

# 5º Encontro Nacional de Cromatografia

Universidade de Aveiro  
2007



universidade de aveiro  
theoria poiesis praxis



SOCIEDADE  
PORTUGUESA  
DE QUÍMICA



Grupo de Cromatografia



**título**

5º Encontro Nacional de Cromatografia  
Sociedade Portuguesa de Química

**comissão organizadora**

Sílvia M. Rocha, Armando Silvestre, Ivonne Delgadillo,  
José Manuel F. Noqueira, Manuel A. Coimbra

**design e serviços de prépress**

Gabinete de Imagem  
Fundação João Jacinto de Magalhães

**impressão**

Graficamelas

**edição**

Universidade de Aveiro,  
Campus Universitário de Santiago  
3810-193 Aveiro

**data**

Dezembro 2007

**tiragem**

250 exemplares

**depósito legal**

268346/07

**ISBN**

978-972-789-252-5

## P.73 Determinação de sulfonamidas no mel por um método de HPLC-fluorescência

Daniela M. Correia<sup>a</sup>; Miguel Vilas-Boas<sup>a</sup>; António M. Peres<sup>a,b</sup>; Luis G. Dias<sup>a</sup>

tlf. +351-273 303 318

fax +351-273 325 405

dmatilde@ipb.pt

a CIMO

b LSRE, Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

O mel é um produto natural pelo que a sua comercialização a sua comercialização está sujeita à Legislação Europeia, que proíbe a sua comercialização na presença de quaisquer resíduos de antibióticos.

Os antibióticos são usados no tratamento de abelhas com o intuito de combater infecções associadas às doenças da *Loque Americana* e *Loque Europeia* que atacam as larvas das abelhas levando à destruição da colmeia. As sulfonamidas são, um dos grupos de antibióticos, mais usados pelos apicultores. Deste modo a implementação de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação destes resíduos afigura-se uma tarefa fundamental.

O presente trabalho teve como objectivo a validação e aplicação de um método de HPLC com detector de fluorescência para a análise de 8 sulfonamidas em amostras de mel: sulfametazina, sulfisoxazol, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina.

A separação foi efectuada numa coluna de fase reversa à temperatura de 32°C. A fase móvel usada consistiu numa solução tampão de acetato:acetonitrilo (70:30) usada em modo isocrático. O tempo da corrida foi de 35 minutos. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão usados foram 405nm e 495nm, respectivamente.

Todas as soluções foram sujeitas a uma derivatização com uma solução de fluorescamina. A linearidade do método para cada sulfonamida foi testada no intervalo de concentrações de 1-200ng/mL apresentando repetibilidade e precisão intermédia inferiores a 4,3%. Os limites de detecção e quantificação para cada uma das sulfonamidas analisadas foram da ordem dos 2-5ng/mL e 6-15ng/mL, respectivamente. A exactidão do método foi ainda aferida recorrendo à análise de soluções de controlo de qualidade tendo-se obtido, em geral, erros relativos percentuais inferiores a 5%.

Este método foi aplicado na detecção e quantificação de resíduos de antibióticos em amostras de mel, sendo os resultados comparados com os obtidos pelo método enzimático qualitativo CHARM II (método aprovado pelo US FDA para a análise de resíduos em mel).





# Determinação de sulfonamidas no mel por um método de HPLC-fluorescência

Daniela M. Correia<sup>a</sup>, Miguel Vilas-Boas<sup>a</sup>, António M. Peres<sup>a,b</sup>, Luís G. Dias<sup>a</sup>  
<sup>a</sup>CIMO, <sup>b</sup>LSRE, Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal  
\*Tel +351-273 303 318 Fax +351-273 325 405 e-mail: [dmatlida@ipb.pt](mailto:dmatlida@ipb.pt)

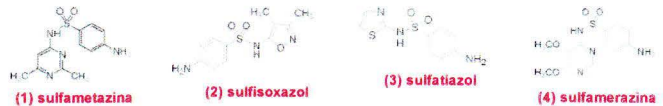
## Introdução

O mel é um produto natural e a sua comercialização está sujeita à Legislação Europeia, que proíbe a sua comercialização na presença de quaisquer resíduos de antibióticos.

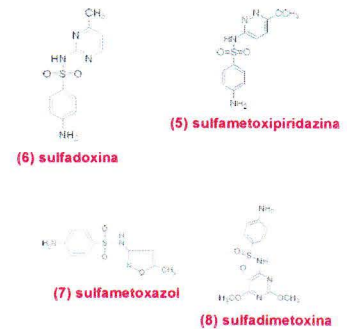
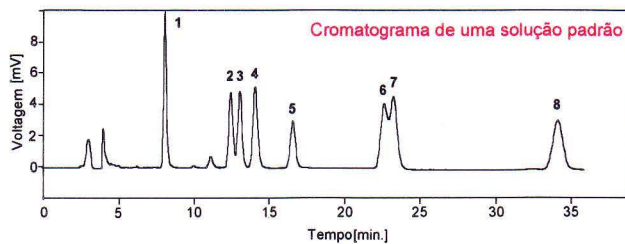
Os antibióticos são usados no tratamento de abelhas com o intuito de combater infecções associadas às doenças da Loque Americana e Loque Europeia que atacam as larvas das abelhas levando à destruição da colmeia. As sulfonamidas são um dos grupos de antibióticos mais usados pelos apicultores. Deste modo a implementação de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação destes resíduos afigura-se uma tarefa fundamental.

## Objectivo

Validação e aplicação de um método de HPLC com detector de Fluorescência para a análise de 8 sulfonamidas em amostras de mel.



**Fase móvel em modo isocrático:** tampão acetato (pH 5):acetonitrilo (70:30)  
**Fluxo da fase móvel:** 0,5 mL/min  
**Temperatura da coluna:** 32 °C  
**Coluna:** ProntoSil 120-5 C18 SH (150 x 4,6 mm)  
**Detector:** Fluorescência FP-2020 Plus, Jasco  
**Deteção:** 405 nm de excitação e 495 nm de emissão



**Linearidade:** 5 calibrações; 9 soluções padrão de diferentes concentrações (1-200 ppb).

**Repetibilidade:** 3 soluções de controlo de qualidade analisadas 7 vezes cada: [SCQ1]=3 ppb; [SCQ2]=15 ppb; [SCQ3]=25 ppb.

**Precisão intermédia:** valores médios das áreas dos antibióticos obtidos em diferentes dias de análise.

### Parâmetros da calibração

Substância	Declive	Ord Orig	R
Sulfametazina	10,4	1,66	0,9991
Sulfisoxazol	7,12	-1,18	0,9991
Sulfatiazol	7,83	-2,17	0,9991
Sulfamerazina	7,93	-0,75	0,9992
Sulfametoxipiridazina	2,88	-1,04	0,9991
Sulfadoxina	4,36	4,01	0,9992
Sulfametoxazol	6,41	-4,92	0,9989
Sulfadimetoxina	5,05	-3,01	0,9990

### Precisão intermédia

Substância	Solução padrão 1 Sr%	Solução padrão 2 Sr%
Sulfametazina	6,3	3,6
Sulfisoxazol	6,2	4,1
Sulfatiazol	3,7	3,2
Sulfamerazina	4,4	3,4
Sulfametoxipiridazina	6,2	3,8
Sulfadoxina	8,2	5,7
Sulfametoxazol	5,2	3,1
Sulfadimetoxina	2,7	4,2

### Repetibilidade

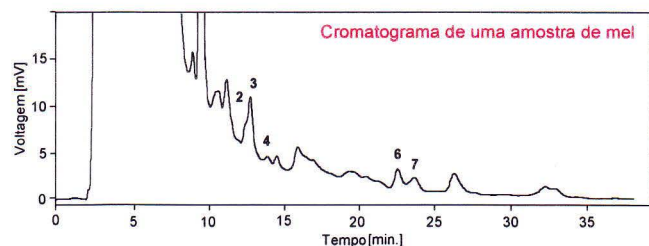
Substância	[SCQ1]=3 (ppb) Sr%	[SCQ2]=15 (ppb) Sr%	[SCQ3]=25 (ppb) Sr%
Sulfametazina	2,9	0,3	0,7
Sulfisoxazol	3,0	0,9	1,0
Sulfatiazol	3,8	0,5	0,5
Sulfamerazina	3,3	0,6	0,4
Sulfametoxipiridazina	3,0	0,4	0,7
Sulfadoxina	6,8	1,6	0,8
Sulfametoxazol	1,9	1,3	0,6
Sulfadimetoxina	2,4	0,3	0,3

### Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Substância	LD (ppb)	LQ (ppb)
Sulfametazina	1,9	6,3
Sulfisoxazol	1,9	6,6
Sulfatiazol	1,9	6,3
Sulfamerazina	1,9	6,6
Sulfametoxipiridazina	3,8	12,6
Sulfadoxina	3,7	12,3
Sulfametoxazol	4,1	13,6
Sulfadimetoxina	4,5	14,8

## Aplicação em Amostras de Mel

Extracção em fase sólida → Derivatização com tampão acetato (pH 3,4) + Solução de Fluorescamina a 0,2%



O método de análise de sulfonamidas por HPLC implementado cumpre os requisitos ao nível da repetibilidade e reprodutibilidade. O método apresenta limites de detecção inferiores aos do método CHARM II (método de referência).

## Conclusão

Agradecimentos ao Programa Nacional Apícola pelo financiamento do projecto "Rastreio Nacional de Antibióticos no mel"

