

УДК 543 + 577

DOI: 10.20535/1810-0546.2017.3.100683

О.М. Іванова^{1,2*}, О.Ю. Галкін³¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна²ТОВ "ХЕМА", Київ, Україна³КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ І БІОХІМІЧНИХ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТІВ НІТРОФУРАНІВ У ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ

Background. Nitrofurans belong to a class of synthetic antibiotics, which are widely used in various livestock sectors due to their high effectiveness in control over infectious diseases and as a growth activator. Nitrofurans are rapidly metabolized compounds, but the metabolites of these drugs are able to bind to protein structures and accumulate in the body of animals. Nitrofuran metabolites show carcinogenic properties, therefore it is necessary to control their content in food products of animal origin.

Objective. The aim of the paper is to summarise modern methods for nitrofurans analysis.

Methods. The modern methods of sample preparation of food products of animal origin for extracting nitrofuran metabolites and methods for detecting these analytes are systematized and analyzed.

Results. Modern analysis methods have a sufficient sensitivity level of nitrofurans determination in the form of final products – furaltadone and furazolidone metabolites. There are several methods of detection, among which are chromatographic methods and enzyme immunoassay.

Conclusions. Analysis of the literature has shown that use of combined techniques combining selective removal of nitrofuran metabolites from the sample matrix and their quantification, allows screening and confirmatory test for the presence of nitrofurans in food and also allows detecting analytes at 1 mg/kg.

Keywords: nitrofurans; sample preparation; nitrofuran metabolites; nitrofuran detection methods.

Вступ

Нітрофурани – протимікробні препарати, що належать до класу синтетичних антибіотиків широкого кола використання. Характерною особливістю цієї групи препаратів є наявність п'ятичленного нітрофуранового кільця в структурі антибіотиків. Нітрофурани зазвичай використовують як ветеринарні терапевтичні або кормові добавки з метою пришвидшення росту або ж для профілактики та лікування бактеріальних захворювань великої рогатої худоби, свиней, птиці, риби та бджіл, що можуть спричиняти *Escherichia coli* та *Salmonella spp.* [1]. Як лікарські препарати нітрофурани застосовують досить тривалий час – вони введені в практику з 1953 р. Слідом кількості таких речовин, що можуть накопичуватись у продуктах харчування за рахунок недотримання періоду виведення цих аналітів або значного перевищення дозування препаратів, є джерелом виникнення та розвитку алергій і порушень в організмі людини. Особливу небезпеку вони несуть для дітей і людей, схильних до алергії. Тому з 1995 р. Європейський Союз (ЄС) заборонив використання цих препаратів для широкого вжитку в господарстві [2] у зв'язку з появою інформації про небезпечні канцерогенні властивості метаболітів і потенційну загрозу людському здоров'ю [3–5].

Однак використання нітрофуранів для лікування людей і тварин не припинилося. Такі препарати доступні у фармації, а тому доцільно контролювати продукти тваринного походження на вміст цих аналітів.

Продукція тваринного походження на ринку ЄС підлягає суворому контролю та регулярній перевірці не тільки на стадії сировини, але й на полицях супермаркетів.

Для визначення нітроароматичних сполук у складних матрицях, таких як мед, молоко, яйце, морські продукти, риба та м'ясо, переважно використовують методи високоефективної рідинної хроматографії у поєднанні із мас-спектрометричним чи ультрафіолетовим (УФ) детектуванням та імуноферментний аналіз.

Постановка задачі

Мета роботи полягає в детальному вивченні сучасних підходів пробопідготовки та кількісного визначення метаболітів нітрофуранів із продуктів харчування тваринного походження, систематизації методів аналізу метаболітів.

Біотрансформація нітрофуранів

Структури вихідних антибіотичних препаратів – фуразолідону та фуралтадону, а також

* corresponding author: nauka@xema.com.ua

їх метаболіти, АОЗ та АМОЗ відповідно, зображені на рис. 1. Проблема детектування антибіотика в початковій формі пов'язана зі швидким метаболізмом препарату [6, 7] – період напіврозпаду *in vivo* для нітрофуранів становить 7–63 хв. Однак метаболіти цих препаратів є досить стійкими і можуть зберігатися в організмі тривалий час за рахунок ковалентного зв'язування з білковими структурами. Механізм метаболізму препаратів *in vivo* такий: під впливом шлункової кислоти розщеплюється нітрофуранове кільце вихідного антибіотика. Специфічна залишкова група ковалентно приєднується до білкових структур [8]. Цей факт використовують під час проведення пробопідготовки зразків продуктів харчування задля вивільнення залишків метаболітів із білкових структур.

Дослідження біоактивності метаболітів нітрофуранів підтвердили можливість приєднання залишкового фрагмента молекули нітрофурану до білкових структур і високу стабільність цих аналітів навіть після термічної обробки продуктів харчування [9]. Концентрація метаболітів нітрофуранів, навіть після зберігання замороженого зразка більше 6 місяців, істотно не зменшилась. Автори дослідження встановили, що навіть після розморожування та проведення термічної обробки – нагрівання у мікрохвильовій печі, смаження, варіння – вміст аналітів залишився на рівні 67–100 % від вихідної кількості. Також учені

дослідили не лише стабільність, а й розподіл метаболіту фуразолідону між фракціями продукту, зокрема в яйці. Виявлено, що 78 % від загальної вмісту АОЗ міститься у яєчному жовтку [10].

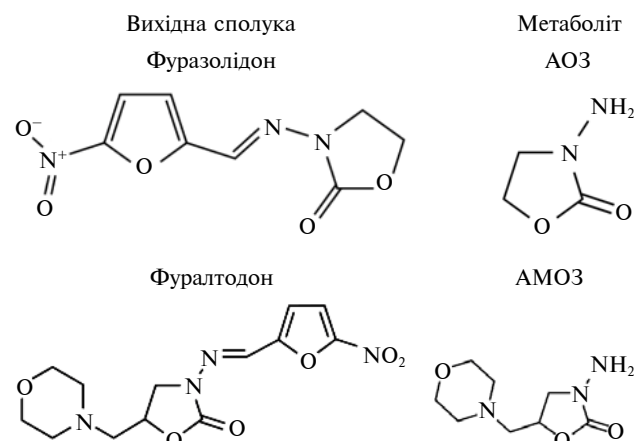


Рис. 1. Структури вихідних препаратів і метаболітів АОЗ, АМОЗ

Методи пробопідготовки зразків

Оскільки нітрофурані, як зазначалося вище, використовуються у багатьох галузях агропромислового комплексу, вчені забезпечили кількісне визначення аналітів у таких матрицях, як м'ясо [11–13], курячі яйця [13–15], морепродукти, а саме: креветки [16], молюски [17], молоко [18]. Перелік матриць і умов визначення метаболітів нітрофуранів наведено в таблиці.

Таблиця. Методи пробопідготовки та визначення АОЗ і АМОЗ у харчових продуктах

Зразок	Аналіт	Пробопідготовка зразка	Метод визначення	Ступінь вилучення, %	Межа виявлення (МВ) і межа кількісного визначення (МКВ), мкг/кг	Посилання
Яйце	АОЗ, АМОЗ	1 г гомогенізованого зразка дериватизують (5 мл 0,1 М HCl, 150 мкл 50мМ о-НБА в ДМСО) і встановлюють рН 7–7,5 (5 мл 0,1 М K ₂ HPO ₄ , 0,4 мл 1 М NaOH) із подальшою екстракцією двічі по 6 мл етилацетату	ВЕРХ із МС/МС-детектуванням. Колонка для розділення C ₁₈ , об'єм інжектування 25 мкл, швидкість потоку 0,2 мл/хв	98–104	МВ АОЗ = 0,14 МКВ АОЗ = 0,44 МВ АМОЗ = 0,13 МКВ АМОЗ = 0,25	[29]
Яйце	АОЗ, АМОЗ	1 г гомогенізованого зразка дериватизують (5 мл 0,2 М HCl, 75 мкл 100 мМ о-НБА в MeOH) і встановлюють рН 7 (0,5 мл 1 М NaOH) із подальшою екстракцією двічі по 4 мл етилацетату та двічі гексаном по 2 мл	ВЕРХ із потрійним квадруплом МС/МС-детектування. Колонка для розділення C ₁₈ , об'єм інжектування 40 мкл, швидкість потоку 0,2 мл/хв	95,2–102	МВ АОЗ = 0,03 МКВ АОЗ = 0,03 МВ АМОЗ = 0,05 МКВ АМОЗ = 0,06	[30]

Продовження таблиці

Зразок	Аналіт	Пробопідготовка зразка	Метод визначення	Ступінь вилучення, %	Межа виявлення (МВ) і межа кількісного визначення (МКВ), мкг/кг	Посилання
Яйце	АОЗ, АМОЗ	1 г гомогенізованого зразка дериватизують (4 мл H ₂ O, 0,5 мл 0,2 М HCl, 50 мкл 150 мМ о-НБА в ДМСО) і встановлюють рН 7,4 (0,4 мл 1 М NaOH та 5 мл 0,1 М K ₂ HPO ₄) із подальшою екстракцією двічі по 5 мл етилацетату	ВЕРХ із потрійним квадруполом МС/МС-детектування. Колонка для розділення C ₁₈ , об'єм інжектування 5 мкл	70–115	МВ < 1 МКВ < 2	[10]
Яйце	ФЗД	Гомогенізований зразок масою 8 г оброблюють ди-хлорметаном у слабкокислому середовищі (рН 4), органічну фазу випаровують, оброблюють залишок ацетоном, фільтрують і ще раз випаровують. Додають гексан для усунення ліпопротейної фракції та перерозчиняють зразок у воді	ВЕРХ із ДМД-детектуванням при λ = 365 нм. Колонка для розділення C ₈ . Швидкість потоку 1 мл/хв	93	МВ = 1	[31]
Яйце, яєчний порошок	АОЗ	Гомогенізований зразок масою 2 г дериватизують (10 мл 0,2 М HCl, 240 мкл о-НБА в MeOH), встановлюють рН 7 (10 мл 0,2 М K ₂ HPO ₄ , 0,8 мл 2 М NaOH). Екстрагують та очищують зразок із використанням картриджа для ТФЕ	ВЕРХ із МС/МС-детектуванням. Колонка для розділення C ₁₈ , швидкість потоку 0,2 мл/хв	85–187,5	МВ = 0,15 та 0,4 для яйця та яєчного порошку відповідно	[14]
М'ясо птиці, креветки	АОЗ, АМОЗ	1 г гомогенізованого зразка дериватизують (5 мл 0,2 М HCl, 75 мкл 100 мМ о-НБА в MeOH) із подальшою екстракцією двічі по 4 мл етилацетату. Випаровують органічну фазу та перерозчиняють у 250 мкл MeOH і амонію форміаті, двічі очищують гексаном по 2 мл	ВЕРХ із потрійним квадруполом МС/МС-детектування. Колонка для розділення C ₁₈ , об'єм інжектування 50 мкл, швидкість потоку 0,2 мл/хв	92–100,6	МВ АОЗ = 0,12 МКВ АОЗ = 0,36 МВ АМОЗ = 0,13 МКВ АМОЗ = 0,39	[25]
М'ясо птиці, яйце	АОЗ, АМОЗ	1 г гомогенізованого зразка дериватизують (5 мл 0,2 М HCl, 50 мкл 100 мМ о-НБА в ДМСО), встановлюють рН 7 (0,5 мл 0,3 М Na ₃ PO ₄ , 0,4 М NaOH) із подальшою екстракцією 4 мл етилацетату	ВЕРХ із потрійним квадруполом МС/МС-детектування. Колонка для розділення C ₁₈ , швидкість потоку 0,2 мл/хв	129	МВ = 0,5	[32]
М'ясо птиці, свинина	АОЗ, АМОЗ	5 г гомогенізованого зразка дериватизують (250 мл 0,125 М HCl, 250 мкл 50 мМ о-НБА в ДМСО), встановлюють рН 7 та проводять екстракцію в 15 мл етилацетату. Додають гексан для очистки та проводять ТФЕ	ВЕРХ із потрійним квадруполом МС/МС-детектування. Колонка для розділення C ₁₈ , швидкість потоку 0,2 мл/хв	85–123	МВ = 0,11 МКВ = 0,36	[33]

Закінчення таблиці

Зразок	Аналіт	Пробопідготовка зразка	Метод визначення	Ступінь вилучення, %	Межа виявлення (МВ) і межа кількісного визначення (МКВ), мкг/кг	Посилання
Печінка свиняча, молюски	АОЗ	До 5 г гомогенізованого зразка додають 1,5 мл води і 10 мл MeOH та дериватизують (1,5 мл 1 М HCl, 100 мкл 50 мМ о-НБА в ДМСО), встановлюють рН 6,3 та проводять екстракцію в 32 мл етилацетату порціями. Проводять ТФЕ із використанням картриджів	РХ–МС/МС: колонка для розділення C ₁₈ , швидкість потоку 0,4 мл/хв, об'єм інжектування 20 мкл. РХ–УФ: колонка для розділення C ₁₈ , швидкість потоку 0,8 мл/хв, об'єм інжектування 100 мкл, λ = 275 нм	83,5–117	Не встановлено	[34]
Молоко	АОЗ, АМОЗ	1 г цільного молока дериватизують (9 мл 0,1 М HCl, 100 мкл 100 мМ о-НБА), встановлюють рН 7,2 (1 М NaOH) із подальшою екстракцією двічі по 5 мл етилацетату	ВЕРХ–МС/МС: колонка для розділення C ₁₈ , швидкість потоку 0,2 мл/хв, об'єм інжектування 40 мкл	91–107	МВ = 0,12 МКВ = 0,36	[35]

Метаболіти нітрофуранів – це невеликі за розміром молекули, що зазвичай дериватизують за допомогою орто-нітробензальдегіду (див. рис. 1). Збільшення молекулярної маси аналітів підвищує чутливість визначення [19]. Перш ніж проводити дериватизацію, зразок продукту піддають кислотному гідролізу (рис. 2), вивільняючи таким чином фрагмент молекули нітрофурану. Деривати нітрофуранів (див. рис. 1) відділяють від матриці за допомогою різних методів, а саме рідинної-рідинної екстракції (PPE) і твердофазової екстракції (ТФЕ).

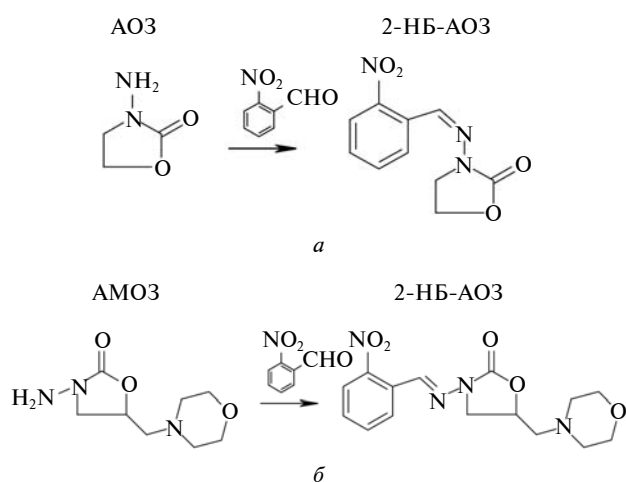


Рис. 2. Дериватизація на прикладі АОЗ (а) та АМОЗ (б) і структури отриманих дериватів після реакції з о-нітробензальдегідом

Традиційно пробопідготовка зразка включає такі стадії, як гомогенізація, кислотний гідроліз, дериватизація та екстракція.

PPE – поширений метод виділення цільових компонентів – дериватів метаболітів нітрофуранів. Зазвичай PPE дериватів проводять із використанням полярних розчинників, таких як етилацетат або ацетонітрил. Задля очистки від ліпідних складових матриці застосовують неполярні розчинники, такі як н-гептан або н-гексан. Уперше PPE для вилучення деривату АОЗ зі зразка яйця була описана в 2001 р. Р. МакКракеном [20].

Результати визначення метаболітів АОЗ і АМОЗ за допомогою PPE залежать від природи матриці та дотримання умов вилучення – відповідності кислотності розчину, вмісту сольових компонентів, заважаючого впливу надлишку дериватизуючого реагенту в пробі тощо.

У літературі описані методи попередньої пробопідготовки зразків перед проведенням PPE. Це стосується зразків із такою матрицею, як м'ясо, печінка та нирки тварин. Ефективна гомогенізація зразків підвищує ступінь екстрагування та поліпшує результат кількісного визначення, крім того, суттєво зменшується вплив матриці продукту на результати аналізу. Так, Р. МакКракен запропонував заморожування та подрібнення зразка м'яса в блендері до стану крижаного порошку [21, 22] задля вилучення метаболіту АОЗ із матриці. Також учені описали засто-

сування метанолу й етанолу для попереднього відділення АОЗ зі зразків печінки, нирок і м'яса [23, 24].

Класичним варіантом проведення PPE дериватів метаболітів із досліджуваного зразка є використання як розчинника етилацетату. Такий підхід дає змогу кількісно екстрагувати аналіти та швидко вилучити зразок у будь-яку іншу фазу випарюванням етилацетату.

PPE – класичний підхід до вилучення дериватів АОЗ і АМОЗ зі зразків різних матриць. Цей метод є простим у використанні (експлуатації, проведенні), проте потребує високочистих розчинників, що впливає на кінцеву вартість досліджень.

ТФЕ є альтернативним методом пробопідготовки зразків, що забезпечує кількісне вилучення та концентрування аналіту. Проте ТФЕ також є трудомістким та часозатратним методом, оскільки потребує додаткових операцій для забезпечення кількісної сорбції аналіту на поверхні фази, що міститься в картриджі, а саме необхідно проводити попереднє багатостадійне кондиціонування сорбенту.

Одним із ефективних сорбентів, що застосовуються для відділення неполярних компонентів матриці від полярних (антибіотиків), є силікагель із ковалентно закріпленими октадецильними групами ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$). А. Конеллі [19] запропонував методику використання одразу двох різних ТФЕ-картриджів задля усунення заважаючого впливу надлишкового вмісту о-нітробензалдегіду і матричних ефектів. Послідовне використання двох картриджів марки Oasis, що працюють як йонообмінники, дає можливість усунути вплив матриці та позбутися сторонніх піків на хроматограмі. За рахунок наявності іонообмінної та полімерної фаз у складі картриджа вдалося відділити надлишок о-НБА, що не прореагував від деривату метаболіту фуразолідону. Це значно покращило чутливість визначення.

Методи кількісного визначення нітрофуранів

Узагальнений короткий опис умов пробопідготовки зразків харчових продуктів і визначення метаболітів нітрофуранів наведено в таблиці. Такі методи аналізу, а саме імуноферментний аналіз та рідинна хроматографія, можуть використовуватися для скринінгу зразків та як підтверджуючий метод аналізу, що передбачено законодавчими нормами ЄС.

Хроматографічні методи. Серед хроматографічних методів визначення метаболітів нітро-

фуранів найпершими почали широко застосовуватися методи рідинної хроматографії з УФ-детектуванням аналітів або використанням діодноматричного детектора (ДМД) [1;23]. Детектування в УФ-області (180–350 нм) не є специфічним, а тому не є достатнім для одночасного визначення декількох аналітів. Останніми роками широкого використання набули рідинна хроматографія високого тиску, а також рідинна хроматографія з електронною іонізацією та детектуванням із використанням тандемної мас-спектрометрії (ВЕРХ–МС/МС і РХ–ЕСІ–МС/МС відповідно), що значно розширило можливості кількісних методів для визначення нітрофуранів [11, 12, 14].

Традиційно для визначення метаболітів нітрофуранів використовують хроматографічні колонки, заповнені силікагелем з октадецильними групами ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$) або силікагелем із прищепленою фазою C_8 [31]. Готують розчини внутрішніх стандартів D4-3-аміно-2-оксозалідінон і D5-аміно-5-морфілометил-2-оксозалідінон із концентраціями 0,1 мг/л у метанолі, які можуть зберігатися протягом року при +4 °C [25].

Найчастіше для визначення метаболітів нітрофурану використовують мас-спектроскопічний метод аналізу з технологією електронної іонізації. Метод РХ–МС/МС високочутливий, тому сигнал від матриці може перебивати сигнал від досліджуваного аналіту. Використання РХ–МС/МС актуальне як метод визначення метаболітів нітрофуранів для підтвердження результатів скринінгового аналізу аналітів методами ВЕРХ–ДМД, ВЕРХ–УФ, а також ІФА [26].

Імуноферментний аналіз метаболітів нітрофуранів. Імуноферментний аналіз (ІФА) оснований на проведенні високочутливої реакції комплексоутворення між антигеном і антитілами. Залежно від конструкції імуноферментних тест-систем можливе проведення одно- або двостадійного непрямого конкурентного ІФА-визначення метаболітів АОЗ і АМОЗ. За рахунок високої специфічності можливе лише окреме визначення метаболітів АОЗ і АМОЗ імуноферментним методом. Цей метод дає змогу проводити скринінг у таких матрицях, як мед, молоко, м'ясо, морепродукти, яйця тощо [13, 15, 17].

Уперше ІФА-визначення деривату АОЗ за допомогою поліклональних антитіл із матриці м'яса описано К. Купером [17, 27]. Визначення деривату АОЗ методом ІФА із використанням моноклональних антитіл описано І. Дібліковою [28].

На сьогодні комерційно доступні тест-системи для ІФА дають змогу визначати деривати ме-

таболітів АОЗ і АМОЗ на рівні 0,1 і 0,2 мкг/кг відповідно.

У більшості випадків для проведення ІФА-визначення аналітів проби харчових продуктів піддають кислотному гідролізу, дериватизації з о-нітробензальдегідом протягом 16–18 год і проводять РРЕ дериватів із застосуванням етилацетату для вилучення цільових компонентів. Гідрофобні компоненти розчиняють у гексані, цільові аналіти переводять у водну фазу – буферні розчини, що входять до складу комерційних тест-систем.

Результати виміру ІФА-методом вмісту дериватів АОЗ і АМОЗ також залежать від впливу кислотності підготовленого зразка, ступеня очистки проби від гідрофобних складових матриці.

Висновки

Незважаючи на наявність відповідних норм, що обмежують використання нітрофуранів у сільському господарстві країн ЄС, ці антибіотичні препарати є комерційно доступними та ефективними у боротьбі з інфекційними захворюваннями тварин, птахів і бджіл та продовжують використовуватися з лікувальною і про-

філактичною метою. На законодавчому рівні в ЄС визначено мінімальний рівень кількісного вмісту метаболітів нітрофуранів як 1 мкг/кг продукту. Допустимий вміст нітрофуранів у продуктах харчування є досить низьким, що накладає жорсткі вимоги до аналітичних методів для визначення метаболітів нітрофуранів. Кількісне визначення аналітів потребує поєднання нових методів пробопідготовки зразків із високочувливими методами детектування кінцевих дериватів. Лише за допомогою одночасного поєднання сучасних методів пробопідготовки зразків зі складними матрицями із високочувливими методами детектування, такими як ІФА та ВЕРХ або РХ, можливе кількісне визначення метаболітів нітрофуранів на рівні слідових кількостей.

З урахуванням систематизації інформації щодо методів пробопідготовки та методів кількісного визначення метаболітів нітрофуранів подальші дослідження будуть спрямовані на розробку та вдосконалення методики сумісного виділення і концентрування метаболітів на поверхні твердофазового носія з подальшим імуноферментним кількісним визначенням.

Список літератури

- [1] *Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography ionspray mass spectrometry* / R. Draisci, L. Giannetti, L. Lucentini et al. // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – **777**, № 1. – P. 201–211.
- [2] *Commission Regulation (1995): Commission Regulation (EC) 1442/95 of 26 June 1995 amending Annexes I, II, III and IV of Regulation (ECC) No 2377/90 laying down a Community Procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin* // *Official Journal of the European Communities.* – 1995. – **L143**. – P. 26–30. – Available: http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&numdoc=31995R1442&model=guichett&lg=en
- [3] *Mecalla D.R.* Mutagenicity of nitrofurans derivatives: Review // *Environ. Molecular Mutagenesis.* – 1983. – **5**, № 5. – P. 745–765.
- [4] *In vivo and in vitro metabolic studies of furazolidone: A risk evaluation* / L.H. Vroomen, P.J. van Bladeren, J.P. Groten et al. // *Drug Metabolism Rev.* – 1990. – **22**, № 6-8. – 663–676.
- [5] *Van Koten-Vermeulen J.E.M.* Report of the 40th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). – Geneva: World Health Organisation, 1993.
- [6] *Nouws J.F.M., Laurensen J.* Postmortal degradation of furazolidone and furaltadone in edible tissues of calves // *Vet. Quarterly.* – 1990. – **12**, № 1. – P. 56–59.
- [7] *Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues* / R.J. McCracken, W.J. Blanchflower, C. Rowan et al. // *Analyst.* – 1995. – **120**. – P. 2347–2351.
- [8] *Leitner A., Zollner P., Lindner W.* Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – **939**, № 1-2. – P. 49–58.
- [9] *Cooper K.M., Kennedy D.G.* Stability studies of the metabolites of nitrofurans antibiotics during storage and cooking // *Food Addit. Contam.* – 2007. – **24**, № 9. – P. 935–942.
- [10] *McCracken R.J., Kennedy D.G.* Detection, accumulation and distribution of nitrofurans residues in egg yolk, albumen and shell // *Food Addit. Contam.* – 2007. – **24**, № 1. – P. 26–33.

- [11] Verdon E., Couedor P., Sanders P. 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 // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – **586**, № 1-2. – P. 336–347.
- [12] Rodziejewicz L., Zawadzka I. Determination of nitrofuran metabolite residues in animal tissues by LC-MS/MS method // *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny.* – 2007. – **58**, № 4. – P. 625–632.
- [13] Enzyme immunoassay for semicarbazide – the nitrofuran metabolite and food contaminant / K.M. Cooper, J.V. Samsonova, L. Plumpton et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – **592**, № 1. – P. 64–71.
- [14] Szilagyi S., de la Calle B. 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.* – 2006. – **572**, № 1. – P. 113–120.
- [15] In-house validation of an ELISA method for screening of semicarbazide in eggs / M. Vass, I. Diblikova, E. Kok et al. // *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess.* – 2008. – **25**, № 8. – P. 930–936.
- [16] Chu P.S., Lopez M.I. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans // *J. Agricult. Food Chem.* – 2005. – **53**, № 23. – P. 8934–8939.
- [17] Cooper K.M., Elliott C.T., Kennedy D.G. Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissuebound metabolite of the nitrofurans furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay // *Food Addit. Contam.* – 2004. – **21**, № 9. – P. 841–848.
- [18] Emergence of tetracycline-resistant *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba, in Kolkata, India / A. Roychowdhury, A. Pan, D. Dutta et al. // *Jpn J. Infec. Dis.* – 2008. – **61**, № 2. – P. 128–129.
- [19] Conneely A., Nugent A., O’Keeffe M. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues // *Analyst.* – 2002. – **127**, № 6. – P. 705–709.
- [20] Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in eggs / R.J. McCracken, D.E. Spence, S.D. Floyd, D.G. Kennedy // *Food Addit. Contam.* – 2001. – **18**, № 11. – P. 954–959.
- [21] McCracken R.J., Kennedy D.G. 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 // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* – 1997. – **691**, № 1. – P. 87–94.
- [22] McCracken R.J., Kennedy D.G. The bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effect of cooking upon residue concentrations // *Food Addit. Contam.* – 1997. – **14**, № 5. – P. 507–513.
- [23] Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry / E. Horne, A. Cadogan, M. O’Keeffe, L.A.P. Hoogenboom // *Analyst.* – 1996. – **121**, № 10. – P. 1463–1468.
- [24] Cooper K.M., Kennedy D.G. Nitrofurans antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs – a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurans abuse // *Analyst.* – 2005. – **130**, № 4. – P. 466–468.
- [25] Bock C., Gowik P., Stachel C. Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS // *J. Chromatogr. B: Biomed. Life Sci.* – 2007. – **856**, № 1-2. – P. 178–189.
- [26] Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / T.G. Diaz, A.G. Cabanillas, M.I.A. Valenzuela et al. // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – **764**, № 2. – P. 243–248.
- [27] Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurans furazolidone / K.M. Cooper, A. Caddell, C.T. Elliott, D.G. Kennedy // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – **520**, № 1-2. – P. 79–86.
- [28] Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurans metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation / I. Diblikova, K.M. Cooper, D.G. Kennedy, M. Franek // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – **540**, № 2. – P. 285–292.
- [29] Residues of nitrofurans antibiotic parent compounds and metabolites in eyes of broiler chickens / K.M. Cooper, R.J. McCracken, M. Buurman, D.G. Kennedy // *Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess.* – 2008. – **25**, № 5. – P. 548–556.
- [30] Bock C., Stachel C., Gowik P. Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the software InterVal // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – **586**, № 1-2. – P. 348–358.
- [31] Botsoglou N.A. Determination of furazolidone in eggs by high-performance liquid-chromatography // *Agricult. Food Chem.* – 1988. – **36**, № 6. – P. 1224–1227.
- [32] Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J.K. Finzi, J.L. Donato, M. Sucupira et al. // *J. Chromatogr. B: Biomed. Life Sci.* – 2005. – **824**, № 1-2. – P. 30–35.

- [33] *Quantitative* determination of four nitrofuran metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry / P. Mottier, S.P. Khong, E. Gremaud et al. // *J. Chromatography A*. – 2005. – **1067**, № 1-2. – P. 85–91.
- [34] *Isolation* of bound residues of nitrofuran drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection / A. Conneely, A. Nugent, M. O’Keeffe et al. // *Anal. Chim. Acta*. – 2003. – **483**, № 1-2. – P. 91–98.
- [35] *Rodziewicz L.* Determination of nitrofuran metabolites in milk by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2008. – **867**, № 1-2. – P. 156–160.

References

- [1] R. Draisci *et al.*, “Determination of nitrofuran residues in avian eggs by liquid chromatography UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography ionspray mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, vol. 777, no. 1, pp. 201–211, 1997. doi: 10.1016/S0021-9673(97)00247-1
- [2] Commission Regulation (EC) No 1442/95 amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, *Official J. Europ. Commun.*, L143, pp. 26–30, Rep. (EC) No 1442/95, June 1995. Available: http://eulex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&numdoc=31995R1442&model=guichett&lg=en
- [3] D.R. Mccalla, “Mutagenicity of nitrofuran derivatives: Review,” *Environ. Molecular Mutagenesis*, vol. 5, no. 5, pp. 745–765, 1983. doi: 10.1002/em.2860050512
- [4] L.H. Vroomen *et al.*, “*In vivo* and *in vitro* metabolic studies of furazolidone: a risk evaluation”, *Drug Met. Rev.*, vol. 22, no. 6-8, pp. 663–676, 1990. doi: 10.3109/03602539008991460
- [5] J.E.M. van Koten-Vermeulen, “Report of the 40th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)”, World Health Organisation, Geneva, 85, 1993.
- [6] J.F.M. Nouws and J. Laurensen, “Postmortal degradation of furazolidone and furaltadone in edible tissues of calves”, *Vet. Quarterly*, vol. 12, no. 1, pp. 56–59, 1990. doi: 10.1080/01652176.1990.9694243
- [7] R.J. McCracken *et al.*, “Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues”, *Analyst*, vol. 120, pp. 2347–2351, 1995.
- [8] A. Leitner *et al.*, “Determination of the metabolites of nitrofuran antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, vol. 939, no. 1-2, pp. 49–58, 2001. doi: 10.1016/S0021-9673(01)01331-0
- [9] K.M. Cooper and D.G. Kennedy, “Stability studies of the metabolites of nitrofuran antibiotics during storage and cooking”, *Food Addit. Contam.*, vol. 24, no. 9, pp. 935–942, 2007. doi: 10.1080/02652030701317301
- [10] R.J. McCracken and D.G. Kennedy, “Detection, accumulation and distribution of nitrofuran residues in egg yolk, albumen and shell”, *Food Addit. Contam.*, vol. 24, no. 1, pp. 26–33, 2007. doi: 10.1080/02652030600967214
- [11] E. Verdon *et al.*, “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”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 586, no. 1-2, pp. 336–347, 2007. doi: 10.1016/j.aca.2007.01.024
- [12] L. Rodziewicz and I. Zawadzka, “Determination of nitrofuran metabolite residues in animal tissues by LC-MS/MS method”, *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, vol. 58, no. 4, pp. 625–632, 2007.
- [13] K.M. Cooper *et al.*, “Enzyme immunoassay for semicarbazide – the nitrofuran metabolite and food contaminant”, *Anal. Chim. Acta.*, vol. 592, no. 1, pp. 64–71, 2007. doi: 10.1016/j.aca.2007.04.013
- [14] S. Szilagyi and B. de la Calle, “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*, vol. 572, no. 1, pp. 113–120, 2006. doi: 10.1016/j.aca.2006.05.012
- [15] M. Vass *et al.*, “In-house validation of an ELISA method for screening of semicarbazide in eggs”, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess*, vol. 25, no. 8, pp. 930–936, 2008. doi: 10.1080/02652030701883203
- [16] P.S. Chu and M.I. Lopez, “Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans”, *J. Agricult. Food Chem.*, vol. 53, no. 23, pp. 8934–8939, 2005. doi: 10.1021/jf051615o
- [17] K.M. Cooper *et al.*, “Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissuebound metabolite of the nitrofuran furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay”, *Food. Addit. Contam.*, vol. 21, no. 9, pp. 841–848, 2004. doi: 10.1080/02652030412331272476

- [18] A. Roychowdhury *et al.*, “Emergence of tetracyclineresistant *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba, in Kolkata, India”, *Jpn J. Infect. Dis.*, vol. 61, no. 2, pp. 128–129, 2008.
- [19] A. Conneely *et al.*, “Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues”, *Analyst*, vol. 127, no. 6, pp. 705–709, 2002.
- [20] R.J. McCracken *et al.*, “Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) in eggs”, *Food Addit. Contam.*, vol. 18, no. 11, pp. 954–959, 2001. doi: 10.1080/02652030110050375
- [21] R.J. McCracken and 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”, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, vol. 691, no. 1, pp. 87–94, 1997.
- [22] R.J. McCracken and 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 Addit. Contam.*, vol. 14, no. 5, pp. 507–513, 1997. doi: 10.1080/02652039709374558
- [23] E. Horne *et al.*, “Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry”, *Analyst*, vol. 121, no. 10, pp. 1463–1468, 1996.
- [24] K.M. Cooper and D.G. Kennedy, “Nitrofurantoin metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs – a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurantoin abuse”, *Analyst*, vol. 130, no. 4, pp. 466–468, 2005. doi: 10.1039/B418374F
- [25] C. Bock *et al.*, “Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS”, *J. Chromatogr. B*, vol. 856, no. 1-2, pp. 178–189, 2007. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.05.044
- [26] T.G. Diaz *et al.*, “Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection”, *J. Chromatogr. A*, vol. 764, no. 2, pp. 243–248, 1997. doi: 10.1016/S0021-9673(96)00899-0
- [27] K.M. Cooper *et al.*, “Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurantoin furazolidone”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 520, no. 1-2, pp. 79–86, 2004. doi: 10.1016/j.aca.2004.05.074
- [28] I. Diblikova *et al.*, “Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurantoin metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 540, no. 2, pp. 285–292, 2005. doi: 10.1016/j.aca.2005.03.039
- [29] K.M. Cooper *et al.*, “Residues of nitrofurantoin parent compounds and metabolites in eyes of broiler chickens”, *Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess.*, vol. 25, no. 5, pp. 548–556, 2008. doi: 10.1080/02652030701586657
- [30] C. Bock *et al.*, “Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurants in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the software InterVal”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 586, no. 1-2, pp. 348–358, 2007. doi: 10.1016/j.aca.2006.11.001
- [31] N.A. Botsoglou, “Determination of furazolidone in eggs by high-performance liquid-chromatography”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 36, no. 6, pp. 1224–1227, 1988. doi: 10.1021/jf00084a024
- [32] J.K. Finzi *et al.*, “Determination of nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 824, no. 1-2, pp. 30–35, 2005. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.05.012
- [33] P. Mottier *et al.*, “Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1067, no. 1-2, pp. 85–91, 2005. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.160
- [34] A. Conneely *et al.*, “Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 483, no. 1-2, pp. 91–98, 2003. doi: 10.1016/S0003-2670(02)01023-1
- [35] L. Rodziewicz, “Determination of nitrofurantoin metabolites in milk by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 864, no. 1-2, pp. 156–160, 2008. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.01.008

О.М. Іванова, О.Ю. Галкін

ПОРІВНЯЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ І БІОХІМІЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТІВ НІТРОФУРАНІВ У ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ

Проблематика. Нітрофурани – синтетичні антибіотики, що широко використовуються в різних галузях тваринництва за рахунок їх високої ефективності у боротьбі з інфекційними захворюваннями та як активатор росту. Нітрофурани – сполуки, що швидко метаболізують, однак метаболіти цих препаратів здатні зв'язуватись із білковими структурами та накопичуватись в ор-

ганізмі тварин. Метаболіти нітрофуранів проявляють канцерогенні властивості, а тому необхідно контролювати їх вміст у харчових продуктах тваринного походження.

Мета дослідження. Мета роботи – узагальнити сучасні методи аналізу нітрофуранів.

Методика реалізації. Систематизовано і проаналізовано сучасні методи пробопідготовки харчових продуктів тваринного походження для вилучення метаболітів нітрофуранів і методи детектування цих аналітів.

Результати дослідження. Сучасні методи аналізу мають достатній рівень чутливості визначення нітрофуранів у вигляді кінцевих продуктів – метаболітів фуралтадону та фуразолідону. Існує декілька методів детектування, серед яких вирізняють хроматографічні методи та імуноферментний аналіз.

Висновки. Аналіз літературних даних показав, що використання комбінованих методик, які поєднують селективне вилучення метаболітів нітрофуранів із матриці зразка та їх кількісне визначення, дає змогу проводити скринінг і підтверджуючий аналіз на наявність нітрофуранів у продуктах харчування, а також детектувати аналіти на рівні 1 мкг/кг.

Ключові слова: нітрофурані; пробопідготовка зразка; метаболіти нітрофуранів; методи детектування нітрофуранів.

О.М. Иванова, А.Ю. Галкин

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ НИТРОФУРАНОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Проблематика. Нитрофураны – синтетические антибиотики, которые широко используются в различных отраслях животноводства за счет их высокой эффективности в борьбе с инфекционными заболеваниями и как активатор роста. Нитрофураны – соединения, быстро метаболизирующиеся, однако метаболиты данных препаратов способны связываться с белковыми структурами и накапливаться в организме животных. Метаболиты нитрофуранов проявляют канцерогенные свойства, поэтому необходимо контролировать их содержание в пищевых продуктах животного происхождения.

Цель исследования. Цель работы – обобщить современные методы анализа нитрофуранов.

Методика реализации. Систематизированы и проанализированы современные методы пробоподготовки пищевых продуктов животного происхождения для извлечения метаболитов нитрофуранов и методы детектирования данных аналитов.

Результаты исследования. Современные методы анализа обладают достаточным уровнем чувствительности определения нитрофуранов в виде конечных продуктов – метаболитов фуралтадона и фуразолидона. Существует несколько методов детектирования, среди которых выделяют хроматографические методы и иммуноферментный анализ.

Выводы. Анализ литературных данных показал, что использование комбинированных методик, сочетающих селективное удаление метаболитов нитрофуранов с матрицы образца и их количественное определение, позволяет проводить скрининг и подтверждающий анализ на наличие нитрофуранов в продуктах питания, а также детектировать аналиты на уровне 1 мкг/кг.

Ключевые слова: нитрофураны; пробоподготовка образца; метаболиты нитрофуранов; методы детектирования нитрофуранов.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Надійшла до редакції
07 квітня 2017 року