

## METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN MIEL.

S. DIEGUEZ <sup>1</sup>, A. SORACI <sup>2</sup>, E. BEDASCARRASBURE <sup>3</sup>, C. LIBONATTI <sup>1</sup>

### RESUMEN

Se ha desarrollado un método rápido y preciso, para la determinación de concentraciones residuales de oxitetraciclina en miel, realizando una doble extracción con acetona y HPLC fase reversa en modo isocrático con detector UV.

El límite de cuantificación fue de 0,05 mg/g, y la recuperación de la droga en este nivel fue del 90%.

**Palabras clave:** *Miel / Residuos / antibióticos / HPLC*

---

<sup>1</sup> Área de Calidad de Miel, Dpto. de Tecnología de Alimentos, Facultad de Cs. Veterinarias (UNCPBA).  
TE: 02293 426667, e-mail: redlab@vet.unicen.edu.ar

<sup>2</sup> Prof. Área Toxicología, Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Cs. Veterinarias (UNCPBA). e-mail:  
alejandro@vet.unicen.edu.ar

<sup>3</sup> Prof. Área Producción Apícola, Dpto. de Producción Animal, Facultad de Cs. Veterinarias (UNCPBA)  
- INTA EEA Famaillá. TE: 03863 461048, e-mail: ebedas@inta.gov.ar

## SUMMARY

A rapid and precise method has been developed to detect residual concentrations of oxytetracycline in honey by a double extraction with acetone and reverse phase HPLC, working in isocratic mode and UV detector.

The quantification limit was 0.05 mg/g obtaining a 90% recovery at this level.

**Key words:** *Honey / Antibiotics / Residues / HPLC*

## INTRODUCCIÓN

En la producción apícola de nuestro país, el uso de antibióticos se ha generalizado a partir de la aparición de las enfermedades bacterianas de la cría, principalmente la Loque Europea y Loque Americana. Actualmente, esta práctica se encuentra ampliamente difundida, siendo la oxitetraciclina en su forma de clorhidrato el antibiótico más comúnmente utilizado.

Pese a que actualmente se ha reducido significativamente el uso de antibióticos, utilizando medidas de manejo adecuadas y genética de alto comportamiento higiénico, su administración continúa siendo una práctica común en el apiario.

La presencia de antibióticos en los alimentos genera creciente preocupación en los consumidores debido a los riesgos de toxicidad o reacciones alérgicas en personas hipersensibles, y a la posibilidad de generación de resistencia por parte de microorganismos patógenos. Este hecho adquiere especial trascendencia en el caso de la miel, cuyo consumo se ubica en el segmento de los alimentos para la salud o « Healthy foods ».

La contaminación de los productos de la colmena con medicamentos de uso veterinario influye negativamente al momento de su comercialización y todos los esfuerzos realizados para garantizar un producto libre de contaminantes redundaran en beneficio de la apicultura argentina, potenciando sus ventajas comparativas y asegu-

rando una penetración en segmentos del mercado de mayores precios relativos.

El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar una metodología analítica rápida y de bajo costo, que permita detectar concentraciones residuales de oxitetraciclina en miel, cumpliendo con las exigencias de los mercados internacionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### \* Drogas y reactivos

Acetonitrilo calidad HPLC, Laboratorios J. T. Baker; agua destilada calidad HPLC, acetona, SDS, ácido oxálico de Laboratorios Merck, Clorhidrato de oxitetraciclina de Laboratorios Sigma Chemicals.

### \* Sistema HPLC

Se utilizó un equipo HPLC, en modo isocrático (SHIMADZU AVP10) manteniendo un flujo de 1ml/min, inyector manual (Rheodyne) con loop de 20 ml. La separación se realizó mediante un cartucho RP C18 de 5mm, 125 x 4mm (Lichrosphere MERCK), y la detección mediante detector UV (SHIMADZU SPD-10 Avp) operando a 270 nm (AUF=0.0010). El programa de integración de datos utilizado fue el Class LC10 (trabajando con atenuación =4)

La fase móvil compuesta por acetonitrilo y solución acuosa de ácido oxálico 0.01M (pH 2,1), en proporción 35:65, respectivamente; agregándose a la porción acuosa SDS para lograr una concentración 0,01M (4). Estos solventes fueron filtrados diariamente previo a su utilización.

### \* Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos consistió en la realización de una regresión lineal simple para obtener la curva de calibración, y análisis univariado para calcular los CV en cada concentración. Se utilizó el programa Instat Graph.

### \* Método de extracción

Para la extracción se suplementó 1,00 gr de miel libre de antibióticos (tomada a partir de un apiario donde no se utiliza ningún tipo de antimicrobianos), con cantidades adecuadas de solución estándar de oxitetraciclina en acetona. Se realizó una doble extrac-

ción con 6ml de acetona en cada paso. El solvente se evaporó a seco bajo corriente de aire a 30°C. El extracto seco se resuspendió en 200 ml de H<sub>2</sub>O, y se inyectó en el HPLC.

La validación del método se realizó siguiendo las normas fijadas por el Comité SFSPT, Paris, 1996.

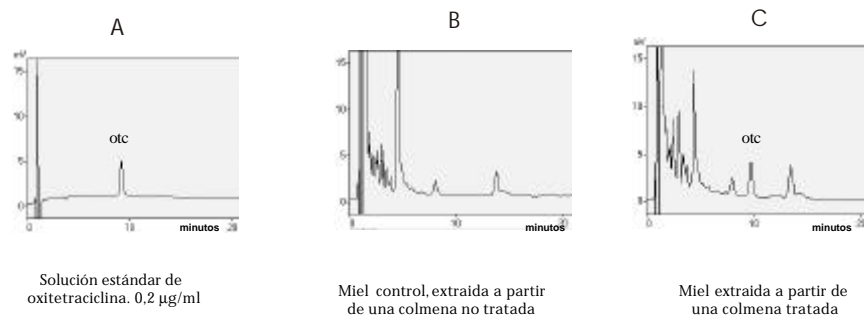
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos métodos de detección de oxitetraciclina en miel han sido desarrollados por distintos investigadores. Los primeros en ser utilizados fueron biológicos, donde se cuantifica la presencia del antibiótico en función del diámetro del halo de inhibición formado cuando el mismo es puesto en contacto con una cepa indicadora. Este tipo de ensayos no es selectivo ya que los microorganismos utilizados son sensibles a más de un antibiótico. Por otra parte, existe un efecto inhibitorio natural de la miel (que varía según el tipo de miel) lo cual hace que los resultados sean confiables sólo a concentraciones relativamente altas, siendo elevados los límites de cuantificación con los que se trabaja. De esta manera, trabajando con distintos microorganismos, L. Roth (1986) obtuvo los mejores resultados utilizando *B. cereus* como cepa indicadora, alcanzando un límite de cuantificación de 0,4 ug/g (9). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, trabajando con *B. cereus*, permitieron cuantificar sólo hasta 0,3 ug/g de oxitetraciclina en miel (resultados aún no publicados).

Por otra parte se han estudiado métodos inmunoquímicos para la detección de residuos de antibióticos en miel, pero éstos requieren mayor desarrollo ya que existe un alto porcentaje de falsos positivos.

El desarrollo de una metodología selectiva, como la cromatografía líquida de alta resolución, ha permitido disminuir los límites de cuantificación, siendo crucial en este caso el método de extracción de la molécula de interés a partir de la matriz biológica donde se encuentra. Existen diversas técnicas que si bien alcanzan menores límites de cuantificación (hasta 1,8ng/g), involucran distintos pasos de extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido en tandem. Por otra parte, se utilizan en general detectores más

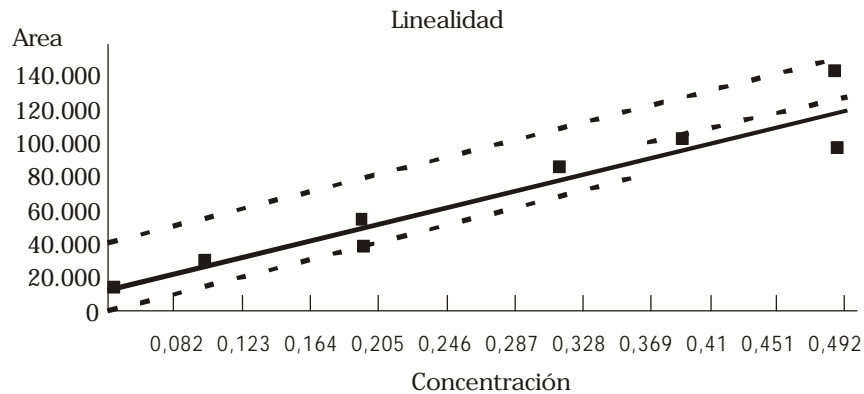
**Figura 1**



sofisticados como el de espectrometría de masa. Esto hace que las técnicas sean onerosas y engorrosas.

La metodología desarrollada en el presente estudio es sencilla ya que involucra únicamente extracción líquido-líquido, utilizando un equipamiento estándar como el HPLC con detector UV; a la vez

**Figura 2**



que se ajusta a los requerimientos establecidos por el Plan CREHA, puesto en marcha por SENASA en 1998, que exige para la oxitetraciclina un límite permitido de 0.1ppm.

La Figura 1 muestra que no existen interferencias en el tiempo de retención de la oxitetraciclina.

Cuando se estudia la linealidad se obtiene un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.99 dentro de un rango lineal de concentraciones de oxitetraciclina entre 0.05 y 0.5 mg/g de miel (Figura 2).

El límite de cuantificación fue de 0.05  $\mu\text{g/g}$  de miel (C.V: 11%). En este nivel, la recuperación de oxitetraciclina a partir de miel fue del 90% y el coeficiente de variación del 11%.

La recta obtenida representa el área debajo de la curva obtenida en el cromatograma en función de la concentración del antibiótico en miel.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado a partir del equipamiento incorporado con el financiamiento de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y gracias al apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

## BIBLIOGRAFÍA

ARGAUER; MOATS. 1991. "Degradation of oxytetracycline in honey as measured by fluorescence and liquid chromatographic assays". *Apidologie*, 22: 109-115

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, CALGARY FOOD LABORATORY. (1999). "Tetracycline Residues in Honey (HPLC-MSD Method)". Method ACC-042-V10

CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; BOULANGER, B.; CHEVALIER, P.; CHIAP, P.; GRANDJEAN, D.; HUBERT, P.; LAGORCE, P.; LAPARRA, M.C.; LAURENTIE, M.; ET NIVET, J.C. (1996). "Méthodes Chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: Stratégie de Validation". Rapport d'une commission SFSTP.

GALEANO DIAZ; GUIBERTEAU; CABANILLAS; SALINAS. 1990. "Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high performance liquid chromatography". *Analytical Letters* 23 (4): 607 – 616 .

**HEERING W.; USLEBER E.; DIETRICH R.; MARTLBAUER E. "INMUNOCHEMICAL SCREENING FOR ANTIMICROBIAL DRUG RESIDUES IN COMMERCIAL HONEY" (1998).** Analyst, 123: 2759 – 2762.

**MASCHER, A.; LAVAGNOLLS.; CURATOLO, M. (1996).** "Determination of Residual Oxytetracycline in Honey with an Immunoassay Kit". Apidologie, 27: 229-233.

**MATSUKA, M.; NAKAMURA, J. 1990.** Oxytetracycline residues in honey and royal jelly". Journal of Apicultural Research, 29(2): 112-117

**OKA H.; ITO Y.; IKAI Y.; KAGAMI T.; HARADA K. (1998).** "Mass Spectrometric Analysis of Tetracycline Antibiotics in Foods". Journal of Chromatography A, 812: 309-319.

**ROTH L.; KWAN S.; SPORNS P. (1986).** "Use of a Disc Assay System to Detect Oxytetracycline Residues in Honey". Journal of Food Protection, 49(436-441)

**SALINAS; BERZAS NEVADO; ESPINOSA. 1991.** "Simultaneous determination of sulfathiazole and oxytetracycline in honey by derivative spectrophotometry". Microchemical Journal, 43: 244 – 252.

**Secretaría de Agricultura, Ganadería Pesca y Alimentación, Resolución 124/98.** Plan de Control de Residuos e Higiene en los Alimentos (1998).

**WILSON W. "Residues of Oxytetracycline in Honey Stored by Apis mellifera". (1974).** Environmental Entomology, 3 (4):674-676.