გოცირიძე დ[2]., ბარამიძე ქ[1]., ჩიკვილაძე თ[2],. ოთარაშვილი თ[2]., იორამაშვილი ჰ[2].

თევზის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების განსაზღვრის სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის შემუშავება და ვალიდაცია

“გლობალტესტი”-ს საგამოცდო ლაბორატორია, თსსუ ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი

https://doi.org/10.52340/csw.2020.01.417

ნიტროფურანები მიეკუთვნება ფართო სპექტრის სინთეზური ანტიბიოტიკების ჯგუფს, რომლებიც ეფექტურად გამოიყენება ისეთი გასტროინერსტინალური ინფექციების პრევენციისთვის და სამკურნალოდ, რომელთა გამომწვევებია *Escherichia coli, Salmonlella spp., Mycoplasma spp., Coccidia spp.,* კოლიფორმები და პროტოზოები, რომლებიც გვხვდება ცხოველურ პროდუქტებსა და წყალში.

ევროკავშირში შეზღუდულია ოთხი ძირითადი ნიტროფურანის - ფურაზოლიდონი, ფურალტადონი, ნიტროფურანტოინი და ნიტროფურაზონის ვეტერინარული პრეპარატების სახით გამოყენება მათი ტოქსიკური, კანცეროგენული და მუტაგენური თვისებების გამო.

2003 წლის რეგულაციით, ევროკავშირში, ფრინველებსა და ზღვის პროდუქტებში, აღნიშნული ოთხი ნიტროფურანის ზღვრული დასაშვები ნორმა (MRPL - Minimum Requried Performance Regulation 1442/95) შეადგენს 1 მკგ/კგ (Commission Decision 2003/181/EC) [3,4].

დღევანდელი მდგომარეობით, ევროკავშირში ნიტროფურანების უკანონო გამოყენება კონტროლდება ოფიციალური საინსპექციო და ანალიზური სამსახურების მიერ ევროსაბჭოს 96/23/ EC დირექტივის მოთხოვნების შესაბამისად.

გამომდინარე იქედან, რომ მონიტორინგის ამ პროცესში ჩართულ ლაბორატორიებს საკმაოდ მცირე დროში უხდებათ დიდი მოცულობის სამუშაოს შესრულება, მუშაობის ეფექტურობის გაზრდის მიზნით შეუძლიათ სკრინინგ მეთოდების გამოყენება, თუმცა, სკრინინგ მეთოდით დადებითი შედეგის მიღების შემთხვევაში, შედეგი უნდა დადასტურდეს შესაბამისი ინსტრუმენტული მეთოდთ.

ექსპორტის ინტერესიდან გამომდინარე, მესამე ქვეყნები იძულებული არიან მიიღონ ევროსაბჭოს მიერ დადგენილი MRPLda ამდენად, მიაღწიონ იმავე ზღვარს, რაც აქვთ ევროკავშირის ლაბორატორიებს [5].

ევროკომისიის გადაწყვეტილება, რომელიც ადგენს MRPL, გამორიცხავს არადამაკმაყოფილებელი მეთოდების გამოყენებას, რომელთა მეშვეობით არ შეიძლება ნიტროფურანების მეტაბოლიტების ძალიან დაბალი კონცენტრაციების განსაზღვრა, ანუ მეთოდი უნდა იძლეოდეს საშუალებას, რაოდენობრივად იქნას განსაზღვრული ნიტროფურანების მეტაბოლიტების 1 მკგ/კგ კონცენტრაცია.

ევროსაბჭოს მიერ დადგენილი მკაცრი რეგულაციების და ანალიზური მეთოდების ვალიდაციის მიმართ განსაზღვრული მოთხოვნების გათვალისწინებით საკვებ პროდუქტში ნიტროფურანების ნარჩენების განსაზღვრისთვის მაღალმგრძნობიარე და სპეციფიური ანალიზის მეთოდების შემუშავება სულ უფრო რთული ამოცანა ხდება [2,3,6,7,8,9,10].

ევროკავშირის მოთხოვნების გათვალისწინებით, მეცხოველეობაში ნიტროფურანების გამოყენება რეგულირდება საქართველოს კანონმდებლობითაც, კერძოდ, საქართველოს მთავრობის №499 დადგენილებით დამტკიცებულია ტექნიკური რეგლამენტი – ცოცხალ

ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების გამოკვლევისათვის ანალიზის მეთოდების განხორციელებისა და შედეგების ინტერპრეტაციის წესი [1], რომელიც საკმაოდ მკაცრ მოთხოვნებს უყენებს ანიშნული მიზნით გამოყენებულ ანალიზურ მეთოდებს.

კვლევის მიზანი:

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ცხოველური წარმოშობის საკვებ პროდუქტში, კერძოდ, თევზის ნიმუშში, ნიტროფურანების ნარჩენების განსაზღვრის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდის შემუშავება, შემუშავებული მეთოდის საშუალებით ნარჩენების განსაზღვისთვის ექსტრაგირების კოეფიციენტის გამოთვლა და შემუშავებული მეთოდის ვალიდაცია საქართველოს მთავრობის №499 დადგენილების მოთხოვნების შესაბამისად.

კვლევის მასალა და მეთოდი:

კვლევის მასალას წარმოადგენდა ფურაზოლიდონის (AOZ), ფურალტადონის (AMOZ), ნიტროფურანტოინის (AHD), ნიტროფურაზონის (SEM) სტანდარტული ნიმუშები და თევზის ნიმუში, რომელშიც კვლევის დაწყებამდე შეტანილი იყო ნიტროფურანების ცნობილი რაოდენობები.

კვლევა განხორციელდა სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდით, დიოდური დეტექტორის გამოყენებით 376 ნმ-ზე, ხარისხის საერთაშორისო standartebis (ISO 17025, ICH Q 2 A) მოთხოვნების შესაბამისად, ვალიდაციის შემდეგი მახასიათებლების მიხედვით: სპეციფიურობა, სიზუსტე, სისწორე და სწორხაზოვნება.

კვლევა წარმოებდა ხელსაწყოზე «Agilent 1260», რომლის ტექნიკური და საექსპლოატაციო მახასიათებლები მთლიანად შეესაბამება აშშ, ბრიტანეთის და ევროპის ფარმაკოპეების მოთხოვნებს და დამოწმებულია სსიპ "სტანდარტების, ტექნიკური რეგლამენტებისა და მეტროლოგიის ეროვნული სააგენტო"-ს მიერ.

ექსპერიმენტული ნაწილი:

აღმოსაჩენი მინიმუმის დასადგენად ჩატარდა 3-3 პარალელური ცდა საკვლევი ნივთიერებების კლებად კონცენტრაციებზე.

სპეციფიურობის განსაზღვრისათვის, საკვლევ სტანდარტულ ნიმუშებზე ჩატარდა 6-6 პარალელური ცდა. დადგენილ იქნა, რომ ნიტროფურანების ჯგუფის საკვლევი ნივთიერებებისთვის სპეციფიურია 376 ნმ სიგრძის ტალღა;

სიზუსტის განსაზღვრისას მიღებული შედეგების მნიშვნელობები ახლოს არის ერთმანეთთან;

სისწორის გამოსათვლელად გამოყენებულ იქნა თევზის ნიმუში, რომელშიც შეტანილი იყო საკვლევი ნიტროფურანების ცნობილი რაოდენობა.

სწორხაზოვნების განსაზღვრისათვის გამოყენებულ იქნა საკალიბრო ხსნარები 0,03 მკგ/მლ, N0,05 მკგ/მლ, N0,1 მკგ/მლ, N1 მკგ/მლ, N3 მკგ/მლ, 5 მკგ/მლ და შესამოწმებელი ხსნარი - 0,5 მკგ/მლ. თითოეული ხსნარის ქრომატოგრაფირება ჩატარდა სამჯერ, განისაზღვრა შეკავების დრო და

საკალიბრო მახასიათებელი პარამეტრები.

გამოსავლის და ექსტრაგირების კოეფიციენტის განსაზღვრისათვის გამოყენებულ იქნა სინჯი, რომელშიც შეტანილი იყო საკვლევი ნივთიერებების ცნობილი რაოდენობები. სინჯის ანალიზის დაწყებამდე ნიმუშის წონაკებს (10გ) ემატებოდა 1 მკგ/მლ კონცენტრაციის საკალიბრო ხსნარის (ოთხივე საკვლევი ნიტროფურანის ნარევი) 0,5 მლ. ნიმუშები მომზადდა ყველა ოპერაციის გათვალისწინებით (ექსტრაგირება, ექსტრაქტის გასუფთავება) და ჩატარდა მიღებულ გამონაწვლილში საკვლევი ნივთიერებების რაოდენობრივი განსაზღვრა ჩვენ მიერ ვალიდირებული ქრომატოგრაფიული მეთოდით.

კვლევის შედეგები:

ცხრილი #1. სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაციის შედეგები

საკვლევი ნიმუში	ვალიდირებული პარამეტრი					
	აღმოსაჩენი მინიმუმი	სპეციფიურობა	სიზუსტე %CV	კორელაციის კოეფიციენტი	სწორხაზოვნების დიაპაზონი მკგ/მლ	სისწორე %CV
ნიტროფურაზონი	0,03 მკგ/კგ	1. სპეციფიურია 376 ნმ სიგრძის ტალღა; 2. მობილური ფაზის და გამხსნელის სიგნალი ნიტროფურანების შეკავების დროის ფარგლებში არის ნულთან ახლოს; 3. ერთი სამუშაო დღის განმავლობაში მიღებული შედეგების სპეციფიურობის ვარიაციის კოეფიციენტი ნიტროფურაზონი -0,17, ფურანტოინი - 0,02, ფურაზოლიდონი - 0,03 და ფურალტადონი - 0,07; ერთი სამუშაო კვირის განმავლობაში მიღებული შედეგების სპეციფიურობის ვარიაციის კოეფიციენტი ნიტროფურაზონი - 0,26, ფურანტოინი - 0,02, ფურაზოლიდონი - 0,02 და ფურალტადონი - 0,14	0,01; 0,17; 0,83	0,999	0,03 - 1 1 - 5	0,43
ნიტროფურანტოინი			0,02; 0,18; 0,28	0,999		0,43
ფურაზოლიდონი			0,03; 0,25; 0,56	0,999		0,42
ფურალტადონი			0,07; 0,48; 0,66	0,999		0,54
კრიტერიუმი	MRPL 0,3 მკგ/კგ	CV≤2%	CV≤2 %	> 0,99	------	CV≤2%

ცხრილი 2. თევზის ნიმუშში ნიტროფურანების განსაზღვრის შედეგები სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდით

საკვლევი ნიმუში	მატრიცა	გამოსავალი %	ექსტრაგირების კოეფიციენტი	გაზომვის ჯამური განუსაზღვრელობაU∑	გაზომვის გაფართოებული განუსაზღვრელობაU0,95	აღმოსაჩენი მინიმუმი(LOD)	მატრიცაში განსაზღვრის დიაპაზონი (მკგ/მლ)
ნიტროფურაზონი	თევზი	93,4	0,9	0,038	0,076	0,03 მკგ/მლ	0,005 – 1მკგ/მლ 1 - 5 - მკგ/მლ
ნიტროფურანტოინი	`-----~	92,2	0,9	0,034	0,068	0,03 მკგ/მლ	` ----- ~
ფურაზოლიდონი	`-----~	93,53	0,9	0,031	0,062	0,03 მკგ/მლ	` ----- ~
ფურალტადონი	`-----~	95,2	0,9	0,036	0,072	0,03 მკგ/მლ	` ----- ~

დასკვნა:

შემუშავებულია მგრძნობიარე, აღწარმოებადი, ზუსტი და ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდი თევზის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის;
შემუშავებული სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაციის შედეგად დადგინდა მეთოდის სრული შესაბამისობა Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001-ის მოთხოვნებთან შემდეგი ვალიდაციური მახასიათებლების მიხედვით: აღმოსაჩენი მინიმუმი, სპეციფიურობა, სიზუსტე, სისწორე და სწორხაზოვნება.

რეზიუმე

გოცირიძე დ[2]., ბარამიძე ქ[1]., ჩიკვილაძე თ[2],. ოთარაშვილი თ[2]., იორამაშვილი ჰ[2].

თევზის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების განსაზღვრის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდის შემუშავება და ვალიდაცია

[1]„გლობალტესტი“-ს საგამოცდო ლაბორატორია, [2]თსსუ ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი

შემუშავებულია მგრძნობიარე, ზუსტი და ეფექტური სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდი თევზის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის;

დადგენილ იქნა, რომ ნიტროფურანების ჯგუფის ოთხივე საკვლევი ნივთიერებისთვის ვარიაციის კოეფიციენტი 0,03 მკგ/მლ-დან არის <2%-ზე, შესაბამისად აღმოსაჩენ მინიმუმად ჩაითვალა 0,03 მკგ/მლ;

ნიტროფურანების ჯგუფის საკვლევი ნივთიერებებისთვის სპეციფიურია 376 ნმ სიგრძის ტალღა;

თევზის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის შემუშავებული სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაციის შედეგად დადგინდა მეთოდის სრული შესაბამისობა Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001-ის მოთხოვნებთან შემდეგი ვალიდაციური მახასიათებლების მიხედვით: აღმოსაჩენი მინიმუმი, სპეციფიურობა, სიზუსტე, სისწორე და სწორხაზოვნება.

Summary

Gotsiridze D.,[1] Baramidze K.,[2] Chikviladze T.,[1] Otarashvili T.,[1] Ioramashvili H.[1]

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF NITROFURAN RESIDUES IN FISH SAMPLES

[1]TSMU, DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL AND TOXICOLOGICAL CHEMISTRY;
[2]“GLOBALTEST”, LLC, TESTING LABORATORY;

Sensitive, accurate and efficient Liquid Chromatographic Method is developed for quantitative determination of Nitrofuran residues in fish samples.

It was found that the coefficient of variation for all four test substances of the Nitrofuran group is from 0.03 µg / ml is less than 2%, respectively the detection minimum was considered to be 0.03 µg / ml 376 nm wavelength is specific for Nitrofurans.

For the quantification of nitrofuran residues in a fish sample validation of the developed Liquid Chromatographic Method revealed complete compliance of the method (Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001) with the following validation characteristics of the requirements: detection minimum, specificity, accuracy, correctness and linearity.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. საქართველოს მთავრობის დადგენილება #499 `ტექნიკური რეგლამენტი – ცოცხალ ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების გამოკვლევისათვის ანალიზის მეთოდების განხორციელებისა და შედეგების ინტერპრეტაციის წესი~. 08.11.2016.
2. Commission Decision (2002): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Coun-cil directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation

of results. Official Journal of the European Communities, L221, 8–36. http://faolex.fao.org/docs/pdf/eur49615.pdf;

3. Commission Decision (2003): Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. Official Journal of the European Com-munities, L71, 17–18. http://eur-lex.europa.eu/pri/en/ oj/dat/2003/l_071/l_07120030315en00170018.pdf;
4. Commission Directive (2004): Commission Directive 2004/1/EC of 6 January 2004 amending Directive 2002/72/EC as regards the suspension of the use of azodicarbonamide as blowing agent. Official Journal of the European Communities, L7, 45–46. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2 004:007:0045:0046:EN:PDF;
5. Kennedy G. (2004): Analytical methods for nitrofurans: Lessons to be learned and new developments. In: Joint FAO/WHO Technical Workshop on Residues of Vet-erinary Drugs without ADI/MRL, Bangkok, Thailand, 87–91. http://www.fao.org/docrep/008/y5723e/ y5723e0n.htm#bm23;
6. USP 40 NF 35, <197>, <851> (2019)
7. European Pharmacopoea 8Ed (2019)
8. РУКОВОДСТВО по валидации методик анализа лекарственных средств. Под редакцией: Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А.Малина; (2016)
9. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May, 2001;
10. ICH Q2 A (CPMP/ICH/381/95), Validation of analytical procedure: Methodology, London UK, 1997.