

თაფლში ნიტროფურანების ნარჩენების განსაზღვრის სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის შემუშავება და ვალიდაცია

გოცირიძე დ², ბარამიძე ქ¹, ჩიკვილაძე თ², ოთარაშვილი თ², თ., იორამაშვილი ჰ²

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

<https://doi.org/10.52340/csw.2022.05.927>

რეზიუმე

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

დადგენილ იქნა, რომ ნიტროფურანების ჯგუფის ოთხივე საკვლევი ნივთიერებისთვის აღმოსაჩენი მინიმუმი არის 0,03 მკგ/მლ, სპეციფიურია 376 ნმ სიგრძის ტალღა, სპეციფიურობის ვარიაციის კოეფიციენტი როგორც ერთი სამუშაო დღის ასევე ერთი სამუშაო კვირის განმავლობაში <2%-ზე, სიზუსტე სამი სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარისთვის <2%-ზე, მეთოდის სისწორე ოთხივე საკვლევი ნივთიერებისთვის <2%-ზე, რაც მიუთითებს ანალიზური მეთოდებისადმი წაყენებული კრიტერიუმების მიმართ მეთოდის სპეციფიურობის შესაბამისობაზე;

ნიტროფურანების ჯგუფის საკვლევი ნივთიერებებისთვის საკალიბრო გრაფიკი სწორხაზოვანია 0,03მკგ/მლ – 1 მკგ/მლ - 1 – 5 მკგ/მლ დიაპაზონში და მისაღებია, რამდენადაც კორელაციის კოეფიციენტი ყველა შემთხვევაში არის > 0,999 (>0,99);

სინჯების მომზადება დამაკმაყოფილებელია, რადგან მიღებული გამოწვლილვის კოეფიციენტი >0,6-ზე.

ამდენად, თაფლის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის შემუშავებული სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაციის შედეგად დადგინდა მეთოდის სრული შესაბამისობა საქართველოს მთავრობის დადგენილება #499-is, 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.

ნიტროფურანები ვეტერინარული ანტიბიოტიკების კლასია, რომელიც 1950 წლიდან გამოიყენება ცხოველების ზრდის დასაჩქარებლად, სხვადასხვა დაავადების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისთვის.

ნიტროფურანები ფართო სპექტრის ანტიბაქტერიული საშუალებებია, ამიტომ ფართოდ გამოიყენება მეფუტკრეობაშიც, ფუტკრის ოჯახების ბაქტერიული დაავადებების სამკურნალოდ. შედეგად, ეს ანტიბიოტიკები და მათი მეტაბოლიტები ხშირად გვხვდება თაფლში.

ნიტროფურანები არასტაბილურია და ადვილად მეტაბოლიზდება რამდენიმე საათის განმავლობაში, მეტაბოლიტები კი საკმაოდ მდგრადია. ამიტომ, კვლევა ძირითადად მიმდინარეობს არა მხოლოდ ნიტროფურანების არამედ ძირითადად მათი მეტაბოლიტების არსებობის დასადგენად.

ნიტროფურანების მეტაბოლიტები ადამიანის ორგანიზმში არღვევს ელექტროლიტურ ბალანსს, თრგუნავს ღვიძლის ფერმენტების აქტივობას, იწვევს კარდიომიოპათიას, ამცირებს პლაზმაში ცილის დონეს, იწვევს ანემიას, ახასიათებს კანცეროგენული და მუტაგენური მოქმედება. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ნიტროფურანები კვების პროდუქტების წარმოებაში აკრძალულია ავსტრალიაში (1993 წ.), ევროკავშირში (1995 წ.), ფილიპინებში (2001 წ.), აშშ-ში (2002 წ.), ბრაზილიაში (2002 წ.), ტაილანდში (2002 წ.) და სხვა ქვეყნებში [1].

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

დღევანდელი მდგომარეობით, ევროკავშირში ნიტროფურანების უკანონო გამოყენება კონტროლდება ოფიციალური საინსპექციო და ანალიზური სამსახურების მიერ ევროსაბჭოს 96/23/ EC დირექტივის [2] მოთხოვნების შესაბამისად.

ევროკავშირის მოთხოვნების გათვალისწინებით, მეცხოველეობაში ნიტროფურანების გამოყენება რეგულირდება საქართველოშიც, კერძოდ, პროდუქტის უსაფრთხოების და თავისუფალი მიმოქცევის კოდექსის 56-ე მუხლის პირველი ნაწილის, 58-ე მუხლის მე-2 ნაწილისა და სურსათის/ცხოველის საკვების უვნებლობის, ვეტერინარიისა და მცენარეთა დაცვის კოდექსის 75-ე მუხლის მე-2 ნაწილის შესაბამისად:

საქართველოს მთავრობის №567 (09.11.2015) დადგენილებით დამტკიცებულია “სურსათში ზოგიერთი დამაბინძურებლის (კონტამინანტის) მაქსიმალურად დასაშვები ზღვრის შესახებ“ ტექნიკური რეგლამენტი, რომელიც ამოქმედდა 2016 წლის 1 ივლისიდან [3];

საქართველოს მთავრობის №639(18.12.2015) დადგენილებით დამტკიცებულია ტექნიკური რეგლამენტი “ფარმაკოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების, მათი კლასიფიკაციისა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ნარჩენების მაქსიმალური ზღვრის შესახებ“, რომელიც ამოქმედდა 2016 წლის პირველი ივლისიდან [4].

საქართველოს მთავრობის №22(18.01.2016) დადგენილებით დამტკიცებულია “ტექნიკური რეგლამენტი – ცოცხალ ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების მონიტორინგის წესი“ [5].

საქართველოს მთავრობის №499 (08.11.2016) დადგენილებით დამტკიცებულია ტექნიკური რეგლამენტი – ცოცხალ ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების გამოკვლევისათვის ანალიზის მეთოდების განხორციელებისა და შედეგების ინტერპრეტაციის წესი, რომელიც ამოქმედდა 2019 წლის 1 იანვრიდან [6].

ნიტროფურანების მეტაბოლიტების კონცენტრაციის დაბალი დონე და თავლის, როგორც მატრიცის რთული შემადგენლობა სერიოზულ სირთულეს ქმნის ამ ნივთიერებათა დეტექტირებისთვის.

ამიტომ, ნიტროფურანების და მათი მეტაბოლიტების ანალიზის მეთოდი უნდა უზრუნველყოფდეს ამ მეტაბოლიტების მინიმალური კონცენტრაციის აღმოჩენას და დაყოფას.

კვლევის მიზანი:

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა თავლის ნიმუშში, ნიტროფურანების ნარჩენების განსაზღვრის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდის შემუშავება, შემუშავებული მეთოდის საშუალებით ნარჩენების განსაზღვრისთვის ექსტრაგირების კოეფიციენტის გამოთვლა და შემუშავებული მეთოდის ვალიდაცია საქართველოს მთავრობის №499 დადგენილების მოთხოვნების შესაბამისად.

კვლევის მასალა და მეთოდი:

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

კვლევა განხორციელდა სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდით, დიოდური დეტექტორის გამოყენებით 376 ნმ-ზე, ხარისხის საერთაშორისო სტანდარტების (ISO 17025, ICH Q 2 A) მოთხოვნების შესაბამისად, ვალიდაციის შემდეგი მახასიათებლების მიხედვით: აღმოსაჩენი მინიმუმი, სპეციფიურობა, სიზუსტე, სისწორე და სწორხაზოვნება [7,8,9].

განისაზღვრა აგრეთვე გამოსავალის და ექსტრაგირების კოეფიციენტები.

ექსპერიმენტული ნაწილი:

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

სპეციფიურობის განსაზღვრად, საკვლევ სტანდარტულ ნიმუშებზე ჩატარდა 6-6 პარალელური ცდა.

სიზუსტის განსაზღვრისას მიღებული შედეგების მნიშვნელობები ახლოს არის ერთმანეთთან; **სისწორის** გამოსათვლელად გამოყენებულ იქნა თავლის ნიმუში, რომელშიც შეტანილი იყო საკვლევი ნიტროფურანების ცნობილი რაოდენობა.

სწორხაზოვნების განსაზღვრისთვის 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 [5].

გამოსავალის და ექსტრაგირების კოეფიციენტის განსაზღვრისთვის 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. თაფლის ნიმუშში ნიტროფურანების სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდით განსაზღვრის შედეგები

საკვლევი ნიმუში	მატრიცა	გამოსავალი %	ექსტრაგირების კოეფიციენტი	G გაზომვის ჯამური განუსაზღვრელობა S_{Σ}	გაზომვის გაფართოებული განუსაზღვრელობა $S_{0,95}$	აღმოსაჩენი მინიმუმი (LOD)
ნიტროფურაზონი	თაფლი	90,7	0,9	0,037	0,075	0,03 მკგ/მლ
ნიტროფურანტონი	-----	91,1	0,9	0,034	0,068	0,03 მკგ/მლ
ფურაზოლიდონი	-----	91,40	0,9	0,033	0,066	0,03 მკგ/მლ
ფურალტადონი	-----	92,4	0,9	0,046	0,092	0,03 მკგ/მლ

ცხრილი 2. სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაციის შედეგები

საკვლევი ნიმუში	ვალიდირებული პარამეტრი					
	აღმოსაჩენი მინიმუმი	სპეციფიურობა	სიზუსტე %R _V	კვორელაციის კოეფიციენტი	სწორბაზონების დიაპაზონი მკგ/მლ	სისწორე %R _V
ნიტროფურაზონი	0,03 მკგ/მლ	1. სპეციფიურია 376 ნმ სიგრძის ტალღა; 2. მობილური ფაზის და გამსხნელის სიგნალი ნიტროფურანების შეკავების დროის ფარგლებში არის ნულთან ახლოს; 3. ერთი სამუშაო დღის და ერთი სამუშაო კვირის განმავლობაში მიღებული შედეგების სპეციფიურობის ვარიაციის კოეფიციენტები $\leq 2\%$.	0,01; 0,17; 0,83	0,999	0,03 - 1	0,43
ნიტროფურანტონი			0,02; 0,18; 0,28	0,999		0,43
ფურაზოლიდონი			0,03; 0,25; 0,56	0,999	1 - 5	0,42
ფურალტადონი			0,07; 0,48; 0,66	0,999	-	0,54
კრიტერიუმი	0,3 მკგ/მლ	CV \leq 2%	CV \leq 2%	>0,99	----- -	CV \leq 2%

დასკვნა:

შემუშავებულია მგრძობიარე, აღწარმოებადი, ზუსტი და ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდი თაფლის ნიმუშში ნიტროფურანების ნარჩენების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის;

შემუშავებული სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაციის შედეგად დადგინდა მეთოდის სრული შესაბამისობა საქართველოს მთავრობის დადგენილება #499-is, 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.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. 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 Communities, L71, 17–18;
2. Commission Decision (2002): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council 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. საქართველოს მთავრობის დადგენილება №567 “სურსათში ზოგიერთი დამაბინძურებლის (კონტამინანტის) მაქსიმალურად დასაშვები ზღვრის შესახებ“ 09.11.2015; საქართველოს მთავრობის დადგენილება №639 “ფარმაცოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების, მათი კლასიფიკაციისა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ნარჩენების მაქსიმალური ზღვრის შესახებ“ 18.12.2015;
4. საქართველოს მთავრობის დადგენილება №22 “ტექნიკური რეგლამენტი – ცოცხალ ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების მონიტორინგის წესი“ 18.01.2016;
5. 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;
6. USP NF 2021, <197>, <851> (2019)
7. 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;
8. ICH Q2 A (CPMP/ICH/381/95), Validation of analytical procedure: Methodology, London UK, 1997.

Summary

Gotsiridze D²., Baramidze K¹., Chikviladze T²., Otarashvili T²., Ioramashvili H.²,

Development and validation of liquid chromatographic method for the determination nitrofurans residues in honey.

¹“GlobalTest“ Examination Laboratory, ²TSMU Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

A sensitive, accurate and efficient liquid chromatographic method has been developed for determination of nitrofurans residues in a honey sample;

It was found that the detection minimum for all four nitrofurans group substances is 0.03 µg / ml, the specific wavelength is 376 nm, the specificity coefficient of variation for both on one working day and one working week is <2%, accuracy for solutions of three different concentrations is <2 %, The accuracy of the method for all four test substances is <2%, indicating the relevance of the method specificity to the criteria set for the analytical methods;

The caliber graph for nitrofurans group is linear in the range 0.03 µg / ml - 1 µg / ml - 1 - 5 µg / ml and is acceptable as long as the correlation coefficient in all cases is > 0.999 (> 0.99);

Sample preparation is satisfactory as the obtained sampling coefficient is > 0.6.

Thus, as a result of validation of the liquid chromatographic method developed for the quantitative determination of nitrofurans residues in the honey sample, the method was fully complied with the requirements of the Government of Georgia according to the following validation characteristics: detection minimum, specificity, accuracy, correctness and linearity. (#499, 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).

