteniéndose valores de R<sup>2</sup> muy cercanos a 1.0, lo que indica que la curva tiene un comportamiento lineal y directamente proporcional, con una baja dispersión de valores.

#### Precisión

Al observar los porcentajes de desviación estándar relativa (DER) (Cuadro 3), se desprende que el sistema entrega valores homogéneos, ya que porcentajes menores al 15%

**Cuadro 3:** Análisis de una mezcla de 8 estándares de sulfamidas en una concentración de 0,05 ppm.

**Table 3:** Analysis of a mixture of sulphonamides standards at 0,05 ppm.

SULFA <sup>1</sup>	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	Prom	DE	DER
	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	+ / -	%
SD□	0,06	0,05	0,05	0,08	0,07	0,08	0,063	0,011	18
SZ	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,073	0,005	7
SM	0,09	0,08	0,13	0,09	0,09	0,1	0,096	0,018	19
ST	0,08	0,06	0,09	0,07	0,08	0,08	0,076	0,010	14
SL	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,043	0,006	14
SMZ	0,03	0,05	0,03	0,06	0,05	0,04	0,040	0,013	32
SCL	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,073	0,006	9
SX	0,13	0,09	0,11	0,06	0,1	0,09	0,096	0,025	26

R= Repetición; Prom= concentración promedio; DE= Desviación Estándar; DER= Desviación Estándar Relativa.

<sup>1</sup> ver cuadro 5 (abreviaciones)

**Cuadro 4:** Porcentaje de Recuperación, agregando 1 ppm, de estándar de sulfamidas a la miel.

**Table 4:** Percent recovery; honey with 1 ppm of sulphonamides standard added.

SULFA <sup>1</sup>	%
SD□	117
SZ	67
SM	83
ST	49
SL	79
SMZ	97
SCL	85
SX	94

<sup>1</sup> ver cuadro 5 (abreviaciones)

indican que no existe diferencia entre inyecciones del estándar. En el caso de SMZ (32%) y SX (26%), la homogeneidad es menor dependiendo de factores no determinados.

#### **Exactitud**

Sin bien la recuperación, por este método, no es muy alta en algunas de las sulfas (ST 49% y SZ 67%) (Cuadro 4), no dejan de ser interesantes los resultados ya que cualquier concentración detectada y/o cuantificada por esta técnica advierte de la presencia de residuos de sulfamidas en la miel y por lo tanto su concentración real es probablemente aún mayor. Considerando que en el ámbito nacional no se ha descrito un método en HPLC para determinar estos analitos en miel, es de gran ayuda como método de selección de un gran número de muestras, para conocer si sus niveles sobrepasan el límite máximo permitido.

Autores como Horie *et al* 1992; Viñas *et al* 1995; Caballero *et al* 2001, consiguen un porcentaje de recuperación mayor, específicamente en sulfatiazol, utilizando otros solventes orgánicos en la extracción de estas o en la composición de la fase móvil o bien incorporando un detector de arreglo de diodo a su equipo HPLC. Pero ninguno analiza una mezcla idéntica o similar a la estudiada en el presente trabajo.

#### **Límite de detección y Límite de cuantificación**

Los parámetros a definir para evaluar la «sensibilidad del método» fueron los límites de detección y cuantificación. Inicialmente se trató de construir una curva de calibración con concentraciones menores a 0,05 ppm, pero no se obtuvo una respuesta confiable por lo que se determinaron éstos a partir de la curva de calibración. La linealidad entre concentración y respuesta, fue directamente proporcional hasta una concentración de 1,0 ppm.

Los valores obtenidos para cada sulfa, tanto del límite de detección como de cuantificación (Cuadro 5), difieren unos de otros, especialmente en el caso de Sulfametizol (0,01 y 0,05 respectivamente), por lo que se optó por definir una valor cercano al promedio de estos valores. Los límites fijados para la técnica en forma global son los siguientes:

Límite de detección: 0.05 ppm

Límite de cuantificación: 0.3 ppm

Según los valores encontrados en las muestras de las diferentes mieles (Cuadro 6), en un 60% de ellas se detectaron residuos de al menos una sulfa y en concentraciones que superan considerablemente las normas europeas de 0.05 ppm o 50 ppb, (Beckh, 2001). En el 40% restante no se pudo determinar la presencia de



fluorescencia, y así cuantificar concentraciones más bajas (del orden de ppb)

## CONCLUSIONES

Se implementó y evaluó una técnica de HPLC - fase reversa mediante la cual se pudo detectar y cuantificar en miel las siguientes sulfamidas: sulfametizol, sulfadimetoxina, sulfadiacina, sulfameracina, sulfanilamida, sulfatiazol, sulfacloropiridacina y sulfametacina.

El método desarrollado es simple, reproducible y permite evidenciar la presencia de estas drogas en la miel, con una exactitud y precisión aceptables, dentro de los límites aquí establecidos.

## BIBLIOGRAFIA

- BARRY, C.; MACEACHERN, G. 1983. Reverse phase liquid Chromatographic determination of sulfathiazole residues in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 66 (1): 4-7.
- BELLIARDO, F. 1981 Determination of sulphonamide residues in honey by high pressure liquid chromatography. *Journal of Apiculture Research*. 20:44-48.
- CABALLERO, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. 1996. Validation of liquid chromatography and gas chromatography methods. Application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*. 686: 3-10.
- GRIMALT F.; ROMAGUERA C. 1980. Dermatitis de contacto. Fontalba. Barcelona- España. pp 15-151-152.
- HORIE M., SAITO K.; NOSE N. 1992. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International*. 75 (5): 787-789.
- ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (FAO/OMS). 1994. *Codex Alimentarius. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos*. 3 : 54-58.
- ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (FAO/OMS ). 1989. Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos. 34º Informe del Comité Mixto de expertos en Aditivos Alimentarios. Organización Mundial de la Salud, Ginebra
- PAGLIUCA, G.; GAZZOTTI, T.; KINDT, M.; ZIRONI, E.; FORMATO, G.; ROSMINI, R. 1999. «La vigilanza sanitaria sul miele: proposta di un metodo analitico per la determinazione di residui di ossitetraciclina e sulfatiazolo mediante HPLC». Correo personal . pagliuca@vet.unibo.it (10 oct. 2000).