



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

E.T.S.I. AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

# **DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS EN MIEL POR HPLC-MS/MS.**

## **VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y  
CALIDAD ALIMENTARIA

Alumno/a: Marta Requena Marco

Tutor/a: Isabel Escriche Roberto

Curso Académico: 2013/2014

Valencia, 30/06/2014

# DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS EN MIEL POR HPLC-MS/MS. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

Requena Marco Marta, Juan Borrás Marisol, Escriche Roberto Isabel<sup>1</sup>

## RESUMEN

La presencia de residuos de antibióticos en la miel ha generado una creciente preocupación por su repercusión en la salud de la población. Su detección constituye uno de los principales objetivos de las autoridades sanitarias, por lo que se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan la obtención de datos fiables. En este trabajo se ha puesto a punto y validado un método para la cuantificación de 4 tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y doxiciclina) en miel mediante la técnica de HPLC-MS/MS triple cuadrupolo. El método se ha validado siguiendo los criterios establecidos en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE, calculando para cada una de ellas la linealidad, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección y el límite de cuantificación. El límite de cuantificación obtenido para las 4 tetraciclinas estudiadas fue  $\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$  y la recuperación osciló entre 73-118%. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el laboratorio está en camino de validar el método analítico ya que cumple con los requisitos anteriormente comentados.

Para corroborar la efectividad del método validado se analizaron 19 muestras de miel, resultando 3 de ellas positivas a la tetraciclina. Esto pone en evidencia que puede haber una exposición real a estas sustancias por el consumo de miel y que por lo tanto es necesario realizar los adecuados controles analíticos en la recepción de la materia prima en las industrias de envasado.

PALABRAS CLAVE: Miel, HPLC-MS/MS, tetraciclinas.

## RESUMEN

La presència de residus d'antibiòtics en la mel ha generat una creixent preocupació per la seua repercussió en la salut de la població. La seua detecció constitueix un dels principals objectius de les autoritats sanitàries, pel que es fa necessari el desenvolupament de mètodes analítics que permetin l'obtenció de dades fiables. En aquest treball s'ha posat a punt i validat un mètode per a la quantificació de 4 tetraciclins (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina i doxiciclina) en mel mitjançant la tècnica de HPLC-MS/MS triple quadrupol.

<sup>1</sup>Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Departamento de Tecnología de Alimentos (DTAL), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n 46022 Valencia, España.

El mètode s'ha validat seguint els criteris establerts en la Decisió de la Comissió Europea 2002/657/CE, calculant per a cadascuna d'elles la linealitat, exactitud, reproductibilitat, repetibilitat, límit de detecció i el límit de quantificació. El límit de quantificació obtingut per les 4 tetraciclines estudiades va ser  $\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$  i la recuperació va oscil·lar entre 73-118%. Els resultats obtinguts en aquest treball permeten concloure que el laboratori està en camí de validar el mètode analític ja que compleix amb els requisits anteriorment comentats.

Per corroborar l'efectivitat del mètode validat es van analitzar 19 mostres de mel, resultant 3 d'elles positives a la tetraciclina. Això posa en evidència que pot haver-hi una exposició real a aquestes substàncies pel consum de mel i que per tant cal fer els adequats controls analítics en la recepció de la matèria primera en les indústries d'envasament.

PARAULES CLAU: Mel, HPLC-MS/MS, tetraciclines.

## **ABSTRACT**

The presence of antibiotic residues in honey has generated a growing concern about their impact on population health. Its detection is one of the main objectives of the health authorities, so the development of analytical methods for obtaining reliable data is necessary. In this work it has developed and validated a method for quantification of four tetracyclines (chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline and doxycycline) in honey by HPLC-MS/MS triple quadrupole technique. The method has been validated according to the criteria set out in the European Commission Decision 2002/657/EC, calculating for each linearity, accuracy, reproducibility, repeatability, limit of detection and limit of quantification. The limit of quantification obtained for 4 tetracyclines was studied  $\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$  and the recovery ranged from 73-118%. The results obtained in this study allow us to conclude that the laboratory is underway to validate the analytical method as it meets the requirements discussed above.

To corroborate the effectiveness of the validated method 19 honey samples were analyzed, including 3 resulting positive tetracycline. This shows that there may be a real exposure to these substances by eating honey and it is therefore necessary to make appropriate analytical checks in receiving raw materials in packaging industries.

KEY WORDS: honey, HPLC-MS/MS, tetracyclines.

## 1. INTRODUCCIÓN

La presencia de residuos de antibióticos en la miel genera una preocupación creciente como consecuencia de la repercusión que tiene en la salud de la población. Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro con acción bacteriostática tanto para los microorganismos gram-positivos como para los gram-negativos (Viñas et al., 2003; Pérez Trallero, 2003). Son utilizados como medicamentos veterinarios y en tratamientos preventivos adicionados a los piensos. En el sector apícola, las tetraciclinas son generalmente utilizadas por los apicultores para el tratamiento de enfermedades infecciosas de las abejas (Khong et al., 2011). Entre ellas, las más utilizadas con esta finalidad son: oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) y doxiciclina (DC). Concretamente, la oxitetraciclina se suele utilizar para tratar la enfermedad de la Loque europea (EFB) y la Loque americana (AFB) causadas respectivamente por *Paenibacillus larvae* (Bacillus) y *Streptococcus pluton*, (Al-Waili et al., 2012). Ambas enfermedades son las que más problemas están causando en la apicultura a nivel mundial por afectar a las larvas y las pupas de las abejas melíferas (Hammel et al., 2008).

La detección de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos constituye uno de los principales objetivos de las autoridades sanitarias, por lo que se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan la obtención de datos fiables (Menal, 2010; Bailon, 2009). En el sector apícola la presencia de sustancias contaminantes (antibióticos y residuos de pesticidas) constituye un riesgo tanto para las abejas como para el consumidor (SADA, 2014). La ingestión de residuos de medicamentos veterinarios ocasionan problemas para la salud, no solo por la toxicidad inherente a ellos (Sheridan et al., 2008), sino además, por las posibles resistencias a microorganismos (Al-Waili et al.; 2012), y reacciones alérgicas que provocan en ciertos individuos (Verzegnassi et al., 2002).

Actualmente la Unión Europea (UE) ha establecido límites máximos de residuos (LMR) para algunos antibióticos, entre ellos tetraciclinas, en alimentos de origen animal. Sin embargo, en el caso concreto de la miel estos límites no están fijados. Al no existir LMR para la miel, se exige que éstos compuestos no deben estar presentes por encima del límite de cuantificación del método analítico utilizado (Maudens et al., 2004). Algunos países, como Suiza, Reino Unido y Bélgica han establecido, a nivel interno, límites máximos para la presencia de antibióticos en miel. Estos límites, generalmente se encuentran entre 0.01 y 0.05 mg/kg para cada grupo de antibióticos (Al-Waili et al.; 2012). En el caso concreto de las tetraciclinas y su respectivos 4-epímeros, las autoridades suizas han establecido en la miel un LMR de 20 µg/kg (Khong et al., 2011).

La validación de un métodos analítico es esencial para demostrar la fiabilidad de los datos obtenidos en una determinación analítica (Caballero, et al., 1996; Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE, 2002; Bressolle et al., 1996). Por todo ello, el objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto y validación de un método para la cuantificación de 4 tetraciclinas en miel mediante la técnica HPLC-MS/MS triple cuadrupolo y la aplicación de

esta metodología validada a muestras reales obtenidas en la etapa de recepción de empresas envasadoras.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Muestras**

El estudio de validación se realizó con una miel cruda (matriz blanco) en la que se comprobó la ausencia de los compuestos objeto de análisis.

Se analizaron 19 muestras de miel cruda proporcionadas por varias empresas apícolas para determinar la posible presencia de las 4 tetraciclinas validadas. Estas muestras procedían del control de la materia prima que las empresas realizan en la etapa de recepción.

### **2.2 Reactivos y materiales**

Se adquirieron 4 estándares de tetraciclinas, calidad cromatográfica de la marca Fluka: clortetraciclina hidroclicloruro, doxiciclina hclato, oxitetraciclina hidroclicloruro y tetraciclina hidroclicloruro. El acetato de sodio 100 mM y el metanol fueron proporcionados por Panreac. El ácido fórmico era de Merck (Darmstadt, Alemania) y el acetonitrilo de Scharlab (Sentmenat, España). La extracción en fase sólida (SPE) se realizó con cartuchos Strata X-CW 60 mg/3 mL (33  $\mu$ m, Weak Cation Mixed-Mode Polymeric Sorbent) de Phenomenex (Torrance, CA). El agua bidestilada se obtenía de un sistema de agua Milli-Q (Millipore Corp., Billerica, MA). Todos los reactivos químicos empleados eran grado analítico y los disolventes utilizados de calidad HPLC.

### **2.3 Equipos**

Se utilizó un equipo HPLC Agilent 1200 Series Rapid Resolution, equipado con un desgasificador, una bomba binaria, un inyector automático y un compartimento termostático de columna, acoplado a un detector de triple cuadrupolo Agilent LC/MS 6410 con fuente ionización ESI (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE). La columna cromatográfica fue una Kinetex XB-C18 (1.7 $\mu$ m de 50x2.10 mm) suministrada por Phenomenex (USA). Además, se utilizó un agitador vortex Maxi MixII Mixer de Barnstead (Iowa, USA), un equipo de extracción en fase sólida Lichrolut vaccum manifold con bomba de vacío (Merck, Darmstadt, Alemania), y un baño termostático (Grant GR, Cambridh, Inglaterra).

### **2.4 Preparación de las disoluciones patrones**

*Disolución stock (200  $\mu$ g/mL).* Mezcla multipatón de cuatro tetraciclinas en metanol. De cada estándar puro de tetraciclinas se pesaron las cantidades apropiadas para obtener la concentración deseada, mezclándolos y solubilizándolos en metanol, completando a un volumen de 100 mL. Esta disolución se conservaba a -20°C.

*Disolución de trabajo I (1 µg/mL).* De la disolución stock se pipeteaba 50 µmL y se aforaba a 10 mL con agua Milli-Q. A partir de esta disolución se fortificaba las muestras para los niveles: 5, 10 y 50 µg/mL, tomando 5, 10, y 50 µL respectivamente.

*Disolución de trabajo II (0,1 µg/mL).* De la disolución stock se pipeteaba un volumen de 5 µg/L en un matraz de 10 mL y se aforaba con agua bidestilada. Con esta solución se fortificaba las muestras para los niveles 0.5 y 1 µg/mL, tomando 5 y 10 µL respectivamente.

Para el control de los patrones, se verificaba por comparación con la solución stock en uso. De manera que se preparaban sendos patrones de 5 µg/mL con las dos soluciones a comparar y se inyectaban por duplicado. La disolución recién preparada era válida si cumplía que la variación en la respuesta era inferior a 10%.

## **2.5 Preparación y extracción de la muestra**

En un vaso de precipitado se pesaba 1 gramo de miel y seguidamente para las muestras fortificadas, se adicionaba el patrón multianalito. A continuación, se añadía 3 mL de acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) y se dejaba en agitación hasta su completa disolución a temperatura ambiente. Para la extracción en fase sólida, en primer lugar se acondicionaban los cartuchos con 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de agua bidestilada. Una vez acondicionados, se pasaban 3 mL de la muestra y se realizaba un doble lavado con 2 mL de agua bidestilada y 2 mL de metanol. Se secaban los cartuchos durante 2 minutos a 10 mmHg de presión y posteriormente se realizaba una elución con 2 mL de ácido fórmico al 2% en metanol. Se llevaba a sequedad evaporando el extracto con nitrógeno a 40°C. Finalmente, el extracto seco se reconstituía con 100 µL de fase móvil tamponada (agua bidestilada: acetonitrilo 95:5) para su análisis cromatográfico.

## **2.6. HPLC-MS/MS**

La separación cromatográfica se llevaba a cabo con una fase móvil consistente en agua bidestilada con un 0.1% de ácido fórmico (fase A) y en acetonitrilo (fase B). El gradiente cromatográfico para el análisis de las 4 tetraciclinas utilizado en este estudio se muestra en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Gradiente de elución cromatografico para el análisis de las 4 tetraciclinas.

Tiempo (min)	%A	%B	Flujo (mL/min)
0.0	95.0	5.00	0.400
5.0	50.0	50.0	0.400
6.0	50.0	50.0	0.400
6.1	95.0	5.00	0.400
7.0	95.0	5.00	0.400
13.0	95.0	5.00	0.400

Se inyectaban 5  $\mu$ L manteniéndose la temperatura a 30°C durante todo el análisis. El fragmentor aplicado en todos los casos fue de 120V y la resolución de las masas fue de la unidad. Las transiciones de monitorización (MRM) y los parámetros específicos para cada tetraciclina utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 2.

**TABLA 2.** Transiciones MRM y parámetros.

Analito	Ion precursor	Ion producto I Cuantitativo	Collision Energy (V)	Ion producto II Cualitativo	Collision Energy (V)	Dwell time (ms)
Clortetraciclina	479.0	462.0	12	444.0	20	75
Oxitetraciclina	461.4	443.3	8	426.3	16	75
Tetraciclina	445.4	428.3	12	410.3	16	75
Doxiciclina	445.4	428.3	12	154.3	24	75

## 2.7. Cuantificación

La cuantificación de las 4 tetraciclinas se llevó a cabo mediante curvas de calibrado obtenidas representando las áreas de los picos de los iones producto (MRM) que presentaban mayor intensidad frente a su concentración nominal ( $\mu$ g/kg) en un rango de calibración de las fortificaciones preparadas de 0.5 a 50  $\mu$ g/kg. La construcción de las curvas de calibrado se realizó mediante el método de fortificación de un blanco de miel (exenta de los compuestos), ya que el proceso de ionización de los analitos en el sistema espectrómetro de masas, se ve interferido por los múltiples componentes de la matriz de miel (Verzegnassi et al., 2002).

Se utilizó el software del espectrómetro de masas (MassHunter) para el tratamiento de los datos.

## 2.8. Validación del método

La validación del método se llevó a cabo siguiendo los criterios establecidos en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE. Como parámetros de validación se determinaron: la linealidad (curva de calibración), la exactitud (porcentaje de recuperación), la precisión (reproducibilidad y repetibilidad), el límite de detección (LODs) y el límite de cuantificación (LOQs).

### LINEALIDAD

La linealidad de la respuesta es el parámetro que permite expresar la capacidad del método analítico para dar resultados directamente proporcionales a la concentración de este en la muestra. Se calcularon los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y las ecuaciones de las curvas. Para cada compuesto evaluado se construyeron diferentes curvas de calibrado a partir de la miel blanco fortificada para obtener los cinco niveles de fortificación correspondientes incluido el cero: 0, 0.5, 1, 5, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Cada nivel de concentración se inyectó por sextuplicado.

### EXACTITUD

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. Para calcular la exactitud, se llevaron a cabo estudios de recuperación. Tras fortificar las muestras, se comparaba la diferencia entre el valor teórico de la adición y el resultado obtenido de la muestra enriquecida. El porcentaje de recuperación se calculó en tres niveles, para ello se seleccionaron 18 alícuotas de miel blanco y se fortificaron con 1, 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a partir de las disoluciones de trabajo I y II. Según la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE, la recuperación debe estar entre el 70-120%.

### PRECISIÓN

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad ( $CV_r$ ) y reproducibilidad ( $CV_R$ ). La precisión representa el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones predeterminadas. La precisión se calcula como desviación estándar de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación estándar menor es la precisión.

La repetibilidad fue evaluada en el mismo día, por el mismo analista, las mismas condiciones de operación y el mismo equipo. Se calculó a partir de los estudios de recuperación obtenidos de las tres muestras fortificadas para los tres niveles de concentración del primer día. En días consecutivos se repitió el mismo procedimiento obteniéndose un total de 54 resultados correspondientes al día uno, día dos y día tres. Con el promedio de los resultados de recuperación de los tres días se calculó la reproducibilidad. El procedimiento seguido para el estudio de reproducibilidad fue el mismo que



para el de repetibilidad pero realizándose los ensayos en días y analistas diferentes.

## LOD Y LOQ

Los límites de detección LODs y de cuantificación LOQs se calcularon fortificando blancos a diferentes concentraciones y aplicando el procedimiento de extracción. Estos valores se corresponden a la relación señal/ruido calculada en un tramo del cromatograma donde se espera encontrar al analito. Se calculó el LOD como 3 veces la señal ruido (obtenida del análisis de 20 blancos) y 10 veces para el LOQ (obtenida del análisis de 20 blancos).

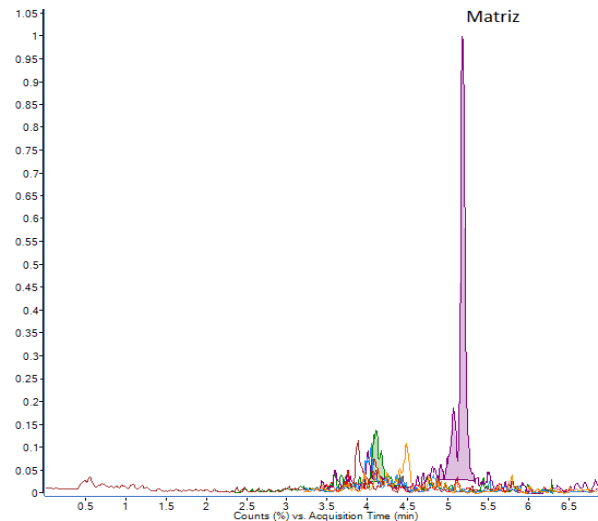
## 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 3.1. Selección de los iones producto

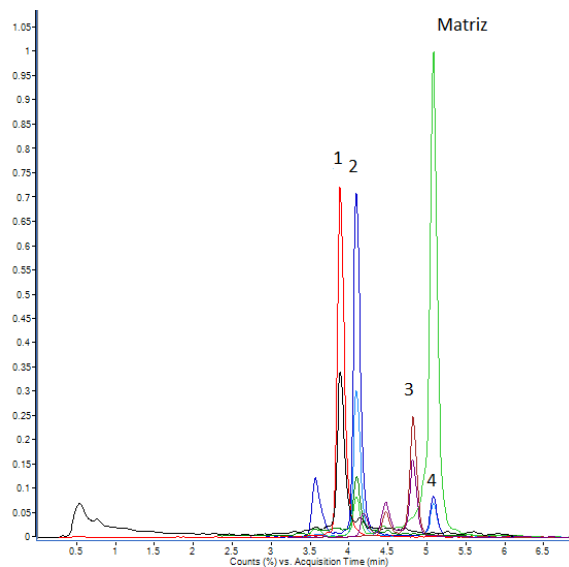
La Figura 1 representa el cromatograma de iones totales (TIC) de la matriz blanco, es decir, una miel libre de los compuestos analizados. En la Figura 2 se muestra asimismo un TIC de la matriz fortificada con la mezcla multipatrón. Los tiempos de retención fueron: para la oxitetraciclina 3.92 min, para la doxiciclina 4.13 min, para la tetraciclina 4.87 min y para la clortetraciclina 5.1 min.

Las cuatro tetraciclinas estudiadas en este trabajo presentaron una buena ionización, y los únicos iones moleculares formados fueron los protonados. Tal y como marca la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE, para todos los iones productos seleccionados, se comprobó que la relación señal ruido fuera  $\geq 3:1$ .

Dos de las tetraciclinas, en concreto, la doxitetraclina y la tetraciclina presentaron el mismo ion precursor (445.4) e igual ion producto 1 (428.3) (Tabla 2). Sin embargo, esto no presentó ningún problema para la identificación de ambos compuestos, ya que sus tiempos de retención eran distintos: 4.13 y 4.87, respectivamente.



**Figura 1:** Cromatograma (MRM) de la matriz blanco.



**Figura 2:** Cromatograma MRM de los iones totales de la matriz fortificada con la mezcla multipatrón. 1: Oxitetraciclina; 2 Doxitetraciclina; 3: Tetraciclina 4: Clortetraciclina.

### 3.2. Resultados de la Validación

Los valores de  $R^2$  obtenidos para el estudio de la linealidad fueron en todos los casos superiores a 0.99 (Tabla 3). Esto demuestra que la curva presenta un comportamiento lineal o lo que es lo mismo, existe una respuesta directamente proporcional a la concentración de cada analito en el rango de concentraciones estudiado.

**TABLA 3:** Coeficientes de determinación y ecuación de la curva para cada tetraciclina.

<b>Tetraciclina</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Ecuación de la curva</b>
Clortetraciclina	0.992	$y = 114.74x$
Doxiciclina	0.991	$y = 365.84x$
Oxitetraciclina	0.992	$y = 273.78x$
Tetraciclina	0.993	$y = 289.93x$

La Tabla 4 muestra los resultados de la validación según las normas establecidas en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE.

Las recuperaciones obtenidas para cada una de las tetraciclinas estudiadas, se aproximaron al 100%, desde un valor mínimo de 73% para la clortetraciclina, hasta un valor máximo de 118% para la oxitetraciclina. Los resultados obtenidos fueron conformes con las especificaciones de la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE, que establece que la recuperación debe encontrarse entre un 70 y 120%.

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad ( $CV_r$ ) y reproducibilidad ( $CV_R$ ). Para la oxitetraciclina la repetibilidad y la reproducibilidad nunca superó el 20% a ninguno de los niveles (valor considerado como recomendable por Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE). Sin embargo, para el resto de compuestos estudiados, este comportamiento no siempre fue igual. En el caso de la repetibilidad, en todas las tetraciclinas para los niveles 1 y 3 se observaron porcentajes de desviación estándar relativa inferiores al 20% indicando la no existencia de diferencias significativas entre inyecciones. Respecto a la reproducibilidad, la mayoría de los resultados no superaron el 20%, a excepción de la clortetraciclina para los niveles 2 y 3; y la doxiciclina para el nivel 3.

**TABLA 4.** Resultados de la validación.  $CV_r$  (repetibilidad) y  $CV_R$  (reproducibilidad)

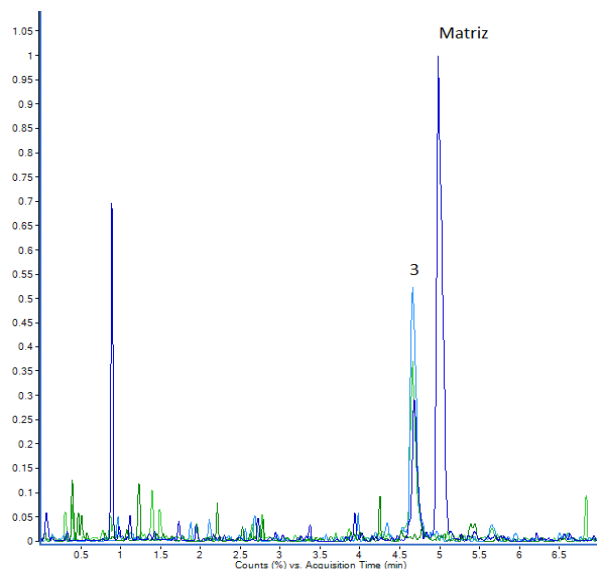
Compuesto	Nivel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	%Recuperación $\pm\text{D.S}\%$	$CV_r$ %	$CV_R$ %
<b>Clortetraciclina</b>	1	73 $\pm$ 13	18.4	19.0
	10	108 $\pm$ 33	33.0	21.5
	50	87 $\pm$ 13	15.4	24.7
<b>Doxiciclina</b>	1	95 $\pm$ 11	11.5	18.7
	10	108 $\pm$ 26	24.1	16.8
	50	89 $\pm$ 15	17.1	25.9
<b>Oxitetraciclina</b>	1	88 $\pm$ 9	10.0	15.2
	10	118 $\pm$ 24	20.0	15.6
	50	98 $\pm$ 8	7.7	18.7
<b>Tetraciclina</b>	1	87 $\pm$ 11	12.4	19.0
	10	115 $\pm$ 24	21.0	13.8
	50	97 $\pm$ 11	11.0	18.0

El LOD de los compuestos analizados fue de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para doxiciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina y de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para tetraciclina. El LOQ obtenido tanto para doxiciclina como para clortetraciclina fue 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , siendo de 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para oxitetraciclina y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para la tetraciclina.

### 3.3. Análisis de las muestras de miel

De las 19 muestras de miel analizadas 3 de ellas dieron positivo a la tetraciclina, en concentraciones de 5, 10 y 39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En la Figura 3 se muestra como ejemplo un cromatograma de los iones (MRM) de este antibiótico cuantificado en una muestra positiva. Los demás compuestos estudiados fueron negativos en el resto de muestras analizadas.

Teniendo en cuenta que en la actualidad, no existen LMR establecido para estos antibióticos, pero que en las transacciones comerciales de la UE no se admiten valores superiores a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sólo 2 de las 3 muestras que fueron positivas serían rechazadas.



**Figura 3.** Cromatograma ion (MRM) de tetraciclina en muestra positiva.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el laboratorio está en camino de validar el método analítico desarrollado para la determinación de 4 tetraciclinas en miel, ya que los parámetros requeridos por la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE, están dentro de los límites establecidos.

De las 19 muestras de miel analizadas 3 de ellas dieron positivo a la tetraciclina. De esto se deduce que puede haber una exposición real a la exposición de estas sustancias por el consumo de miel si no se realizan los adecuados controles analíticos en la recepción de la materia prima en las industrias de envasado.

#### 5. REFERENCIAS

- Al-Waili, N, Salom, K, Al-Ghamdi, A, MJaved Ansari, M. 2012. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 930849, 9 pages.
- Bailón, MI. 2009. Uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos beta-lactámicos en fármacos, aguas y alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Bressolle, F., Bromet-Petit, M. Audran, M. 1996. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*, 686, 3-10.
- 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.

- Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE. Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L221, 8 35.
- Hammel, Y.; Mohamed, R.; Gremaud, E.; LeBreton, M.; Guy, P. 2008. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1177, 58-76.
- Khong, S.P.; Hammel, Y.A.; Guy, P.A. 2005. Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 493–502.
- Maudens, E.; Zhang, G.F.; Lambert, E. 2004. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1047, 85-92.
- Menal, S. 2010. Métodos rápidos microbiológicos y de inmunoensayo para la determinación de residuos de antibióticos y sulfamidas en miel. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Pastor, N. 2011. Síntesis de inmunoreactivos para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Politècnica de València.
- Pérez-Trallero, E.; Igleis, L. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9):520-9.
- SADA; Sociedad Argentina de Apicultores. *Residuos en miel. Recomendaciones para evitarlos*, Comisión Nacional de Sanidad Apícola (CONASA) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, [en línea]. URL:<[http://www.sada.org.ar/Boletin-Gaceta/BC%2048/residuos\\_en\\_miel.htm](http://www.sada.org.ar/Boletin-Gaceta/BC%2048/residuos_en_miel.htm)>. [Consulta: 26 May. 2014].
- Sheridan, R.; Policastro, B.; Thomas S.; Rice, D. 2008. Analysis and Occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3509-3516.
- Verzegnassi, L.; Savoy-Perroud, M.C.; Stadler, R.H. 2002. Application of liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *Journal of Chromatography A*, 977, 77-87.
- Viñas, P.; Balsalobre, N.; López-Erroz, C.; Hernández-Córdoba, M. 2004. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *Journal of Chromatography A*, 1022, 125-129.