

The development and validation of a rapid method for the determination of nitrofurans in honey using high pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS)

O.V. Bayer¹, O.S. Yaremchuk², T.V. Yevtushenko¹, L.V. Shevchenko³, V.M. Mykhalska³,
Yu.V. Dobrozhan¹, Ya.V. Dovhopol¹, R.L. Varpikhovskiy²

¹State Research Institute laboratory diagnostics and veterinary-sanitary expertise, Kiev, Ukraine

²National Agrarian University of Vinnytsia, Vinnytsia, Ukraine

³National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

E-mail: kot30@meta.ua, yarem4uk@vsau.vin.ua, t_yevtuchenko@ukr.net, shevchenko_laris@ukr.net,
vitam@bigmir.net, alamerster@gmail.com, dndildvse@vetlabresearch.g, verel17@rambler.ru

Received: 15.02.2018 Accepted: 23.03.2018

Over the past decade, Ukraine has been one of the leaders in exporting honey to EU countries. The main obstacle to increasing the export of Ukrainian honey to EU countries is the discrepancy of honey safety indicators with the requirements of importing countries. This is due to the use of a significant number of drugs with antimicrobial spectrum of action in the treatment and prevention of diseases of bees, the remains of which fall into honey. In domestic honey, according to recent data, the remains of such groups of antibiotics and antimicrobial agents as chloramphenicol, nitrofurans, nitroimidazole, sulfanilamides, tetracyclines and aminoglycosides are most commonly found. The nitrofurans, which are quite stable, can be stored in honey for a long time and are not destroyed even at high temperatures. Therefore, the urgent question remains the development and introduction into practice of laboratory analysis of a sensitive and reliable method for determining the residual amounts of nitrofurans in honey. The method developed by us allows us to determine the residual amounts of metabolites of nitrofurans in honey, namely: furazolidone derivative - 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), furaltadone-3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), nitrofurase-semicarbazide (SEM) and nitrofurantoin-1-aminohydantoin (AHD). The use of drugs nitrofurans in the treatment and prevention of infectious diseases of bees involves the receipt of their metabolites in honey in the human body. The conducted studies revealed that nitrofurantoin (38% of honey samples) was used most often in beekeeping, followed by fureladone (24%), while nitrofurase and furazolidone were used equally in 19% of honey samples, respectively. The conducted studies revealed 4 metabolites of nitrofurans in natural honey, namely the metabolite furazolidone 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), nitrofurase-semicarbazide (SEM), furaltadone-3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), and nitrofurantoin - 1-aminohydantoin (AHD). The content of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) and semicarbazide (SEM) in honey exceeds the MDR by the norms of Ukraine. According to EU norms, the content of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) and 1-aminohydantoin (AHD) in honey exceeds MDR and the semicarbazide content (SEM) permissible concentration.

Key words: nitrofurans; metabolites; liquid chromatography; mass spectrometry; bee; honey

Розробка та оцінка придатності методу визначення нітрофуранів в меді за допомогою рідинної хроматографії високого тиску – тандемної мас-спектрометрії (UPLC-MS-MS)

О.В. Байєр¹, О.С. Яремчук², Т.В. Євтушенко¹, Л.В. Шевченко³, В.М. Михальська³,
Ю.В. Доброжан¹, Я.В. Довгопол¹, Р.Л. Варпіховський²

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

²Вінницький національний аграрний університет, м. Вінниця, Україна

³Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

E-mail: kot30@meta.ua, yarem4uk@vsau.vin.ua, t_yevtuchenko@ukr.net, shvchenko_laris@ukr.net,
vitam@bigmir.net, alamerster@gmail.com, dndildvse@vetlabresearch.g, verel17@rambler.ru

За останні десятиліття Україна є одним з лідерів за експортом меду до країн ЄС. Основною перешкодою на шляху збільшення експорту українського меду до країн ЄС, є невідповідність показників безпеки меду вимогам країн імпортерів. Це пов'язано з використанням значної кількості препаратів з антимікробним спектром дії при лікуванні і профілактиці хвороб бджіл, залишки яких потрапляють у мед. У вітчизняному меді за останніми даними, найчастіше виявляють залишки таких груп антибіотиків та антимікробних препаратів, як хлорамфенікол, нітрофуран, нітроімідазол, сульфаніламід, тетрацикліни та аміноглікозиди. Особливу небезпеку створюють нітрофурани, які досить стійкі, можуть тривалий час зберігатися у меді і не руйнуються навіть за високої температури. Тому актуальним питанням залишається розробка та впровадження в практику лабораторного аналізу чутливого та надійного методу визначення залишкових кількостей нітрофуранів у меді. Розроблений нами метод дозволяє визначити залишкові кількості метаболітів нітрофуранів у меді, а саме: похідне фуразолідону – 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ), фуральтадону – 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (АМОЗ), нітрофуразону – семікарбазид (SEM) та нітрофурантоїну – 1-аміногидантоїн (АНД). Використання препаратів нітрофуранового ряду при лікуванні і профілактиці інфекційних захворювань бджіл передбачає надходження їх метаболітів у складі меду в організм людини. Проведеними дослідженнями виявлено, що найчастіше в бджільництві використовується нітрофурантоїн (38 % зразків меду), на другому місці за частотою виявлення знаходиться фуральтадон (24 %), а нітрофуразон і фуразолідон використовуються в однаковій мірі – по 19 % зразків меду відповідно. Проведеними дослідженнями виявлено 4 метаболіти нітрофуранів у меді натуральному, а саме метаболіт фуразолідону – 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ), нітрофуразону – семікарбазид (SEM), фуральтадону – 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (АМОЗ) та нітрофурантоїну – 1-аміногидантоїн (АНД). Вміст 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ) та семікарбазиду (SEM) у меді перевищує МДР за нормативами України. За нормативами ЄС вміст 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ), 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (АМОЗ) та 1-аміногидантоїн (АНД) в меді перевищує МДР, а вміст семікарбазиду (SEM) не перевищував максимально допустимої концентрації.

Ключові слова: нітрофурани; метаболіти; рідинна хроматографія; мас-спектрометрія; бджоли; мед

Вступ

Ефективність виробництва меду суттєво залежить не лише від продуктивності медоносів, але й від фізіологічного стану бджолосімей. Відомо, що бджолині сім'ї, які забезпечують медову продуктивність пасік, часто заражаються інфекційними та інвазійними хвороби, що передбачає застосування їм препаратів з антимікробним спектром дії, у тому числі антибіотиків, сульфаніламідів та нітрофуранів. В Україні дозволено використовувати у бджільництві антибіотики як біостимулятори, що здатні підвищувати продуктивність бджолосімей, як профілактичні та лікувальні засоби проти інфекційних захворювань бджіл. Це певною мірою обумовлено кліматичними умовами, які пов'язані з виникненням різких перепадів температури навколишнього середовища, особливо в холодний період року, що призводить до погіршення медоносної бази, стресу та зниження резистентності бджолосімей.

В країнах Європейського Союзу з 1995 року діє заборона наявності антибіотиків у меді. Це означає, що їх не можна застосовувати навіть при лікуванні бджіл. У Сполучених Штатах Америки і Канаді у нормативно-технічних документах зазначено, що мед не повинен мати у своєму складі сторонніх речовин (в тому числі і антибіотиків), інакше він вважається фальсифікованим.

На жаль, в Україні нині є чинними стандарти національні, є ще частково чинні ДСТУ, є чинні технічні умови, але жодного технічного регламенту на харчові продукти немає (Beltiukova S. V., 2013; Department of Health, 2009). У ДСТУ на мед зазначено, що у його складі можуть бути нітрофурани, левоміцетин, а стрептоміцин та тетрациклін не дозволені (Kosenko Yu. M. et al., 2005; Med naturalnyi, 2005).

Важливим чинником формування складу меду є також медоносна база, частота і види обробки медоносних культур пестицидами, які також мігрують в ланцюгу ґрунт – вода – рослина (пилкок, нектар) – мед (Jorge Barbosa et al., 2007).

Відомо, що нітрофурани є другим після сульфаніламідів класом синтетичних антибактеріальних препаратів з широким спектром дії, які застосовуються більше ніж при 10 захворюваннях інфекційної природи бджіл. До препаратів цієї групи відносяться нітрофурал, нітрофурантоїн, ніфурател, ніфуросазид, фуразидин та фуразолідон (Levchenko V. et al., 2012; Chung-wei Tsai et al., 2010; Barbosa, J. et al., 2011; Verdon, E. et al., 2007). Вказані препарати ефективні щодо багатьох грамнегативних (*E. coli*, *K. pneumoniae* і ін.) та грампозитивних бактерій, деяких анаеробів, грибів роду *Candida*. Крім того, фуразолідон і ніфурател активні щодо деяких найпростіших (лямблії, трихомонади). Будучи акцепторами кисню, нітрофурани порушують процес клітинного дихання бактерій, інгібують біосинтез нуклеїнових кислот та, залежно від концентрації, проявляють бактеріостатичну або бактерицидну дію (Zhang et al., 2016; Shankar, B. P. et al., 2010).

Нітрофуранові препарати в молекулі містять нітрогрупу – NO₂, яка обумовлює сильну антимікробну дію (Radovniković, A. et al., 2011). Антимікробні препарати як правило згодують бджолам в складі з сиропу. Такий спосіб придатний, якщо невеликі сім'ї розміщені в однокорпусному вулику. Сім'ї у вуликах з декількома корпусами запасують сироп під годівницею, тому робочі бджоли не використовують сироп з антимікробними препаратами відразу ж для годівлі розплоду. Крім того, існує небезпека перенесення сиропу в медові корпуси, звідки він може бути відкачаний. Згодовування ліків бджолам з великою кількістю сиропу може обмежити поширення інфекційних хвороб, але не завжди забезпечує повний ефект. Крім згодовування, антибактеріальні препарати використовують у вигляді розпилення з цукровою пудрою на верхні планки рамок, що не дозволяє контролювати їх дозування бджолам.

Наступний шлях надходження антимікробних засобів у мед – це дрібнодисперсне розпилення розчинів препаратів над розплідом бджіл під час якого ветеринарні препарати потрапляють на бджіл-годувальниць, які очищаючи одна одну, заковтують сироп з лікарськими засобами.

Відомо, що мед проходить дослідження на відповідність вітчизняному стандарту, а продукція, призначена на експорт, повинна відповідати вимогам країни – імпортера.

У першу чергу ця проблема гостро стоїть перед виробниками меду, а також перед гуртовими закупівельниками продукції бджільництва. Такий продукт повинен відповідати вимогам Директив 96/22/ЄЕС та 96/23/ЄЕС, Постанови Ради (ЄС) 2377/90 (Council Directive 96/22/EC, 1996; Council Directive 96/23/EC, 1996).

При виявленні лабораторією ветеринарної медицини невідповідності продукції встановленим вимогам, публікується попередження про виявлені відхилення і невідповідність даної продукції вимогам безпеки чинним для конкретної країни чи країн ЄС. Крім того, при встановленні невідповідності якості та безпечності продукції у референсній лабораторії країни-імпортера, ці дані публікуються в загальноєвропейській системі безпеки продуктів (César Aquiles Lázaro de la Torre et al., 2015).

Всі ці заходи щодо контролю якості і безпечності продукції, у тому числі меду натурального на вміст антимікробних засобів обумовлені їх потенційною небезпекою для здоров'я людини. Попередження багатьох країн світу щодо заборони імпорту меду з залишковими кількостями антимікробних засобів призвели до посилення контролю в ньому залишків цих препаратів, що, у свою чергу, передбачає розробку надійних та чутливих методів їх контролю.

Метою роботи було модифікувати та валідувати метод, здатний визначити залишки метаболітів нітрофуранів в меді на рівні ССа 0,5 мкг/кг за допомогою РХ-МС-МС.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ). Визначення залишкових кількостей метаболітів нітрофуранів проводили методом рідинної хроматографії з використанням квадрупольного мас-спектрометра Waters XEVO та аналітичною колонкою обернено-фазною Waters C18 100x2.1 mm ID, 3,5μ.

Даний метод дозволяє визначати метаболіти нітрофуранів: фуразолідону, який метаболізується в 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ), фуральтадону, який метаболізується в 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (АМОЗ), нітрофуразону, який метаболізується в семікарбазид (SEM) та нітрофурантоїну, який метаболізується в 1-аміногидантоїн (АНД).

Принцип методу полягає в дериватизації продукту за допомогою 2-нітробензальдегіду, наступної інкубації протягом 16 годин при температурі 37°C та екстракції етилацетатом.

Для підготовки зразків та проведення аналізу використовували реактиви компанії Sigma-Aldrich (Німеччина). Матеріалом дослідження були зразки меду, додатково перевірені з використанням методу вискоефективної рідинної хроматографії і мас-спектрометрії на відсутність у них залишків нітрофуранів.

Збагачення контрольних зразків проводили стандартними розчинами для встановлення ССа, на рівнях 0,25; 0,5 та 1 мкг/кг. В роботі використовували сертифіковані субстанції: 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ), 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (АМОЗ), семікарбазид (SEM) та 1-аміногидантоїн (АНД), фірми Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, США).

Основні стандартні розчини з концентрацією 1 мг/мл вказаних нітрофуранів готувались шляхом розчинення в ацетонітрилі.

Робочі стандартні розчини кожного нітрофурану та комплексний стандартний розчин усіх чотирьох нітрофуранів готували шляхом двостадійного розведення основних стандартних розчинів: в першій стадії – ацетонітрилом (до концентрації 10 мкг/мл), а в другій (до концентрації 100 нг/мл) – 0,1 % мурашиній кислоті. Для ідентифікації нітрофуранів використовували також внутрішні стандартні зразки для кожного нітрафурану окремо АМОЗ-D5, АОЗ-D4, АНД-13C13, SEM -15N2,13C*HCL.

Кількісне визначення масової концентрації нітрофуранів проводили методом зовнішнього стандарту за здійсненим попередньо калібруванням хроматографа за градувальними розчинами. Ідентифікацію проводили за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності.

Результати досліджень та їх обговорення

Для визначення нітроароматичних сполук у складних матрицях, таких як мед натуральний, переважно використовують методи високоефективної рідинної хроматографії у поєднанні із мас-спектрометричним детектором та імуноферментний аналіз (Novozhytska et al. 2014; Guidelines for the validation....., 2010; Leitner et al, 2001; Szilagyi., 2006).

Підготовку зразка проводили за наступною схемою: до зразка меду в кількості 2 г вносили суміш стандартних розчинів та суміш внутрішніх стандартних розчинів, після струшування додавали 4 мл води, 0,8 мл 1 М розчину соляної кислоти та 150 мкл 0,1 М дериватизаційного розчину 2-нітробензальдегіду.

Після змішування дослідного зразка протягом 2 хв. на вортексі та 5 хв. на шутелі проводили інкубацію його 16 годин при температурі 37°C в термостаті. Через добу при кімнатній температурі до зразка додавали 5 мл 0,1 М розчину дикалію гідроген фосфату та доводили рівень рН до 7,5 2 М розчином гідроксиду натрію.

Для проведення екстракції додавали 5 мл етилацетату, змішували на роторі 20 хв. та центрифугували при радіальному прискоренні 4000 об/хв.. протягом 10 хв. при температурі 4°C. Після цього переносили етилацетатовий екстракт в поліпропіленову пробірку та повторювали екстракцію етилацетатом у кількості 5 мл.

Подвійний екстракт випаровували досуха під струменем азоту при температурі 40-50°C. Потім перерозчиняли сухий залишок у 200 мкл 0,1 % розчині мурашиної кислоти і додавали 500 мкл гексану для знежирення. Після змішування суміші нижню фракцію в кількості 150 мкл відбирали для дослідження після попереднього фільтрування.

Дослідження проводили на рідинному мас-спектрометрі Waters XEVO TQ-S micro (США).

Хроматографування зразків проводили в градієнтному режимі, система ацетонітрил / 0,1 % розчин мурашиної кислоти в воді, швидкість потоку 0,4 мл/хв. Іонізацію проводили в режимі позитивної іонізації по продукт-іонах (таблиця 1).

Таблиця 1. Параметри введення даних для проведення досліджень на рідинному хроматографі з подвійним мас детектором Waters XEVO TQ-S micro

Компонент	Материнський іон	Дочірні іони	Напруження на конусі	Енергія зіткнення
AOZ	236	104 134	28	12
AMAZ	335	262 291	28	12
SEM	209	166 192	25	10
AND	249	134 178	28	15
AMAZ-D5	340	296	28	10
AMAZ-D4	240	134	28	25
SEM-15N2,13C*HCL	212	168	28	15
AND -13C13	252	134	28	15

Підтверджуючий метод був валідований у відповідності до Рішення Єврокомісії 2002/657/EC. (Commission Decision, 2002). Протягом процедури валідації встановлено такі параметри: специфічність, селективність, точність, лінійність, внутрішньо-лабораторна відтворюваність, відсоток витягу, межа прийняття рішення (CC_{α}) та здатність виявлення (CC_{β}). Всі ці дані отримали при використанні програмного забезпечення InterVal Software компанії quo data GmbH (Німеччина).

CC_{α} є важливим показником для оцінювання придатності підтверджуючих методів, а CC_{β} – для скринінгових.

CC_{α} – межа рішення, вище якої можна прийти до висновку з імовірністю помилки α , що зразок є невідповідним.

CC_{β} – це найменший вміст досліджуваної речовини, який можна виявити, ідентифікувати або визначити кількісно у пробі з імовірністю похибки β .

Всі ці параметри визначали при проведенні оцінки придатності методу за зразками меду (всього 32 зразки) збагачені аналітом на рівні 0; 0,25; 0,5; 1,0 валідаційного рівня, дослідження проводили 2 дні двома операторами. Попередньо був відібраний мед різнотрав'я гомогенізований та перевірений на наявність залишків нітрофуранів, яких не було виявлено. Точність методу оцінювали за підрахунком середньостатистичного відхилення результатів, отриманих для кожної концентрації.

Витяг вираховували за концентрацією навантажених певною кількістю аналіту контрольних зразків. CC_{α} та CC_{β} визначали за калібрувальною кривою, побудованою при збагаченні різними концентраціями стандарту матриці, як описано у ISO 11843 (Capability of detection... 2003).

В результаті проведених досліджень, отриманні наступні валідаційні дані:

AMAZ (3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон)

Таблиця 2. Критичні концентрації та рівень інтересів, мкг/кг

Рівень інтересів	CC_{α}	CC_{β}
0,40	0,47	0,61

Таблиця 3. Повторюваність, внутрішня лабораторна відтворюваність та відсоток повернення

Концентрація, мкг/кг	S _r , мкг/кг	Rel. s _r ,%	S _{wR} мкг/кг	Rel. s _{wR} ,%	Відсоток повернення, %
0,250	0,041	16,6	0,041	16,6	95,6
0,375	0,040	10,7	0,040	10,7	98,4
0,500	0,040	7,9	0,040	7,9	99,8
0,750	0,039	5,2	0,058	7,7	101,2
1,000	0,039	3,9	0,082	8,2	101,9

Примітка: S_r - Repeatability standard deviation (стандартне відхилення повторюваності), Rel S_r - Коефіцієнт варіації повторюваності перерахований в %; S_{wR}- In-house reproducibility standard deviation (стандартне відхилення внутрішньо лабораторної відтворюваності); Rel S_{wR} - Коефіцієнт варіації відтворюваності перерахований в %.

АОЗ (3-аміно-2-оксазолідинон)**Таблиця 4.** Критичні концентрації СС_α та СС_β та рівень інтересу, мкг/кг

Рівень інтересів	СС _α	СС _β
0,40	0,48	0,62

Таблиця 5. Повторюваність, внутрішня лабораторна відтворюваність та відсоток повернення

Концентрація, мкг/кг	S _r , мкг/кг	Rel. s _r , %	S _{wR} , мкг/кг	Rel. s _{wR} , %	Відсоток повернення, %
0,250	0,040	16,0	0,040	16,0	105,3
0,375	0,041	10,9	0,041	10,9	103,2
0,500	0,041	8,2	0,041	8,2	102,2
0,750	0,042	5,6	0,043	5,8	101,2
1,000	0,042	4,2	0,045	4,5	100,7

SEM (семікарбазид)**Таблиця 6.** Критичні концентрації СС_α та СС_β та рівень інтересу, мкг/кг

Рівень інтересів	СС _α	СС _β
0,40	0,46	0,58

Таблиця 7. Повторюваність, внутрішня лабораторна відтворюваність та процент повернення

Концентрація, мкг/кг	S _r , мкг/кг	Rel. s _r ,%	S _{wR} мкг/кг	Rel. s _{wR} ,%	Відсоток повернення %
0,250	0,031	12,2	0,031	12,2	104,6
0,375	0,031	8,3	0,031	8,3	103,0
0,500	0,031	6,3	0,035	6,9	102,2
0,750	0,032	4,2	0,041	5,5	101,4
1,000	0,032	3,2	0,045	4,5	101,0

AHD (1-аміногидантоїн)**Таблиця 8.** Критичні концентрації СС_α та СС_β та рівень інтересу, мкг/кг

Рівень інтересів	СС _α	СС _β
0,40	0,48	0,61

Таблиця 9. Повторюваність, внутрішня лабораторна відтворюваність та процент повернення

Концентрація, мкг/кг	S _r , мкг/кг	Rel. s _r ,%	S _{wR} мкг/кг	Rel. s _{wR} ,%	Відсоток повернення, %
0,250	0,036	14,4	0,036	14,4	103,8
0,375	0,037	9,8	0,037	9,8	101,4
0,500	0,037	7,4	0,039	7,9	100,1
0,750	0,038	5,0	0,051	6,7	98,9
1,000	0,038	3,8	0,061	6,1	98,3

З отриманих даних можна зробити висновок, що всі результати одержані при підрахунку відтворюваності та повторюваності входять в допустимі межі згідно рішення ЄС 657/2002 на різних рівнях валідації від 0,25 до 1 мкг/кг.

Таблиця 10. Коефіцієнт варіації для кількісних методів, (згідно рішення ЄС 657/2002)

Масова частка	Коефіцієнт варіації (%)
< 1 мкг/кг	*
1–10 мкг/кг	32
10–100 мкг/кг	23
100–1000 мкг/кг (1 мг/кг)	16

* Для масових часток менших за 1 мкг/кг застосування Рівняння Хортвіца дає неприпустимо високі значення, тому CV для концентрацій менших 1 мкг/кг повинні бути мінімальні

Акредитовані вітчизняні лабораторії ветеринарної медицини, в основному, визначають показники безпеки необроблених харчових продуктів тваринного походження скринінговими методами. І відповідно до рішення ЄС 657/2002 (Commission Decision.... 2002), для виконання національних планів Державного моніторингу залишкових кількостей ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин у живих тваринах, продуктах тваринного походження і кормах, а також харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі, у разі отримання позитивних скринінгових результатів необхідно проводити дослідження в акредитованих лабораторіях із застосуванням підтверджуючих методів, чим і являється наш метод.

В результаті досліджень лабораторії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) за 2015-2017 роки було проаналізовано 1169 зразків меду натурального різного походження на вміст метаболітів нітрофуранів. При цьому встановлено, що зі 146 зразків, меду, які надійшли в лабораторію для аналізу у 2015 році, лише 1,4 % містили залишки нітрофуранів у концентрації, що не перевищувала МДР.

У 2016 році з 581 зразка меду, залишки нітрофуранів було виявлено у 3,4 % проб, тоді як у 2017 році з 442 зразків меду всі виявилися негативними щодо вмісту нітрофуранів.

Це вказує на припинення їх використання для лікування та профілактики інфекційних захворювань бджіл.

Детальний аналіз одержаних даних свідчить, що застосування бджолам нітрофуразону спричиняє накопичення його метаболіту – семікарбазиду (SEM) в меді (рис. 1) в концентраціях від 0,79 до 1,06 мкг/кг.

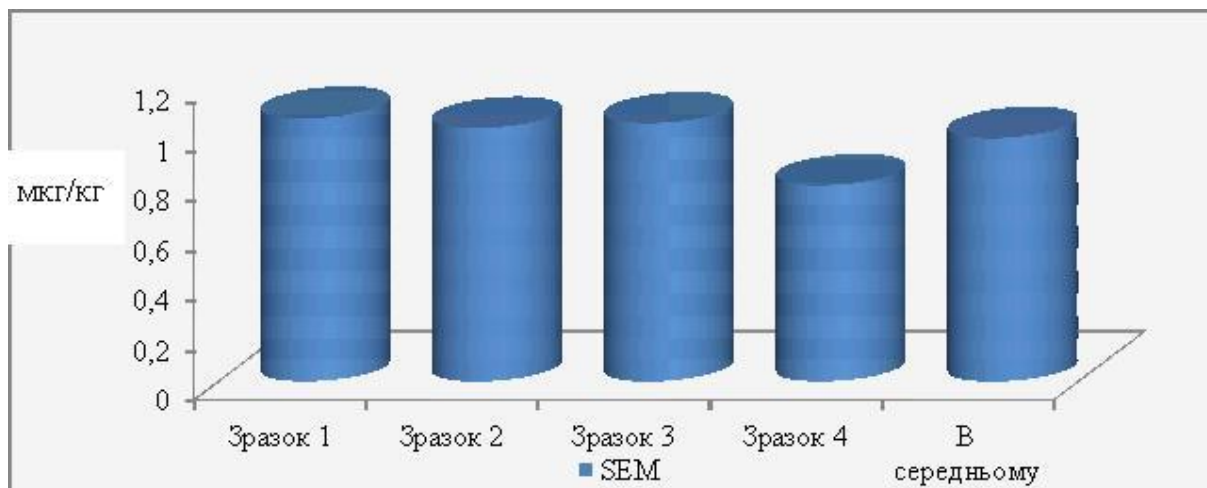


Рисунок 1. Залишковий вміст семікарбазиду (SEM) у меді натуральному.

Враховуючи, що на вміст нітрофуразону та його метаболітів у меді у чинних нормативних документах України обмеження не поширюється, його, часто застосовують у господарствах при інфекційних захворюваннях бджіл, особливо при аскоферозі методом дрібнодисперсного розпилення над розплодом. Потрапляння його в організм робочих бджіл сприяє включенню у метаболічні процеси з наступним перетворенням в семікарбазид та виділенням з організму у мед, де він може тривалий час зберігатися.

Крім нітрофуразону, при цьому ж захворюванні бджіл може використовуватися і фуразолідон, як діюча речовина препарату ноземацид, який застосовується при нозематозі бджіл. Причому інструкція з застосування цього препарату передбачає використання меду, одержаного після обробки бджіл на загальних підставах. Останній в організмі бджіл трансформується у 3-аміно-2-оксазолідинон (АОЗ) і також потрапляє у мед (рис. 2).

Як показали результати досліджень, залишковий вміст 3-аміно-2-оксазолідинону (АОЗ) у всіх зразках меду, який надійшов для аналізу, перевищував МДР більш, ніж у 2 рази за винятком зразка № 1. Це вказує на застосування цього нітрофурану бджолам, ймовірно, не лише з лікувальною, але й профілактичною метою.

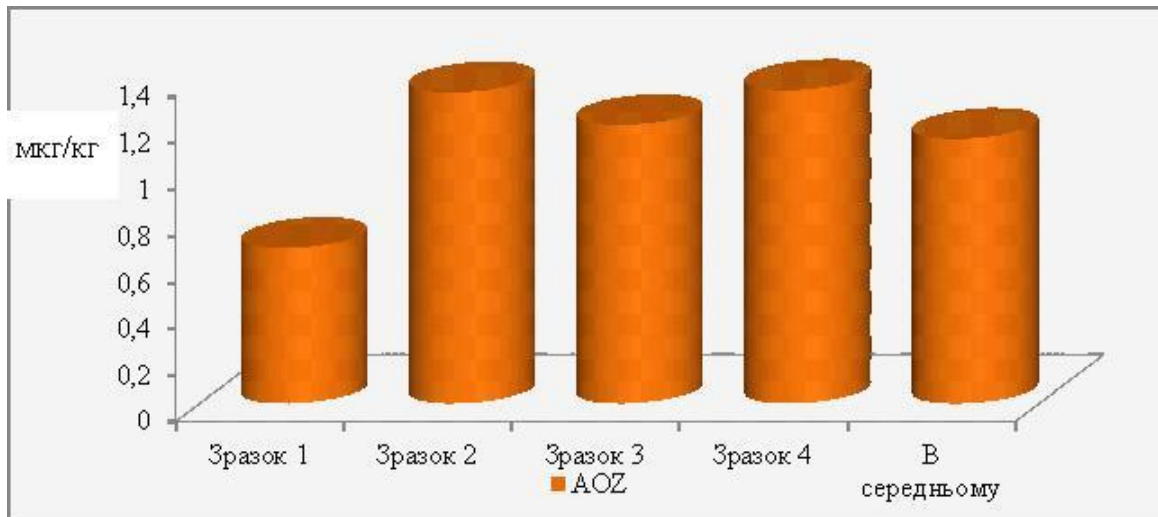


Рисунок 2. Залишковий вміст 3-аміно-2-оксазолідину (АОЗ) у меді натуральному.

Використання фуралядадону при лікуванні та профілактиці інфекційних захворюваннях бджіл сприяє накопиченню його метаболіту 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідину (АМОЗ) у меді, причому в концентраціях які в усіх випадках (рис. 3), хоча й незначною мірою, але перевищували МДР (0,6 мг/кг), що передбачає заборону на використання цих партій меду в якості харчового продукту.

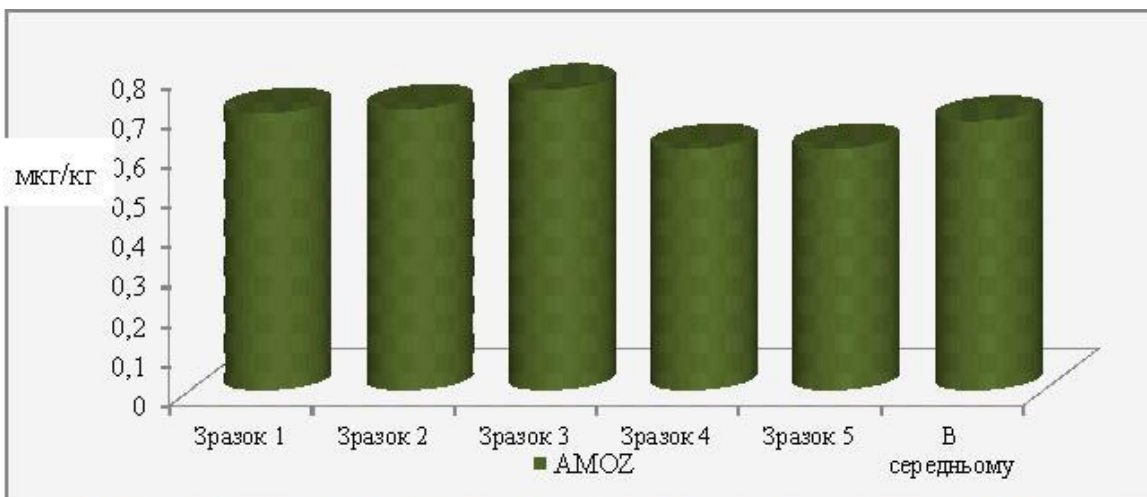


Рисунок 3. Залишковий вміст 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідину (АМОЗ) у меді натуральному

Як видно з одержаних даних, найбільш поширеним препаратом з групи нітрофуранів у бджільництві виявився нітрофурантоїн. Про це свідчить залишковий вміст 1-аміногідантоїну (АГД) у зразках меду. При цьому слід відмітити, що нітрофурантоїн, ймовірно, використовувався як у різних концентраціях, так і з різною тривалістю обробок, оскільки залишковий вміст його метаболіту – 1-аміногідантоїну (АГД) у меді коливався від 1,09 до 4,3 мг/кг (рис. 4).

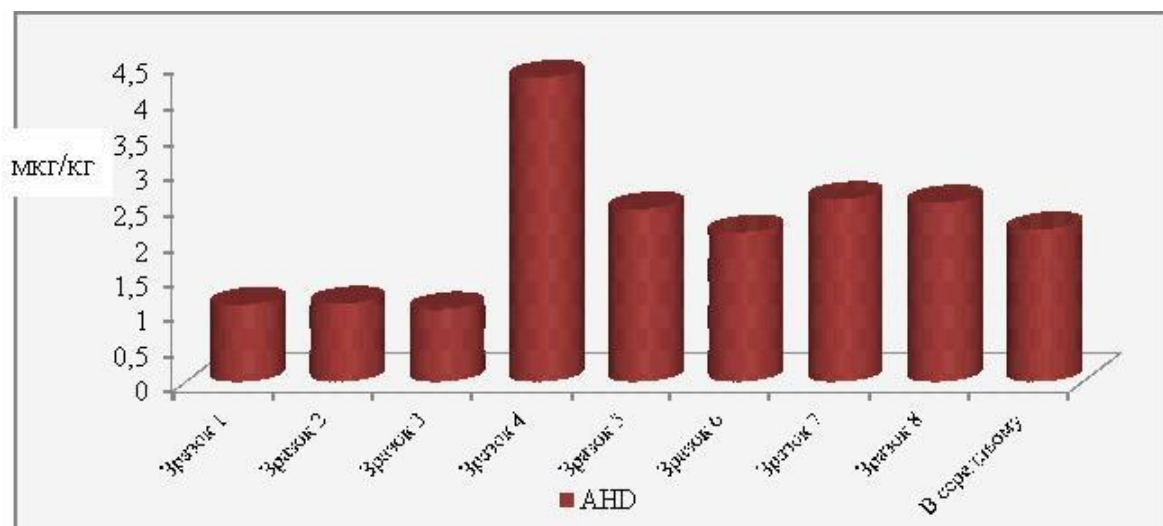


Рисунок 4. Залишковий вміст 1-аміногідантоїну (АГД) у меді натуральному

Поширена практика використання цього препарату при лікуванні та профілактиці захворювань бджіл пов'язана, ймовірно, з відсутністю обмеження його вмісту в чинних нормативних документах України на мед натуральний. Аналіз частоти виявлення в меді бджололиному залишкових кількостей метаболітів нітрофуранів показав, що найчастіше при лікуванні і профілактиці захворювань бджіл інфекційної природи використовується нітрофурантоїн, на другому місці за частотою виявлення знаходиться фуральтадон, а нітрофуразон і фуразолідон використовуються в однаковій мірі (рис. 5).



Рисунок 5 Співвідношення нітрофуранів, виявлених у меді натуральному

Таким чином, можна зробити висновок, що при вживанні меду в організм людини може надходити певна кількість залишків метаболітів нітрофуранового ряду, які можуть проявляти свою дію і в організмі людини. Незважаючи на те, що нітрофурани малотоксичні, але будучи окислювачами встановлено, що у новонароджених і грудних дітей можуть викликати гемолітичну анемію та метгемоглобінемію. Іноді нітрофурани викликають порушення функції органів дихання (задишка, сухий кашель, озноб, раптове підвищення температури), легеневий фіброз. Фуразолідон пригнічує моноаміноксидазу (MAO), тому його одночасне надходження в організм з речовинами, які цей фермент інактивують (адреналін, норадреналін, дофамін, мезатон і ін.), а також з іншими препаратами, які інгібують MAO (нуредаль), і трициклічними антидепресантами несумісне. В іншому випадку може виникнути різке звуження судин, гіпертонічний криз, викликані ендогенними катехоламінами і їх попередниками, що всмокталися в шлунково-кишковому тракті.

Висновки

Проведено оцінювання придатності методу та встановлено параметри МС/МС детектування і визначено валідаційні характеристики. Даний метод є точним, практичним та універсальним, що підтверджується отриманими даними ССа для AOZ – 0,48 мкг/кг; AMOZ – 0,47 мкг/кг; SEM – 0,46 мкг/кг; AHD – 0,48 мкг/кг; відсоток повернення складає 99,8 – 101,4 %. Ці результати задовольняють вимоги Європейських директив, у яких нітрофурани регламентуються на рівні 1 мкг/кг. Розроблений нами метод та впроваджений в роботу лабораторії здатний виявляти залишкові кількості нітрофуранів на рівні 0,5 мкг/кг, що підтверджує його чутливість, точність методу додатково забезпечується використанням внутрішніх дейтерованих стандартів (AMOZ-D5, AOZ-D4, SEM-15N2,13C*HCL, AND-13C13). Універсальність та практичність методу ґрунтується на одночасному виявленні метаболітів нітрофуранів в меді. На основі експериментальних даних встановлено, що методика визначення метаболітів нітрофуранів методом РХ/МС/МС є придатною для дослідження меду і може успішно використовуватися лабораторіями ветеринарної медицини.

Проведеними дослідженнями виявлено 4 метаболіти нітрофуранів у меді натуральному, а саме метаболіт фуразолідону – 3-аміно-2-оксазолідинон (AOZ), нітрофуразону – семікарбазид (SEM), фуральтадону – 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (AMOZ) та нітрофурантоїну – 1-аміногидантоїн (AHD).

Вміст 3-аміно-2-оксазолідинон (AOZ) та семікарбазиду (SEM) у меді перевищує МДР за нормативами України. За нормативами ЄС вміст 3-аміно-2-оксазолідинон (AOZ), 3-аміно-5-морфолінометил-2-оксазолідинон (AMOZ) та 1-аміногидантоїн (AHD) в меді перевищує МДР, а вміст семікарбазиду (SEM) не перевищував максимально допустимої концентрації.

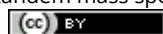
References

- Barbosa, J., Freitas, A., Moura, S., Mourão, J. L., Noronha da Silveira, M.I., Ramos, F. (2011). Detection, accumulation, distribution, and depletion of furaltadone and nifursol residues in poultry muscle, liver, and gizzard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 22, 11927–11934.
- Beltiukova, S.V., Leventsova E.O. (2013). *Metody opredeleniya antybyotykov v pyshchevykh produktakh (Obzor). Metody y obekty khymycheskoho analiza*, 1, 4–13 (in Russian).
- Commission Decision 2002/657/EC, 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Europ. Comm.*, No. L 221/8.

- Concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of β -agonists: Council Directive 96/22/EC. Off. J. Eur. Comm., 1996. L. 125. 3–9.
- CRLs (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer). Community Reference Laboratories 20/1/2010
- Chung-wie, Tsai, Chuan-ho, Tang, Wei-hsien, Wang (2010). Quantitative determination of four nitrofurans and corresponding metabolites in the fish muscle by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(2), 98–106.
- Department of Health (2009). Method of test for veterinary drug residues in foods-test of nitrofurans metabolites. Announcement No. 0981800137.
- ISO 11843 Capability of detection. Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case, 2003.
- Jorge Barbosa, Sara Moura, Rita Barbosa, Fernando Ramos, Maria Irene Noronha da Silveira (2007). Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 586, 359–365
- Kosenko, Yu. M., Stetsko, T. I., Sviatotska, L. O., Khomiak, O. I., Uhryn, H. P. (2005). Ekspres-metody vyznachennia zalyshkiv antybiotykyv u produktakh tvarynnystva. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu biolohii tvaryn i DNDKI vetpreparativ ta kormovykh dobavok*, 6, 173–179 (in Ukrainian).
- Leitner, A., Zollner, P., Lindner, W. (2001). Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 939, 49–58.
- Levchenko, V.I., Rozumniuk, A.V., Novozhytska, Yu.M. (2012). Laboratorna veterynarna toksykolohiia. Bila Tserkva: Bilotserkivska knyzhkova fabryka (in Ukrainian).
- Med naturalnyi. Tekhnichni umovy DSTU 4497–2005 (in Ukrainian).
- Novozhytska, Yu.M., Ivanova, O.V., Stupak, O.M., Vasyliuk, V.V., Liniichuk, N.V., Korostinska, N.V. (2014). Vyznachennia antybiotykyv u produktii tvarynno hopokhodzhennia za dopomohoiu ridynnoho khromatomas-spektrometra: metod. vkazyvky. Kiev. PP Salon soft (in Ukrainian).
- On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products: Council Directive 96/23/EC. Off. J. Eur. Comm., 1996. L. 125. 10–32.
- Radovnikovic, A., Moloney, M., Byrne, P., Danaher, M. (2011). Detection of banned nitrofurans metabolites in animal plasma samples using UHPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 879, 2, 159–166.
- Shankar, B. P., Manjunatha Prabhu, B. H., Chandan, S., Ranjith, D, Shivakumar, V. (2010). Rapid methods for detection of veterinary drug residues in meat. *Veterinary World*, 3(5), 241–246.
- Szilagyi, S., Calle, B. (2006). Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 572: 113–120.
- Torre, C.A.L., Blanco, J.E., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F., Conte Júnior, C.A. (2015). Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Arquivos do Instituto Biológico. Arq. Inst. Biol.*, 82, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000532013>
- Verdon, E., Couedor, P., Sanders, P. (2007). Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Analytica Chimica Acta*, 586, 1–2, 336–347.
- Zhang, Y, Qiao, H, Chen, C., Wang, Z., Xia, X. (2016). Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 1(192), 612–627. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.035.

Citation:

Bayer, O.V., Yaremchuk, O.S., Yevtushenko, T.V., Shevchenko, L.V., Mykhalska, V.M., Dobrozhan, Yu.V., Dovhopol, Ya.V., Varpikhovskiy, R.L. (2018). The development and validation of a rapid method for the determination of nitrofurans in honey using high pressure liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS). *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 966–974.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License