

ANALIZA REZIDUA METABOLITA NITROFURANA U ŽIVOTINJSKOJ PLAZMI PRIMENOM ULTRA-VISOKOPRITISNE TEČNE HROMATOGRFIJE SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM-PODRŠKA DOMAĆOJ MESNOJ INDUSTRIJI

Anita J. Radovniković¹, Martin Danaher¹, Marijana M. Ačanski², Ljiljana S. Petrović², Branislav V. Šojić²

¹Teagasc Food Research Centre Ashtown, Dublin, Irska

²Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

(STRUČNI RAD)

UDK 637.5:547.72+547.232:543.2/9

Pošto je primena nitrofurana zabranjena pri uzgoju životinja za klanje u Evropskoj Uniji (EU), ova jedinjenja se nalaze u Aneksu IV regulative 2377/90. Ne postoji prihvaćen limit za njihovo prisustvo u mesu, ili proizvodima životinjskog porekla. Zvanični markeri za kontaminaciju nitrofuranimi iz krvne plazme su: 3-amino-2-oksazolidinon - **AOZ**, 3-amino-5-morfolinometil-2oksazolidinon - **AMOZ**, 1-aminohidantoin - **AHD** i semikarbazid - **SEM**. Ranije izvedena validacija metode primenom UHPLC-MS/MS (ultra-visoko pritiska tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom) (*in house*) za određivanje metabolita nitrofurana, primenjena je na uzorcima krvi životinja za klanje iz Vojvodine. Uzorci (5 uzoraka svinje i 5 uzoraka goveda) su pripremljeni u Laboratoriji za analizu mesa, Tehnološkog fakulteta (Novi Sad, Srbija) i poslani u Teagasc Food research centre (Republika Irska), gde su analizirani.

Validacija je izvedena u opsegu od 0.2 do 5 µg kg⁻¹ primenom fortifikovane plazme životinja. CCα i CCβ vrednosti su određene po zahtevima EU. Rezultati pokazuju da su svi uzorci bili negativni na prisustvo AHD, AOZ i AMOZ. U 3 uzorka plazme svinja detektovano je prisustvo SEM.

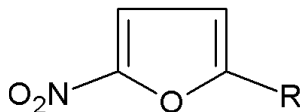
Ovaj rad unapređuje potencijal za izvoz domaćih životinja u EU, putem demonstracije kapaciteta za prepoznavanje i kvantifikaciju rezidua zabranjenih antibiotika u krvi u skladu sa EU legislativom.

Pružena je podrška razvoju domaće industrije i potencijalnom izvozu proizvoda od mesa uz savremeni monitoring.

Ključne reči: nitrofurani, UHPLC-MS/MS, rezidue, krvna plazma, metaboliti

Uvod

Pod opštim pojmom nitrofurani (NF) podrazumevaju se sintetički antibiotici širokog spektra delovanja koji sadrže nitro grupu u položaju C₅ furanskog prstena i različite supstituente (R) u položaju C₂ (Slika 1.) [1].



Slika 1. Opšta formula nitrofurana

Figure 1. The general formula of nitrofurans

Antibakterijsko delovanje obuhvata tretman infekcija uzrokovanih gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* i nekoliko sojeva *Corynebacterium*) i gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* i

Klebsiella). Osim toga deluje i na neke protozoe (*Giardia*, *Histomonas meleagridis*, *Isospora belli*, *Ballantidium coli*, *Entamoeba histolytica*). Najčešće je mehanizam delovanja bakteriostatski, ali pri višim dozama deluju baktericidno [2].

U sklopu istraživačkog programa koji je vodila tada poznata Eaton Laboratories (USA) sa novosintetisanim nitrofuranimi, Stillman i Dodd su 1944. godine, nakon ispitivanja 42 derivata furana, potvrdili snažno antibakterijsko delovanje nitrofurazona (NFZ) (Slika 2) [1,3,4]. Metabolizam nitrofurana je od samog početka njegove primene bio nepotpuno razjašnjen. 60-tih godina dvadesetog veka bilo je poznato da se polazna jedinjenja relativno brzo razgrađuju, kao i da se jedan deo nitrofurana zadržava u telu tretiranih životinja, ali je vladalo mišljenje da je ostatak metabolički razgrađen na neškodljive proizvode, koji su potom ugrađeni u mišićnu masu [1].

Istraživanja sa životinjama tretiranim nitrofurani-

*Rad saopšten na X Simpozijumu „Savremene tehnologije i privredni razvoj“ sa međunarodnim učešćem, Leskovac, 22. i 23. oktobar 2013. godine

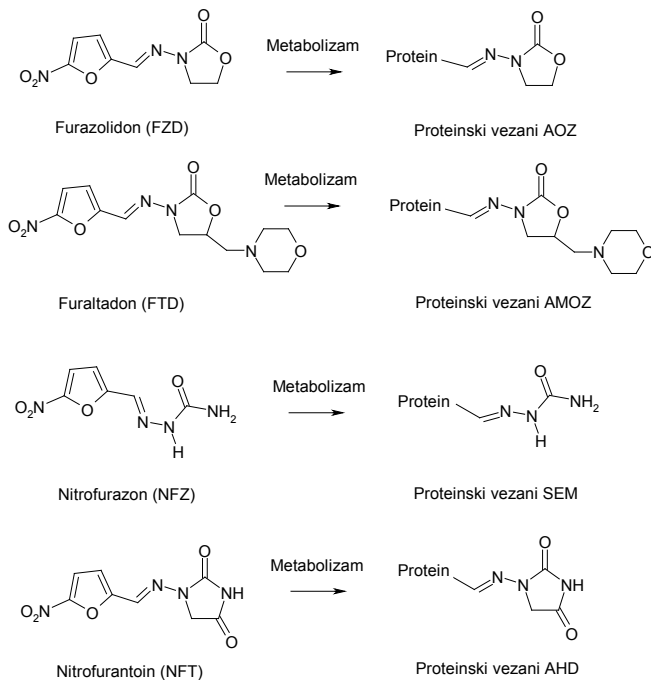
** **Adresa autora:** Marijana Ačanski, Tehnološki fakultet, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

E-mail: macanski@tf.uns.ac.rs

Rukopis primljen: 06. juna 2013. godine

Rad prihvaćen: 05. septembra 2013. godine

ma pokazala su da ova jedinjenja veoma brzo nakon primene podležu metaboličkoj razgradnji i da nastaju metaboliti koji se vezuju za proteine u mišićnoj masi [5,6]. Iako metabolizam nitrofurana nije dobro dokumentovan, pretpostavlja se da dolazi prvo do raskidanja veze između supstituenta u položaju 2 (R, Slika 1.) i nitrofuranskog prstena, a bočni ostatak se zatim kovalentno vezuje za proteine iz okolnih tkiva (Slika 2.) [7].



Slika 2. Proteinsko vezivanje metabolita nitrofurana
Figure 2. Protein binding of metabolites of nitrofurans

Savremena farmakokinetička ispitivanja jasno su ukazala na veoma kratko vreme poluraspada polaznog jedinjenja (8 do 63 minuta) u krvi i organima [5]. Nasuprot tome, nastali metaboliti 3-amino-2-oksazolidinon-**AOZ**, 3-amino-5-morfolinometil-2-oksazolidinon-**AMOZ**, 1-aminohidantoin-**AHD** i semikarbazid hidrohlorid-**SEM** (Slika 2.), koji se vezuju za proteine u tkivima, ostaju u telu mesecima nakon primene antibiotika na bazi nitrofurana. Stoga su ovi metaboliti postali zvanični rezidualni markeri za prepoznavanje upotrebe nitrofurana [8-11]. *In vivo*, metaboliti NF mogu biti oslobođeni iz kontaminiranog mesa pod dejstvom kiseline u želucu konzumenta [12].

Zbog sumnje da mogu ispoljiti kancerogeno i mutageno delovanje na čoveka, zabranjena je upotreba nitrofurana u veterini, za tretman životinja namenjenih ljudskoj ishrani [4,13]. Usvajanjem zahteva 2377/90/EEC o utvrđivanju maksimalno dozvoljenih koncentracija za rezidue farmakološki aktivnih jedinjenja u hrani, nitrofurani su svrstani na listu Aneksa IV istog dokumenta [14]. Prvi su se na listi Aneksa IV našli furaltadon, nitrofurazon i nitrofurantoin 1993. godine, a poslednji je na listu priključen furazolidon 1995. godine [15].

Osim u zemljama Evropske Unije, trenutno je primena nitrofurana na farmama za odgoj životinja namenjenih ishra-

ni, takođe zabranjena u Australiji, Sjedinjenim Američkim Državama, Filipinima, Tajlandu, Brazilu i dr. [16].

Implementacija sve strožije regulative postavila je nove izazove analitičkim laboratorijama, što je uslovalo razvoj visoko osetljivih i specifičnih metoda za detekciju ova četiri markera [17-19].

Ekperimentalni deo

Standardi

Metaboliti nitrofurana:

1-aminohidantoin (AHD), $C_3H_5N_3O_2$, $M=115,09$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka)

3-amino-2-oksazolidinon (AOZ), $C_3H_6N_2O_2$, $M=102,09$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka)

3-amino-5-morfolin-4-ilmetil-2oksazolidin-2-on (AMOZ), $C_8H_{15}N_3O_3$, $M=201,22$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka)

Semikarbazid (SEM) hidrohlorid, CH_5N_3OxHCl , $M=111,59$ g/mol, čistoće 99.5 % (Sigma Aldrich)

Interni standardi

1-aminohidantoin- $^{13}C_3$ (AHD- $^{13}C_3$), $^{13}C_3H_5N_3O_2$, $M=118,06$ g/mol, čistoće iznad 99 % i obogaćenosti više od 98 % atomima ^{13}C (Witega, Berlin, Nemačka).

3-amino-2-oksazolidinon- D_4 (AOZ- D_4), $C_3H_2D_4N_2O_6$, $M=106,12$ g/mol, čistoće iznad 99 % i obogaćenosti više od 98 % atomima D (Witega, Berlin, Nemačka).

3-amino-5-morfolinometil-2oksazolidinon- D_5 (AMOZ- D_5), $C_8H_{10}D_5N_3O_3$, $M=206,22$ g/mol, čistoće iznad 99 % i obogaćenosti više od 99 % atomima D (Witega, Berlin, Nemačka).

Semikarbazid hidrohlorid-[1,2- $^{15}N_2,^{13}C$], $^{13}CH_6CIN_{15}N_2O$, $M=114,51$ g/mol, čistoće iznad 99 % i obogaćenosti više od 98 % atomima ^{15}N i više od 99 % atomima ^{13}C (Witega, Berlin, Nemačka).

Derivatizovani metaboliti nitrofurana:

1-[(2-nitro-benziliden)-amino]-imidazolidin-2,4-dion (NPAHD), $C_{10}H_8N_4O_4$, $M=248,2$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka).

3-[(2-nitro-benziliden)-amino]-oksazolidin-2-on (NPAOZ), $C_{10}H_9N_3O_4$, $M=235,2$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka).

5-morfolin-4-ilmetil-3-[(2-nitro-benziliden)-amino]-oksazolidin-2-on (NPAMOZ), $C_{15}H_{18}N_4O_5$, $M=334,33$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka).

2-nitro-benzaldehidsemikarbazon (NPSEM), $C_8H_8N_4O_3$, $M=208,18$ g/mol, čistoće >99 % (Witega, Berlin, Nemačka). Ovi derivati će se zbog jednostavnosti u radu pominjati kao NP derivati (od *nitro-phenyl*).

Radni standardi (50 μ g/dm³)

Radni standardi su pripremljeni u metanolu razblaživanjem intermedijernih rastvora koji sadrže sva četiri metabolita, tako da se dobije koncentracija od 50 μ g/dm³. Ovi standardi su pripremani dnevno.

Materijal i reagensi

2-Nitrobenzaldehyd (2-NBA), amonijum-acetat (ms čistoće) i 99.5 % deuterisani metanol (CH_3OD) su na-

bavljeni iz Sigma Aldrich. Ultra prečišćena voda (18.2 MQ) je dobijena korišćenjem sistema za prečišćavanje vode Mili-Q Plus. Metanol i etil-acetat (HPLC čistoće) su nabavljeni iz BDH Chemicals Ltd, Pool (Velika Britanija). Rastvor hlorovodonične kiseline (0.1 mol/dm^3) je pripremljen rastvaranjem 8.6 cm^3 cc HCl u 1 dm^3 vode. Rastvor natrijum-hidroksida (1 mol/dm^3) je pripremljen rastvaranjem 40 g granuliranog natrijum-hidroksida (analar čistoće, BDH) u 1 dm^3 vode. Trinatrijum fosfat (0.3 mol/dm^3) je pripremljen rastvaranjem 11.4 g Na_3PO_4 u $0,1 \text{ dm}^3$ vode. Za merenje pH korišćene su Sigma Aldrich pH trakice od 4.5-10.0 pH. Za fortifikaciju i volumetrijsko odmeravanje pripremljenih standarda korišćene su automatske pipete Finnpiptette (Thermoscientific) zapremine od $1 \mu\text{l}$ do 1 cm^3 , a za rastvorenje su korišćeni dispenceri Dispensette® III (Brand GMBH+Co KG; Wertheim, Nemacka). Centrifugiranje je izvedeno na Mistral 3000i (MSE, London, Velika Britanija). Za snažno mešanje većeg broja uzoraka korišćen je vortex TopMix multi-vortex (Fisher Scientific, Dablin, Irska). Za filtriranje su korišćeni 13 mm filtri, sa veličinom pora $0.20 \mu\text{m}$ i $0.45 \mu\text{m}$ nabavljeni od Fisher Scientific (Dablin, Irska).

Za odmeravanje čistih standarda korišćena je Sartorius Vaga ME 36S. Za odmeravanje uzoraka plazme i ostalih reagenasa korišćena je vaga sa osetljivošću $\pm 0.0005 \text{ g}$.

Uzorci plazme iz Republike Srbije

Uzorci krvi uzeti su od 5 svinja i 5 goveda u heparisane epruvete u klanici jednog odgajivača u Vojvodini, od nasumično izabranih životinja pre klanja. Uzorci su preneti u ručnom frižideru ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$) u akreditovanu Laboratoriju za meso i proizvode od mesa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Po primanju u laboratoriju uzorci su centrifugirani ($2030 \times \text{g}$, 20 min) i plazma je odvojena u staklene epruvete koje su skladištene na temperaturi od $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, pre nego što su poslate avionskom poštom u Akreditovanu laboratoriju za hemijsku analizu rezidua, Teagasc Food Research Institute, Ashtown (Republika Irska). Uzorci su tada zavedeni pod rednim brojem G12/11/1-10 i skladišteni na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize.

Priprema uzoraka

Plazma ($1 \pm 0.020 \text{ g}$) je odmerena u 50 cm^3 plastičnu epruvetu i fortifikovana sa $40 \mu\text{l}$ radnog internog standarda ($50 \mu\text{g/dm}^3$). Uzorak je ostavljen da stoji oko 15 min., kako bi se standard bolje rasporedio u masi matriksa. Dodata je 0.1 mol/dm^3 hlorovodonična kiselina (9 cm^3) i 100 mmol 2-nitrobenzaldehida u metanolu ($100 \mu\text{l}$). Uzorci su promešani na vortexu (1 min) i inkubirani na vodenom kupatilu ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) u toku 16h, uz lagano mešanje.

Posle hlađenja na sobnu temperaturu, uzorci su neutralizovani dodatkom 0.3 mol/dm^3 tri-natrijum-fosfata (1 cm^3) i 1 mol/dm^3 natrijum-hidroksida ($385 \mu\text{l}$). pH je izmeren indikatorskim test trakama, i korigovan po potrebi, da bude u opsegu od pH 6.5-7.5. Ekstrakcija je izvedena etil-acetatom (18 cm^3) mešanjem na mehaničkoj mešalici (20 min). Uzorci su nakon toga centrifugirani ($2030 \times \text{g}$, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) i ekstrakt je prenet u staklene epruvete. Ekstrakcija je ponovljena sa etil-acetatom (9 cm^3) na isti način

i ekstrakti su spojeni. Etil-acetat je uparen pod azotom na temperaturi ne većoj od $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Suvi ekstrakt je rekonstituisan u $500 \mu\text{l}$ rastvora za injektovanje (0.5 mmol amonijum-acetat i metanol; 80:20, v/v), uz snažno mešanje na vortexu (1 min).

Ekstrakt je filtriran kroz 0.45 i $0.2 \mu\text{m}$ filter u $200 \mu\text{l}$ vijale. Dvostruka filtracija je bila potrebna iz praktičnog razloga, jer se pore $0.2 \mu\text{m}$ filtera često blokiraju kada se filtrira direktno sirovi ekstrakt. Na ovaj način je sprečen gubitak uzorka usled prskanja filtera. Redovno filtriranje uzoraka kroz $0.2 \mu\text{m}$ filter je preporučeno, kako bi se očuvao visokopritisni UHPLC sistem i sprečilo uvođenje čestica koje mogu formirati naslage i tako uzrokovati poremećaj rada instrumenta.

Instrumentalna analiza

UHPLC hromatografija

Hromatografsko razdvajanje je izvedeno na instrumentu Waters Acquity UHPLC sistemu (Milford, MA, USA). Korišćena je analitička kolona Acquity UHPLC® BEH C_{18} ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$ veličina čestice) sa Vanguard pred kolonom C_{18} ($5 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$) na temperaturi od $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Ova temperatura je često primenjena na različitim metodama u laboratoriji, jer je utvrđeno da se na ovaj način sprečava taloženje biološkog materijala iz pripremljenih ekstrakata na kolonu i time produžava njeno trajanje. Pretpostavlja se da nepolarni materijal ima tendenciju da se nakon duže upotrebe vezuje za punjenje kolone, a ovaj proces se usporava radom na višoj temperaturi.

Hromatografski uslovi su prikazani u Tabeli 1. Primenjen je gradijent sa konstantnim protokom od $0.5 \text{ cm}^3/\text{min}$. Mobilna faza A je vodeni rastvor amonijum-acetata (0.5 mmol), a mobilna faza B je metanol (MeOH). Ukupno vreme analize je 9 minuta.

Tabela 1. Primenjeni gradijent za razdvajanje NP derivatizovanih metabolita

Table 1 The applied gradient for separation of derivatives NP metabolites

Vreme (min)	Mobilna faza B
0 do 0.6	10%
2.0	50%
2.0-3.0	50%
3.5	80%
3.5-5.5	80%
6.0	10%
6.0-9.0	10%

Da bi se sprečila kros-kontaminacija, igla autosampler-a je sekvencijalno ispirana jakim rastvorom za pranje, koji se sastojao od vode i metanola (0.5 cm^3 , 10:90, v/v) i slabim rastvorom za pranje (1 cm^3 , 90:10, v/v). Pravilan izbor ovih rastvora je potreban, da bi se izbegla kontaminacija između injektiranja dva uzorka. Osim toga, oni moraju biti kompatibilni sa primenjenim mobilnim fazama, jer u protivnom mogu da poremete pravilan oblik hromatografskog pika. Zapremina uzorka je bila $20 \mu\text{l}$. Pripremljeni uzorci

su održavani na temperaturi od 5 °C u modulu za automatsko injektovanje.

MS-MS spektrometrija

Detekcija NP derivatizovanih metabolita je izvedena masenom spektrometrijom na instrumentu Waters Quattro Premier XE, sa trostrukim kvadrupolom i elektrosprej jonizacijom na atmosferskom pritisku (API) (Milford, MA, USA). Korišćena je detekcija u pozitivnom modu.

Azot je korišćen za nebulizaciju i desolvaciju (1100 dm³/h). Protok u konu iznosio je 200 dm³/h). Temperatura detektora iznosila je 140 °C. Temperatura desolvacije je bila 400 °C. Napon kapilare je iznosio 3.0 kV. Argon je korišćen kao kolizioni gas.

MS uslovi su optimizovani preciznim izborom analit specifičnih parametara kao što su napon kona, koliziona energija i potencijal izlaza iz koliziona ćelije. Ovaj proces je izveden infuzijom 1 µg/cm³ pojedinačnih standardnih rastvora NP derivata metabolita nitrofurana i internih standarda u metanolu. Dobijeni odgovor za roditeljski jon i njegova dva fragmenta su optimizovani tako, da se dobije najjači signal [18]. Prozor selektivnog monitoringa je podeljen u vremenske sektore, a *dwel time* i vreme između dva skena, kao i interkanalno kašnjenje su podešeni tako da se dobije maksimalna osetljivost instrumenta. UHPLC i MS/MS sistemi su integrisani pomoću Mass Lynx™ softvera, a obrada podataka je izvedena u programu TargetLynx™ (Waters Ltd).

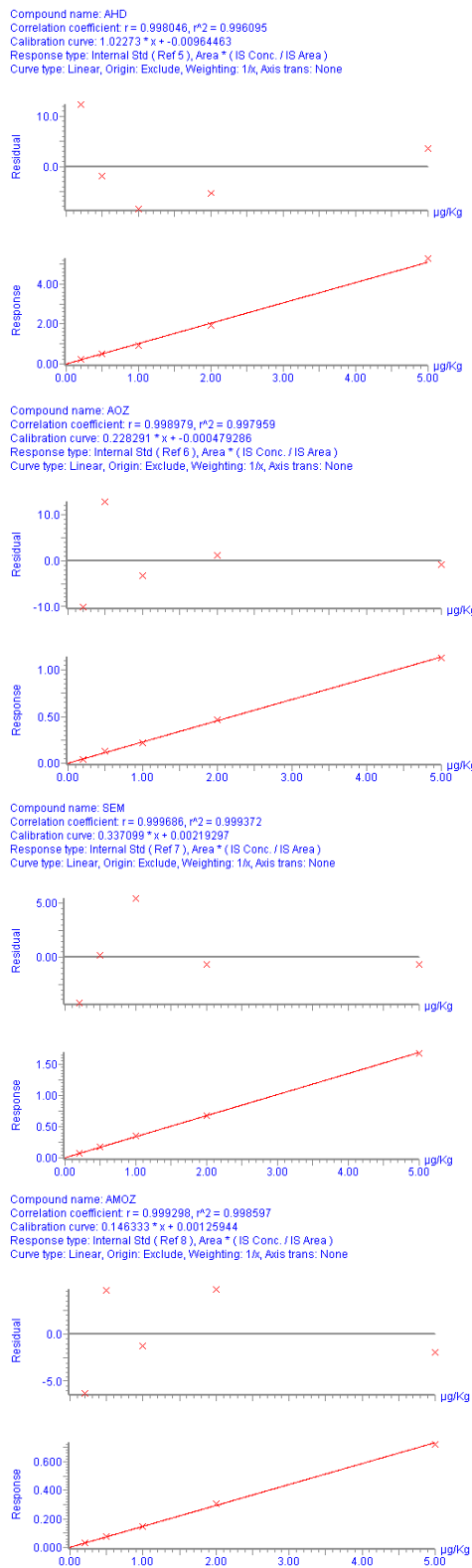
Rezultati i diskusija

Metoda [18] je primenjena na uzorcima krvne plazme svinja i goveda koji potiču od nasumično izabranih životinja privatnog proizvođača u Vojvodini. Krv je uzorkovana u Li-heparinske tube i nakon odvajanja plazme, uzorci su zamrznuti i poslani u Teagasc Food reserach centre Ashtown (Irska), gde su analizirani.

Osim nepoznatih uzoraka, u sklopu analize testiran je jedan negativan uzorak, 4 uzorka za procenu efikasnosti ekstrakcije (recovery), 5 uzoraka koji su sačinili matrikskalibracionu krivu i jedna slepa proba. Prilikom injektiranja u UHPLC-MS/MS sistem, prvo je analiziran standard poznate koncentracije (1 µg/kg) koji je ponovo injektiran nakon svakih pet uzoraka kako bi se kontrolisala validnost rada sistema.

Identitet jedinjenja u matriksu je bio potvrđen adekvatnim retencionim vremenom, pregledom odnosa intenziteta dva jonska produkta za svaki analit, kao i pregledom odnosa signala prema šumu (S/N). Srednja vrednost odnosa jona dobijena je usrednjavanjem jonskih odnosa signala iz kalibracione krive u matriksu (od 0.2 do 5 µg/kg). Prema Odluci Komisije 2002/657/EC za AHD, AOZ i SEM prihvatljivo odstupanje od srednje vrednosti je 20 % a za AMOZ 25 % [17].

Svi uzorci su bili negativni na prisustvo AHD, AOZ i AMOZ. U 3 uzorka plazme svinja detektovano je prisustvo SEM. Kalibracione krive su imale zadovoljavajući nagib i koeficijent korelacije je bio preko 0.995 (Slika 3.)



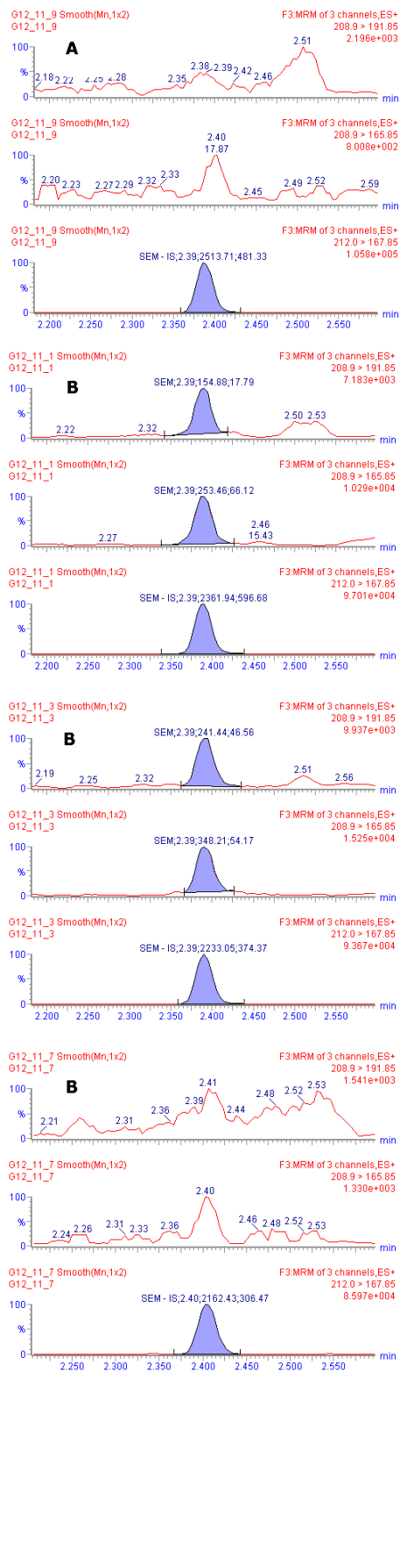
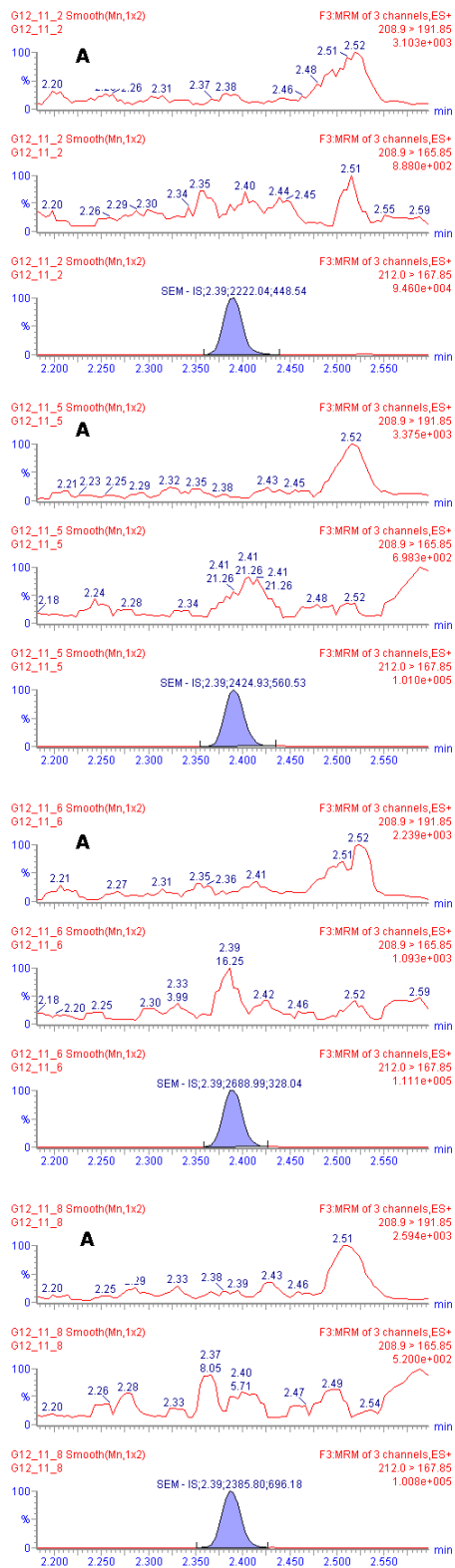
Slika 3. Kalibracione krive, korelacioni koeficijenti i analiza rezidua za sva četiri metabolita

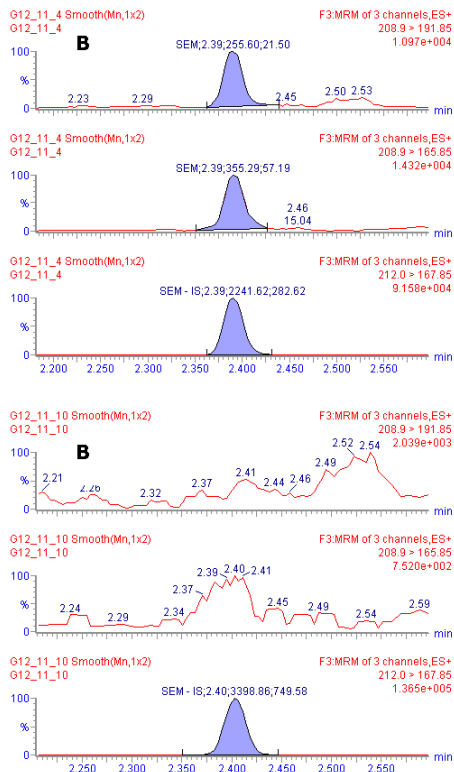
Figure 3. Calibration curves, correlation coefficients and the analysis of residues for all four metabolites

Efikasnost ekstrakcije je izračunata poređenjem nagiba kalibracione krive sa nagibom krive dobijene fortifikacijom uzoraka derivatizovanim metabolitima nakon

ekstrakcije. Vrednosti su bile u okviru prihvatljivih granica i iznosile su 71.7, 77.7, 66.6 i 70.6 % za AHD, AOZ, SEM i AMOZ, respektivno.

Na Slici 4. su prikazani MRM hromatogrami SEM sa dva jonska prelaza i odgovarajućim internim standardom u uzorcima krvne plazme goveda i svinja.





Slika 4. MRM hromatogrami za derivatizovani metabolit SEM (dve tranzicije i interni standard) u krvnoj plazmi goveda (A) i svinja (B)

Figure 4. MRM chromatograms of derivatized metabolite SEM (two transitions and the internal standard) in blood plasma of bovine (A) and porcine (B)

Pozitivne vrednosti SEM su identifikovane u uzorcima G12/11/1, G12/11/3 i G12/11/4 i iznosile su 0.19, 0.31 i 0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ računato u odnosu na kalibracionu krivu pripremljenu u primenom plazme goveda. Kvantifikacija je radi poređenja izvedena i u odnosu na kalibracionu krivu pripremljenu primenom krvne plazme svinje i vrednosti su tada iznosile 0.22, 0.33 i 0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SEM za iste uzorke. Rezultati pokazuju zadovoljavajuće slaganje, jer je razlika reda velicine 10 % prihvatljiva u analizi rezidua. Svi pozitivni rezultati su iznad utvrđene CC α vrednosti za SEM od 0.071 $\mu\text{g}/\text{kg}$. CC α vrednosti su određene za svaki metabolit posebno u matriksu plazme i prethodno su objavljene [18]. Prisustvo SEM u krvnoj plazmi u ovoj koncentraciji ne predstavlja automatski dokaz za ilegalnu primenu nitrofurazona (NFZ). Kontaminacija tragovima semikarbazida može poticati iz različitih izvora, ponekad se i prirodno nalazi u hrani (npr. ugušćivači na bazi karagena, brašno koje sadrži azodikarbonamid kao stabilizator) i potrebno je dodatno istraživanje da bi se utvrdio uzrok pozitivnog signala. Članice evropske unije primenjuju različite referentne regulatorne vrednosti za tretiranje uzoraka u kojima je identifikovan sadržaj metabolita nitrofurana. U nekim drzavama ona iznosi 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u analiziranom tkivu, dok druge članice primenjuju CC α vrednosti kao granične vrednosti prihvatljivosti.

Zaključak

Rezultati pokazuju da su uzorci krvne plazme (5 uzoraka svinja i u 5 uzoraka goveda) bili negativni na zvanične markere za kontaminaciju nitrofuranimi u krvnoj plazmi, tj. prisustvo AHD, AOZ i AMOZ. U 3 uzorka plazme svinja detektovano je prisustvo SEM.

Ovaj rad unapređuje potencijal za izvoz domaćih životinja u EU, putem demonstracije kapaciteta za prepoznavanje i kvantifikaciju rezidua zabranjenih antibiotika u krvi u skladu sa EU legislativom.

Pružena je podrška razvoju domaće industrije i potencijalnom izvozu proizvoda od mesa uz savremeni monitoring.

Zahvalnica

Za finansijsku potporu autori se najsrdačnije zahvaljuju: Teagasc (Project RMIS 4735) i Ministarstvu za obrazovanje i Pokrajinskom sekretarijatu za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine (Projekat No. 114-451-2373/2011).

Literatura

- [1] K. Miura, H. K. Reckendorf, The Nitrofurans. In Progress in Medicinal Chemistry, G.P., E.; G.B., W., Eds. Plenum Press: New York, 1967; Vol. 6, p. 320-381.
- [2] B. Jorge F. Maria, R. Fernando, S. Maria, Determination of the furaltadone metabolite 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ) using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry during the nitrofurantoin crisis in Portugal, Accreditation and Quality Assurance 12 (10) (2007) 543-551.
- [3] S. M. Cohen, Toxicity and carcinogenicity of nitrofurans. In Nitrofurans Carcinogenesis: A Comprehensive survey Bryan, G. T., Ed. Raven Press: New York, 1978, Vol. 4, p. 171.
- [4] F. Kari, Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nitrofurazone (CAS No. 59-87-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies); US Department of Health and Human Services: 1988; p. 1-186.
- [5] J. F. Nouws, J. M. Laurensen, Postmortal degradation of furazolidone and furaltadone in edible tissues of calves, Veterinary Quarterly, 12 (1) (1990) 56-59.
- [6] R. J. McCracken, W. J. Blanchflower, C. Rowan, McCoy, D. G. Kennedy, Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues, Analyst, 20 (9)(1995) 2347-2351.
- [7] A. Leitner, P. Zöllner, W. Lindner, Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 939(1-2) (2001) 49-58.
- [8] E. Horne, A. Cadogan, M. Okeeffe, L. A. P. Hoogenboom, Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry, Analyst, 121 (10) (1996) 1463-1468.
- [9] L. A. P. Hoogenboom, O. Tomassini, m. B. M. Oorsprong, H. A. Kuiper, Use of pig hepatocytes to study the inhibition of monoamine-oxidase by furazolidone, Food and

- Chemical Toxicology 29 (3) (1991)185-191.
- [10] R. J. McCracken, D. G. Kennedy, Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland, *Journal of Chromatography B*, 691 (1) (1997) 87-94.
- [11] R. J. McCracken, D. G. Kennedy, The bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effect of cooking upon residue concentrations. *Food Additives and Contaminants*, 14 (5) (1997) 507-513.
- [12] L. A. P.Hoogenboom, M. C. J.Berghmans, T. H. G. Polman, R. Parker, R., I. C. Shaw, Depletion of protein-bound furazolidone metabolites containing the 3-amino-2-oxazolidinone side-chain from liver, kidney and muscle tissues from pigs, *Food Additives and Contaminants*, 9 (6) (1992) 623-630.
- [13] L. A. P.Hoogenboom, G. D. van Bruchem, K. Sonne, I. C. Enninga, J. A. van Rhijn, H. Heskamp, M. B. M. Huveneers-Oorsprong, J. C. M van der Hoeven, H. A. Kuiper, Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11 (3-4) (2002) 273-287.
- [14] 2377/90, C. R. E., Council Regulation, Official Journal of the European Communities L224/1 1990.
- [15] 1442/95/EC, C. R., Council Regulation. Official Journal of European Communities L143/26 1995.
- [16] S. P. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, P.A. Guy, R. H. Stadler, P. Mottier, Analysis of Matrix-Bound Nitrofurans Residues in Worldwide-Originated Honeys by Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (17) (2004) 5309-5315.
- [17] 2002/657/EC, C. D., Commission Decision, Official Journal of the European Communities L221/8 2002.
- [18] A. Radovniković, M. Moloney, P. Byrne, M. Danaher, M., Detection of banned nitrofurans metabolites in animal plasma samples using UHPLC-MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 159-166.
- [19] A. Radovniković, Određivanje rezidua metabolita nitrofurana u životinjskoj plazmi primenom ultravisokopritisne tečen hromatografije sa masenom spektrometrijom, Doktorska disertacija, 2012., Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

Summary

RESIDUE ANALYSES OF NITROFURAN METABOLITES IN ANIMAL PLASMA BY UHPLC-MS/MS – A SUPPORT TO DOMESTIC MEAT INDUSTRY

Anita J. Radovniković¹, Martin Danaher¹, Marijana M. Ačanski², Ljiljana S. Petrović²
Branislav V. Šojić²

¹Teagasc Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland

² Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

(PROFESSIONAL PAPER)

UDK 637.5:547.72+547.232:543.2/9

Since NF application is prohibited in the breeding of pre-slaughter animals in the EU, these compounds are contained in Annex IV of the Regulation 2377/90. There is no accepted limit for their presence in the animal meat or meat products. Official markers of NF contamination from blood plasma are: 3-amino-2-oxazolidinone – **AOZ**, 3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidon-2-one – **AMOZ**, 1-aminohydantoin – **AHD** and semicarbazide- **SEM**. Previously carried out validation of the method using UHPLC/MS/MS (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry) (*in house*) for determining NF metabolites was also applied on the blood samples of pre-slaughter animals from Vojvodina. The samples were prepared in the Meat Analysis Laboratory, Faculty of Technology (Novi Sad, Serbia), and sent to the Teagasc Food Research Center (Republic of Ireland), where they were analyzed.

The method was validated from 0.2-5 µg kg⁻¹ using fortified animal plasma. CCα and CCβ values were determined according to EU requirements. The results showed that all samples were negative in terms of the presence of AHD, AOZ and AMOZ. SEM presence was detected in three samples of pig plasma. The paper improves the potential for the export of domestic animals in the EU by demonstrating the capacities for recognizing and quantification of residues of prohibited antibiotics in blood, in accordance with EU legislation.

Modern monitoring methods were used in support of the development of domestic industry and the potential export of meat products.

Keywords: nitrofurans, UHPLC-MS/MS, residues, blood plasma, metabolites