

Contaminarea produselor alimentare cu reziduuri de antibiotice din clasa sulfonamidelor, un risc ce poate fi evitat

Contamination of food with residues of antibiotics in the sulphonamide class, risk can be avoided

Carmen Lidia Chițescu¹, Anca Nicolau²

¹S.C. Pasteur, Filiala Filipești, ²Universitatea Dunarea de Jos, Galați

Rezumat

Sulfadimetoxina, sulfametoxazolul, sulfaquinoxalina și sulfadiazinele sunt cele mai folosite sulfonamide în medicina veterinară. Dacă perioada de așteptare nu este respectată, produsele de origine animală pot fi contaminate cu reziduuri din aceste substanțe. Interesul pentru detectarea acestor reziduuri este foarte actual. În acest studiu este dezvoltată o metodă pentru analiza simultană a acestor patru substanțe în țesut muscular de pui, prin cromatografie de lichide de presiune înaltă.

Criteriile de validare ale metodei: specificitate, acuratețe, liniaritate, limite de detectie și cunatificare respecta recomandările Deciziei Comisiei Europene 2002/657/EC, și demonstrează că metoda poate detecta și cunatifica reziduuri din sulfonamidele amintite fără analiză prin spectrofotometrie de masă sau derivatizarea fluorescența a analitelor. Totodată, metoda este simplă și economică.

Sulfonamidele au fost extrase din matricea biologică cu acetonitril, acetona și diclormetan. Îndepărtarea grasimilor s-a realizat prin extracție cu n-hexan.

Separarea cromatografică s-a realizat cu ajutorul unei coloane de separare tip C18, folosind o fază mobilă compusă din 75:25 = di-natriumhydrogenphosphat soluție 6 g/ 1000 ml (pH = 8.5) : metanol.

Detectorul UV a fost setat la 254 nm. Curbele de calibrare arată o bună liniaritate, pe domeniul de concentrație 0.320 la 1.5 μg /mL. Limita de cuantificare (LOQ) este sub ½ MRL, iar coeficientul de recuperare pentru matrice îmbogățită în intervalul 50-150 μg/kg, este mai mare de 70%. Coeficientul de variație al repetabilității pe domeniul de concentrație 50-150 μg /kg este de sub 15%.

Aplicabilitatea metodei a fost demonstrată.

Cuvinte cheie: sulfonamide, analiză HPLC, reziduuri, hipersensibilitate, perioada de așteptare.

Abstract

Sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline and sulfadiazine are the most common used sulfonamides in veterinary practice. The recommended withdrawal periods if not observed before slaughtering of the medicated animals, the products may obtain from such animals may be contaminated with residue. The interest in having reliable methods able to detect low amounts of sulfonamides in food is very actual. In this study, a multiresidue analysis was performed to simultaneously determine those four sulfonamides in chicken muscle tissue by the Waters LC.

Criteria of validation: specificity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification, and linearity, according to the European Commission Decision 2002/657/EC, show that the method can detect different kinds of sulfonamides within one run, without mass spectrometry analyses, or Fluor metric derivatization of analytes.

The method is accurate, simple, economical in both time and cost, capable of detecting sulfonamides residues below the maximum residue limits (MRL) and easy to perform to routine samples, in normal condition of laboratory.

The sulfonamides were extracted with acetonitrile and acetone and dichloromethane. N-hexane was added for defeating the sample. Separation was carried out on a Zorbax SB- C18 analytical column, using as mobile phase a mixture of 75:25 = di-natrium-hydrogenphosphat solution 6 g/1000 ml (pH = 8.5) : methanol.

The detection wavelength was set at: 254 nm Calibration graphs were linear with very good correlation coefficients in the concentration range from 0.320 to 1.5 μg /mL. The limits of quantification (LOQ) for the sulfonamides were in the range of 6.6–0.34 μg /kg. The recovery for spiked chicken muscle with 50–150 μg /kg ranged more than 70%. The relative standard deviation (RSDs) of the sulfonamides for six measurements at 50 μg/kg, 100 μg /kg and 150 μg /kg was less than 15%.

The applicability of the method to the analysis of chicken muscle tissue was demonstrated.

Cuvinte cheie: sulfonamides, HPLC analyses, residues, hypersensitivity, withdrawal times.

Introducere

Substanțele antibacteriene din clasa sulfonamidelor sunt folosite pe scară largă în medicina veterinară, în vederea menținerii stării de sănătate a efectivului de animale, datorită costului scăzut, ușurării în

administrare și eficacității lor. Înșă, odată cu utilizarea acestora a apărut posibilitatea introducerii de reziduuri din medicamentele folosite în lanțul alimentară.

Depășirea limitei maxime de reziduuri pentru sulfonamide este frecventă și astăzi în toată lumea (4, 5).

Cea mai mare depășire a nivelului legal de sulfonamide în țesuturi a fost raportată în 1970 în SUA, însă în ultimii 25 ani sulfonamidele au produs mai multe încălcări ale limitei maxime de reziduuri admise, decât oricare alt grup, cu incidența cea mai mare la porcine, urmată de bovine și pasări (2).

În 1988 într-un studiu făcut pe probe de lapte în America, 71% din probele testate din ferme și magazine au fost pozitive pentru antibiotice din care 63% au fost tetraciclina și sulfonamide (10).

Între 1992-1995 s-a înregistrat o depășire a nivelului maxim cu 2,2-5,4% în Elveția (Roland et al. 1996, cit. 18), cu 5,2-11,3 în UK (Kay and Penny, 1996, cit. 18), cu 0,2-1,3% în Canada (Neidert and Sachembrecker, 1996, cit. 18) și 0,3-5,6 în USA (18).

Un raport al Comisiei Europene din 2003 a indicat grupul sulfonamidelor ca fiind cel mai contaminant pentru produsele alimentare.

Nu întotdeauna cauza este nerespectarea timpului de așteptare la animalele tratate.

Cercetările au arătat că și cantitățile foarte mici 1g sulfametazina / tona de hrană produc reziduuri în ficat, 2 g sulfametazina / tona de hrană produc depășiri ale nivelului maxim admis în ficat iar 8 g sulfametazina / tona de hrană produc depășiri ale nivelului maxim admis în mușchi și peste 400 μg/kg în ficat (18).

Contaminarea hranei poate conduce asadar la prezența reziduurilor de sulfonamide în carne și organe. În 2003 o monitorizare a nivelului concentrației pentru diferite antibiotice în lapte au arătat că după antibioticele β-lactamice, cele mai multe depășiri ale încălcării nivelului maxim admis o au sulfonamidele, iar la monitorizarea antibioticelor în carne, sulfonamidele s-au situat pe locul trei după peniciline și tetraciclina. Studiul a fost realizat în America de FDA Milk Drug Residue, și FSIS Meat Residue Monitoring (10).

Cerintele și recomandările în ceea ce privește siguranța alimentară s-au schimbat de-a lungul anilor. Inițial producătorilor de medicamente veterinare li s-a impus conceptul de "zero reziduuri", iar timpul de așteptare impus era foarte mare. Metodele de analiză nu erau însă la fel de performante ca azi, așa încât limita "zero" era de fapt, limitele de detecție și cuantificare ale metodei (1).

Acest concept a fost imbrățișat atât de consumatori, cât și de politicieni, dar mai puțin de fabricanții de medicamente veterinare și de crescătorii de animale. Odată

cu îmbunătățirea metodelor analitice, limitele de toleranță au scăzut din ce în ce mai mult, obligând producătorii la perioade de așteptare foarte lungi.

Pentru a corecta această problemă s-a adoptat noțiunea de "toleranță neglijabilă".

În lumina acestei noi politici, datele cerute pentru aprobarea fabricației de medicamente se limitau la studii subcronice pe câini și soareci. În general limita de toleranță era fixată la 0,1 ppm în toate țesuturile comestibile (1).

La fel ca politica "toleranță zero" și politica "toleranță neglijabilă" nu era bazată pe analiza riscului medicamentului respectiv.

Această discordanță a fost remediată prin adoptarea de proceduri pentru analiza riscului, bazate pe studii de toxicologie, farmacocinetica.

În iunie 1990 în Europa Council Regulation (EEC) No 2377/90 adoptă procedura pentru stabilirea limitelor maxime de reziduuri în produsele alimentare de origine animală și MRL pentru aproximativ 80 substanțe (22).

Se definesc în lumina acestui regulament noțiunile de: reziduu și limită maximă de reziduuri (23).

Pe plan internațional, Codex Alimentarius Comision adoptă "Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs (CAC/RCP 38-1993)", "Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues on Foods" (CAC/GL 16-1993), "Codex Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs", precum și alte recomandări privitoare la monitorizarea reziduurilor, metodele oficiale de analiză, principii și ghiduri de analiză a riscului (24, 27, 29).

Totodată EMEA (European Medicines Agency) impune fabricanților de medicamente prin "Notice to applicants Veterinary medicinal products - 2004" efectuarea de teste de siguranță și reziduuri pentru fiecare produs medicamentos în parte, ținând cont nu numai de substanța activă ci și de formula farmaceutică și excipientii acestuia, determinarea timpului de așteptare și înscrierea acestor informații pe etichetă și prospectul produsului, transpus în practică prin Ordinul nr. 187/2007 din 31/10/2007, pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind Codul produselor medicinale veterinare (26).

În țara noastră Ordinul nr. 95 din 2 aprilie 2007, privind "Aprobarea Normei sanitare

veterinare și pentru siguranța alimentelor privind măsurile de supraveghere și control a unor substanțe și a reziduurilor acestora la animalele vii și la produsele de origine animală”, stabilește măsuri concrete pentru monitorizarea reziduurilor (25).

Prin definiție sulfonamidele sunt substanțe care conțin în molecula lor o grupare sulfanil și o grupare aminică.

Sulfonamidele antimicrobiene (sulfanilamidele) sunt derivați ai p-aminobenzen sulfonamidei substituiți la funcția amidică (N4) sau la funcția aminică (N1). Explicația biochimică a acțiunii antibacteriene o reprezintă similitudinea structurii chimice cu ac. paraaminobenzoic, care determină inhibiția competitivă a tetrahidroptericoic acid sintetazei bacteriene (fig. 1).

Această enzimă catalizează reacția dintre acidul paraaminobenzoic și dihidropterat fosfatul cu formarea acidului dihidroptericoic, care este transformat apoi în acid dihidrofolinic.

Acesta este redus la acid tetrahidrofolinic, esențial pentru diviziunea celulară a bacteriei, prin implicarea în sinteza purinei și pirimidinei.

Datorită unei bune liposolubilități, în general, absorbția sulfonamidelor se face aproape complet după 3-6 ore de la administrare (după administrare orală).

Pe măsura absorbției crește concentrația sulfamidei în sânge și se menține o perioadă mai mare sau mai mică la nivel terapeutic.

Biodisponibilitatea este între 80-100%, valorile mai mari fiind pentru administrarea parentală.

Distributia se face rapid în toate țesuturile și fluidele organismului, incluzând SNC, bila, lichid sinovial prin legarea cu proteinele plasmatică.

Oricum distribuția unei sulfonamide în mod individual depinde de mai mulți factori: constanta de disociere, liposolubilitatea substanței, capacitățile de legare cu proteinele (specifice speciei).

Concentrația plasmatică la mamifere este între 6-8.5g/dL.

Metabolizarea sulfonamidelor în organismul animal include conjugări la poziția N4 (grupări acetil, sulfat, acid glucuronic, glucoza) sau la poziția N1 (sulfat sau acid glucuronic), formarea de desaminometaboliti prin îndepărtarea grupării p-amino (hidroliza) și apoi conjugarea produsilor de hidroliza (9).

Reacțiile enzimatice care servesc metabolizării xenobioticelor sunt în general împărțite în două faze:

- **prima fază** a metabolismului implică monooxigenazele citocromului P450 care catalizează reacții de N- și C- hidroxilare.

Aceste enzime inserază atomi de oxigen în molecula substanței folosind electroni donati de NADPH via citocrom NADPH reductază. Sistemul enzimatic este localizat în membrana reticulului endoplasmatic și este alcătuit din mai multe componente proteice dintre care cea mai importantă este CYP 450 datorită rolului său în activarea oxigenului și legarea substratului.

Reacțiile catalizate de citocromul P450 sunt: hidroxilarea alifatică, hidroxilare aromatică (cu obținerea de obicei a unor produși fenolici), reacții de epoxidare și dezalchilare, desaminare, reducerea nitroderivatilor cu formarea anilinei, reacții de hidroliza;

- în **faza a doua** a metabolismului predomină reacțiile de conjugare cu compuși polari ca glutatationul, acidul glucuronic, acetil coenzima A, fosfoadenozilfosfat, cu participarea unor enzime ca: glutatationtransferazei, N-acetiltransferazei, etc, care realizează conjugarea în vederea eliminării xenobioticului din organism.

Din păcate, în timpul acestor reacții se formează compuși reactivi care cresc toxicitatea și carcinogenitatea sulfonamidelor.

În principal, metabolizarea sulfonamidelor în organismul animal se realizează cu concursul N-acetiltransferazei cu transformarea într-un compus acetilat netoxic.

Reacția de acetilare presupune inițial acetilarea enzimei, urmată de aditivarea substratului și apoi de transferul grupei acetil la substrat.

O parte din doză absorbită se metabolizează sub forma unor metaboliti hidroxilaminici reactivi implicați în reacțiile adverse și în toxicitatea acestor compuși.

Proportia metabolitelor este diferită de la o specie la alta. De exemplu, în timp ce la pasări doar 6-20 % din sulfonamide se metabolizează prin acetilare, la porc calea majoritară de biotransformare este acetilarea (5, 12, 16).

Excreția se face prin rinichi sub forma nemodificată sau metaboliti prin filtrare glomerulară.

Eliminarea sulfonamidelor este variabilă în timp, în funcție de compus, forma farmaceutică și specia animalului.

Totodată proporția de metaboliti și substanța netransformată eliminată este diferită de la specie la specie.

La păsări sulfonamidele se pot elimina și prin ouă, atât în albuș cât și în gălbenuș (16).

Deasemenea, laptele animalelor tratate conține reziduuri de sulfonamide (2).

Variația parametrilor farmacocinetici (timpul de înjumătățire, volumul distribuției, clearance, biodisponibilitate, etc) poate fi evaluată prin modelare matematică.

Efectul toxic pentru oameni se explică prin mecanismul de metabolizare a acestor substanțe.

Sulfonamidele sunt metabolizate în primul rând prin acelilare, însă în funcție de

capacitatea de acelilare a fiecărui organism (și aici se deosebesc fenotipul uman al acelilatorilor lenti și cel al acelilatorilor rapizi), o parte din cantitatea absorbită este metabolizată pe cale oxidativă prin intermediul citocromului CY450, la nivelul limfocitelor și microzomilor ficatului (figura 1).

Pe această cale se produc metaboliți hidroxilaminici și nitrozoderivați reactivi, toxici, identificați prin studii *in vivo*, în urina a unui grup de voluntari (subiecți umani sănătoși) tratați cu sulfametoxazol.

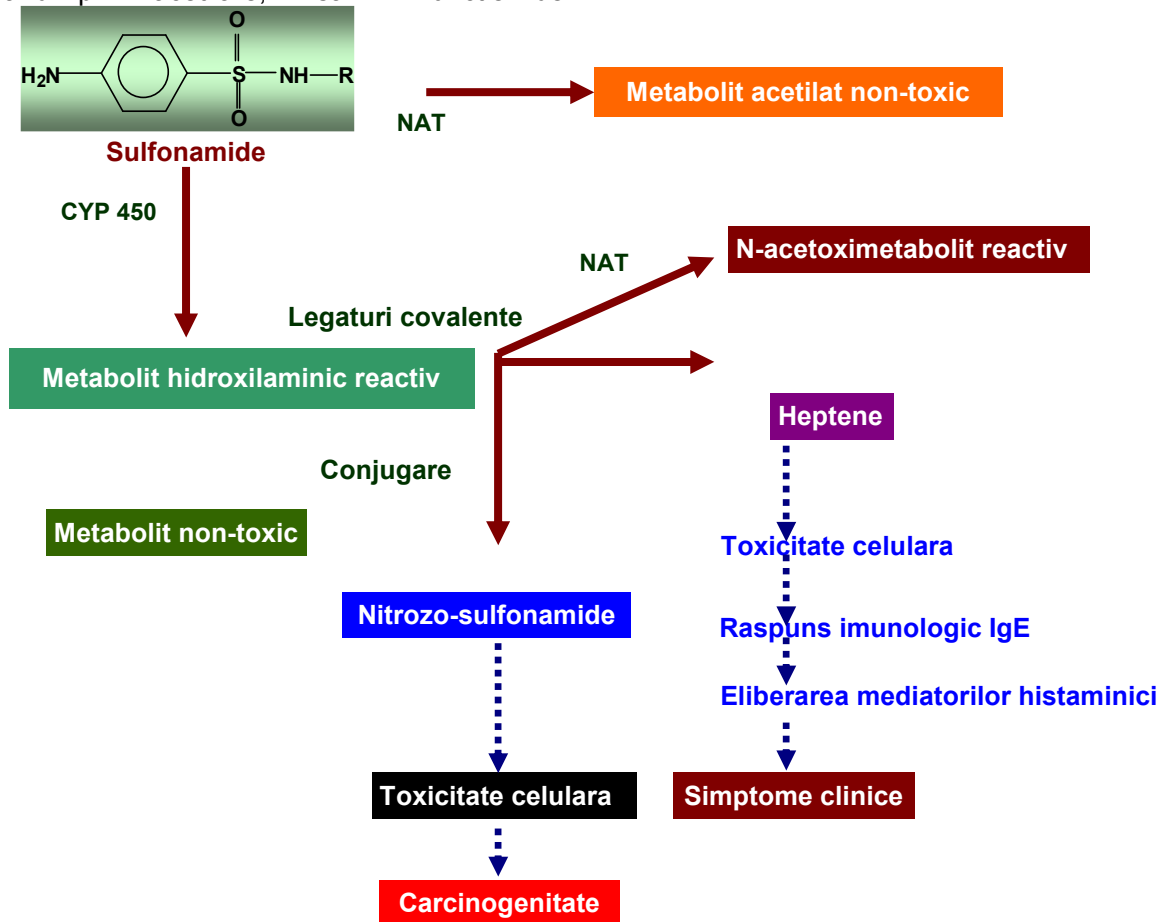


Figura 1. Metabolizarea sulfonamidelor cu formarea de metaboliți reactivi toxici

Citotoxicitatea acestor compusi hidroxilaminici asupra limfocitelor umane a fost demonstrată prin studii *in vitro* (13).

Acești compusi se detoxifică și se elimină prin conjugare în special cu glutatoină însă anumite categorii de populație (pacienții cu HIV, copii), posedă cantități mai mici de glutatoină, așa încât acești compusi reactivi se acumulează și apare efectul toxic.

Lista **reacțiilor adverse** posibile la oameni este foarte lungă.

Acești compusi produc ocazional un număr de reacții alergice (hipersensibilitate de tip I mediata de imunoglobulinele E), de la

rash-uri tegumentare minore (inclusiv maculopapulare și reacții de tip pruriginos care apar tipic după o săptămână de tratament), până la reacții severe sau care pun uneori în pericol viața pacienților cum ar fi: eritemul multiform, *sindromul Stens-Johnson* și necroliza epidermică toxică.

Reacțiile severe de hipersensibilitate au apărut mai frecvent după administrarea sulfonamidelor cu „acțiune lungă”.

Sulfonamidele folosite pentru profilaxia malariei, pot da reacții alergice severe, incluzând toxicitate hepatică și hematologică, pe lângă toxicitatea dermatologică (11, 14,

17). Si reactiile de fotosensibilizare sunt relativ frecvente la sulfonamide.

Aproximativ 3% din populatie este afectata de reactii alergice la sulfonamide.

Pacientii cu HIV manifesta in proportie de 60% aceste reactii.

Nu s-a raportat nici un caz de alergie la sulfonamide datorat alimentelor de origine animala, insa manifestarile specifice ar fi greu de recunoscut la doze atat de mici.

In raportul JECFA 1995 se mentioneaza ca "informatiile despre reactiile de hipersensibilitate rezultate prin ingestia de tesuturi animale contaminate cu reziduuri de sulfonamide sunt extrem de dificil de obtinut.

Totusi Comitetul recomanda ca MRL sa fie standardizat la valori cat mai mici posibile, in acord cu „Ghidul de buna practica veterinara”. Se evalueaza in continuare riscul de determinare a unor reactii alergice si efectele asupra sistemului imunitar al sulfonamidelor (22, 28).

Sulfonamidele pot produce de asemenea complicatii hematologice severe, cuprinzand agranulocitoza, anemia hemolitica si megaloblastica si trombocitopenia. Aceste efecte pot fi mai mari la pacientii cu insuficienta renala (2, 13, 17).

Anemia hemolitica este mai frecventa la pacientii cu deficit de glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza si la compusii cu durata lunga de actiune.

Granulocitopenia este frecventa in special la pacientii infectati cu HIV, aparand la 10-50% dintre subiecti (13, 17).

Nu este permisa administrarea de sulfonamide la mamele nou nascutilor prematuri sau la nou nascutilor cu biperbilirubinemie sau deficit de glucoza-6-fosfat.

Sulfonamidele trec prin bariera placentara in toate stadiile gestatiei, echilibrul intre sangele mamei si al copilului se stabileste in general dupa 23 ore, iar concentratia in sangele fatului este de 70-90% din concentratia in sangele mamei (3, 20).

Niveluri semnificative se gasesc in sangele fatului si la cateva zile dupa nastere daca administrarea la mama s-a facut in preajma termenului.

S-a demonstrat ca sulfonamidele trec in laptele mamei, chiar daca sunt absorbite de aceasta in cantitati mici, si pot afecta nou nascutul prin alaptare (3, 20).

Nou nascutul nu poate elimina medicamentul prin mecanisme metabolice de conjugare (acetilare si glucuronidare),

fenomen mai pregnant la prematuri. Ca urmare, sulfonamidele se acumuleaza in organismul copilului si determina hiperbilirubemie sau pot interfera cu glucoza-6-fosfat de hidrogenaza in formarea NADPH si GSH (glutation).

De asemenea metabolitii acetilati formati in corpul mamei sunt transmisi in lapte si contribuie la cresterea toxicitatii sulfonamidelor la prematuri (3).

S-au raportat si cazuri mortale de icter (icter nuclear) la nou nascuti prematuri dupa administrarea la mama de sulfonamide, prin urmatorul mecanism: concentratia plasmatica a bilirubinei (pigmentul biliar) este mentinut la niveluri normale prin conjugare metabolica cu proteinele plasmaticice (glucuronidare cu albumina)(3, 9).

La nou nascuti acest mecanism nu este complet dezvoltat (3).

Bilirubina libera patrunde in sistemul nervos central al nou nascutului si determina leziuni cerebrale.

Administrarea sulfonamidelor face ca prin natura lor acida sa scoata bilirubina din combinatia cu albuminele, iar plasma cu niveluri mari de bilirubina sa ajunga in SNC.

Totodata sulfonamidele impiedica glucuronidarea bilirubinei, conducand deasemeni la niveluri crescute ale acesteia in plasma. Intr-un studiu realizat la Centrul pentru Prevenirea si Controlul Bolilor din Atlanta au comparat 13.155 de femei care au nascut copii cu malformatii cardiace cu 5.000 de mame ai caror copii au fost sanatosi (3).

S-au studiat efectele folosirii unui antibiotic inainte cu o luna de a ramane insarcinata si la sfarsitul primului trimestru de sarcina.

Antibioticele cele mai folosite au fost: penicilinele, eritromicinele, nitrofurantoinel, sulfonamidele, cefalosporinele și quinolonele.

Rezultatele studiului arata ca sulfonamidele sunt implicate in cel mai mare numar de malformatii congenitale.

Astfel, riscul de anencefalie, hipoplazia ventriculului stang, de a prezenta anomalii ale membrelor sau hernia difragmei este de 3,4 ori mai mare, in cazul administrarii de sulfonamide la mama, dupa cum sustin cercetatorii.

Unele sulfonamide inhiba prin mecanism competitiv lactoperoxidaza si tiroid peroxidaza, mediatori in sinteza hormonilor tiroidieni, putand conduce la hipertiroidism.

In plus fata de problemele precedente, sulfonamidele pot da uneori febra

medicamentoasă, boala serului și lupus eritematos sistemic (hipersensibilitate de tip III mediata de imunoglobulinele G) sau toxicitate hepatică (inclusiv necroza).

Pe de altă parte datorită prezentei anilinei în structura lor sulfonamidele determină toxicitate hemolitică. Methemoglobinemia și anemia hemolitică sunt principalele efecte toxice ale derivatelor de anilina.

Derivații hidroxilaminici patrund în globulele roșii, reacționează cu oxihemoglobina, cu reducerea oxigenului la oxigen activ, transformând astfel grupările sulfhidril ale hemoglobinei în radicali liberi.

Aceștia reacționează cu proteinele membranei celulare și modifică suprafața eritrocitelor, așa încât determină o reacție imunologică din partea organismului, care fagocitează (în splină) globulele roșii "imbatranite" și declanșează astfel anemia hemolitică (8).

Încă din 1970 US Food and Drug Administration (FDA) a trecut la studierea toxicității acestor compuși. În 1990 același organism a inițiat procedurile de determinare a timpului de așteptare pentru sulfadimidină. În februarie 1994 la sesiunea Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) au fost revazute studiile toxicologice disponibile până în acel moment și s-au recomandat limitele maxime admise pentru acești compuși în produsele de origine animală (27).

Limita maximă de reziduuri

Limita stabilită pentru sulfonamide este de: **100 μg/kg**, pentru toate speciile și toate țesuturile.

Pentru evitarea contaminării alimentelor de origine animală fabricanții de medicamente de uz veterinar au obligația să efectueze studii de depleție a reziduurilor și de determinare a timpului de așteptare.

În sprijinul acestor studii există o multitudine de metode de analiză a reziduurilor de sulfonamide (18).

Validarea acestora se realizează în conformitate cu legislația în vigoare:

- Notice to applicants, Veterinary medicinal products, volume 6B, (29).

- Commission Decision 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (19).

- Council Directive 96/23/EC, Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (21).

- Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drugs Residues in Foods (CAC/GL 16-1993) (23).

- Guidance for the Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies VICH GL49 (23, 30).

O varietate de metode au fost utilizate pentru măsurarea reziduurilor sulfonamide în materiale biologice, inclusiv:

- cromatografia în strat subțire (TLC),
- cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC),
- cromatografia de lichid - spectrometrie de masă (LC/MS),
- electroforeza capilară de înaltă performanță (HPCE),
- cromatografia în fază gazoasă (GC), și
- testul enzimatic imunosorbant (ELISA),
- determinarea imuno biosenzor (BIA) și
- metodele microbiologice.

Metodele instrumentale, cum ar fi HPLC/MS și HPLC/MS-MS sunt sensibile și specifice, dar sunt laborioase și necesită aparatură foarte costisitoare.

Aceste metode sunt adecvate pentru confirmare, dar nu și pentru screening-ul de un număr mare de probe.

Metodele microbiologice nu necesită echipamente atât de specializate, dar ele nu au o sensibilitate și o precizie suficientă. În prezent, TLC a fost aproape înlocuită cu alte analize instrumentale.

Metodele imunochimice, cum ar fi ELISA pot fi simple, rapide și eficiente, cu sensibilitate și specificitate suficiente pentru a detecta molecule mici (18).

Metoda Oficială (AOAC), folosește derivatizarea și cromatografia de lichide cu detecție prin fluorescență (6, 7, 15).

Obiectiv

În acest studiu, este prezentată o analiză multireziduu, efectuată pentru a determina simultan patru sulfonamide în țesutul muscular de pui cu ajutorul cromatografiei de lichide pe înaltă performanță (HPLC) cu detecție UV.

Sulfonamidele determinate au fost:

- sulfametoxazol sulfadimetoxina,
- sulfaquinoxalina și
- sulfadiazina, unele dintre cele mai utilizate sulfonamide în uzul curent veterinar.

Metoda este exactă, simplă, economică atât în timp și costuri, capabilă să detecteze reziduuri de sulfonamide sub limitele maxime de reziduuri (LMR).

MATERIALE ȘI METODE

Aparatura:

- Cutter/mixer,
- balanta electronica (KERN, Germany),
- centrifuga (Centra MP 4R, USA),
- filter unit 0,45μm și 0,2μm (Whatman)
- piston-operated pipette 100-1000μl (Transferpette – Brand, USA).

Sistem HPLC cu:

- detector UV (Waters m 96, USA),
- auto sampler (Waters 717 Plus, USA),
- doua pompe (Waters 510 și 590, USA).

Coloana se separare:

- Zorbax SB-C18, 5 μm 4.6 × 250 mm, 5μ (Agilent Technologies, USA).

Standarde:

- sulfadimetoxina,
- sulfametoxazol (Sigma Chemical Co – USA),
- sulfaquinoxalina, și
- sulfadiazina (EDQM).

Reactivi:

- Acetonitril,
- HPLC grade (Lab-Scan, Poland),
- metanol (Merck, Germany),
- n-hexane (Fluka- Switzerland),
- di-natriumhydrogenphosphat HPLC grade (Merck, Germany),
- diclorometan HPLC grade (Chimactiv, Romania)
- acetona HPLC grade (Chimactiv, Romania) și
- N-dymethylformamida (Fisher Scientific, UK).

Prepararea solutiilor standard:

Solutia standard stoc a fost preparata prin dizolvarea a 100 mg din fiecare SA standard cu 100 ml N-dymethylformamida.

Solutiile standard sunt stabile 30 zile la 4°C. Solutia standard continand amestecul celor patru substante active a fost preparata din cate 1ml din fiecare solutie stoc in 50ml solutie 50% metanol in solutie di-natriumhydrogenpospat 6 g/1000ml. Solutiile de lucru au fost preparate in domeniul de concentratie 0.1-2 μg/mL, prin dilutii cu faza mobila. Solutiile s-au preparat in ziua folosirii.

Matricile blanc au provenit de la pui care nu au primit anterior vreun tratament medicamentos, proveniti de la Biobaza S.N. Institutul Pasteur.

Probele: depozitate in stare congelata la -17°C, pana la utilizare

Prepararea probelor:

Extractia sulfonamidelor s-a realizat utilizand o metoda modificata dupa Furusawa si Hanabusa, Stoev si Michailova (9, 10, 17).

Zece grame de proba omogenizata se cantaresc intr-un tub de centrifuga si se adauga 20 ml acetonitril.

Proba se agita 3 min pentru extragere si se centrifugheaza la 3500 rpm pentru 10 min. Supernatantul se colecteaza iar reziduul se extrage din nou cu 10 ml de acetona.

Dupa omogenizare si agitare timp de 3 minute, proba se centrifugheaza din nou.

Supernatantul se aduce peste acetonitril, iar faza organica se evaporata aproape de sec la 30°C.

Reziduul se reia cu 5 ml de diclorometan si se extrage.

Se **centrifugheaza** la 3500 rpm, 10 min.

Se **separa** diclorometanul si se repeta extractiile de inca doua ori unind extractele de diclorometan.

Se **evapora** extractele reunite la sec la 40°C.

Reziduul **se reconstitute** intr-un 1mL de 50% metanol in di-natriumhydrogenphosphat solutie 6 g/1000ml. Se adauga 2 ml hexan pentru indepartarea pigmentilor si grasimilor, se agita, se centrifugeaza la 3500 rpm, timp de 15 min si se indeparteaza hexanul.

Solutia ramasa se filtreaza printr-un filtru de 0,2 - 0,45μm si se injecteaza in sistemul HPLC.

Analiza HPLC:

Faza mobila: 75 : 25 = soluție di-natriumhydrogenphosphat 6 g/1000ml (pH = 8.5): metanol (v/v).

Debitul fazei mobile: 1 mL/min.

Volumul de injectie: 20 μl

Lungime de unda detector: 254 nm.

Durata analizei: 10 min

Formula de calcul aplicată:

$$\mu\text{g/kg sulfonamida} = C \times 1000 \times 100 / R$$

unde:

C = concentratia masurata (μg/kg).

R = coeficientul de recuperare (%).

Validarea procedurii analitice:

Metoda propusa a fost validata in acord cu prevederile "Notice to applicant and Guideline – veterinary medicinal products, Vol 8" si "Commission Decision (EEC) No. 657/2002", urmarind urmatoarele critei: specificitate, precizie, acuratete, linearitate, limita de cuantificare, limita de detectie.

Curba de calibrare

Pentru fiecare component s-a trasat in domeniul de concentratie 0,320-1,50 μg/ml.

Pentru fiecare component s-a trasat curba de regresie lineara.

Coeficienții de corelatie au avut valori cuprinse intre: 0.99676–0.999795, asa cum reiese si din Tabelul 1

Specificitatea

a fost studiată analizând matrice blank și matrice îmbogățită cu trei niveluri de concentrație (0.5, 1, 1.5 x MRL), pentru toți analiții, verificând existența interferențelor în fiecare regiune de interes.

Peak-urile fiecărui analit, măsurate la jumătatea înălțimii picului au fost în limitele 90-110% față de picurile soluțiilor standard, iar timpul de retenție a fost identic cu o toleranță de 5%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Figurile de la 2 la 4 demonstrează specificitatea metodei prin suprapunerea cromatogramelor probelor de matrice blank și cele de matrice îmbogățită.

Repetabilitatea

S-a demonstrat prin analizarea a câte 6 probe de matrice îmbogățită la trei niveluri de concentrație: 0.5, 1, 1.5 x MRL, calculându-se coeficientul de variație, așa cum reiese din Tabelul 2. Coeficientul de variație al repetabilității pentru matricele îmbogățite la 50 μg/kg, 100 μg/kg și 150 μg/kg s-a situat între 7,8 și 13,5%.

Acuratețea (regasirea) a fost determinată folosind matrice blank îmbogățită pe cele trei niveluri de concentrație amintite, raportându-se cantitatea regăsită la cantitatea cu care s-a realizat îmbogățirea probei.

Coeficientul de recuperare s-a situat în domeniul 69,8 – 84,23%, față de concentrația inițială, așa cum reiese și din Tabelul 3.

Tabel 1

Ecuatii și coeficienți de corelație

Component	Retention time	Equation	Correlation coefficient, R
Sulfadiazine	2.5-2.6	$Y = 8.30 \cdot 10^4 \cdot X + 3.22 \cdot 10^2$	0.998122
Sulfadimethoxine	3.8-3.9	$Y = 7.58 \cdot 10^4 \cdot X + 1.38 \cdot 10^4$	0.999795
Sulfamethoxazole	2.7-2.9	$Y = 6.15 \cdot 10^4 \cdot X + 1.57 \cdot 10^3$	0.996763
Sulfaquinoxaline	6.8-6.9	$Y = 1.53 \cdot 10^5 \cdot X - 3.35 \cdot 10^3$	0.999749

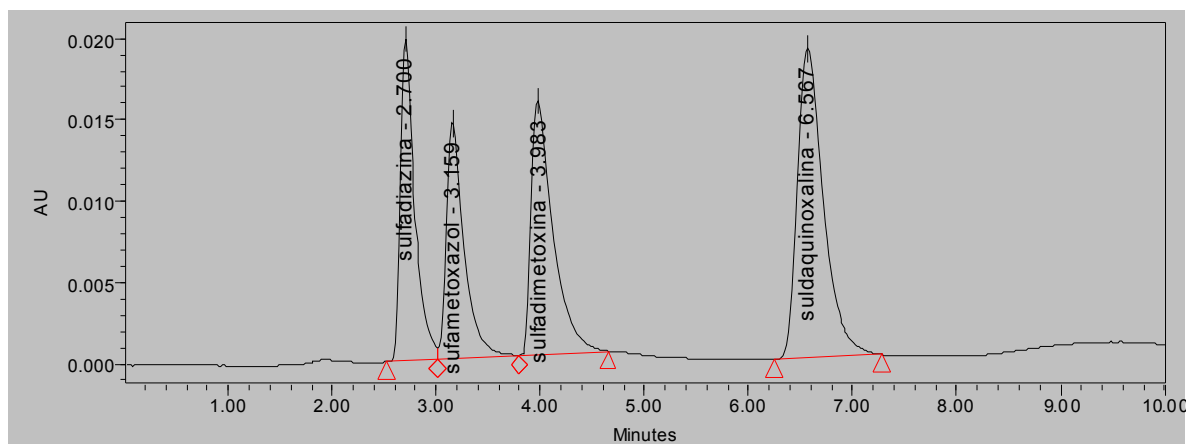


Figura 2. Cromatograma unei soluții standard ce conține cei patru analiți: sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina și sulfaquinoxalina.

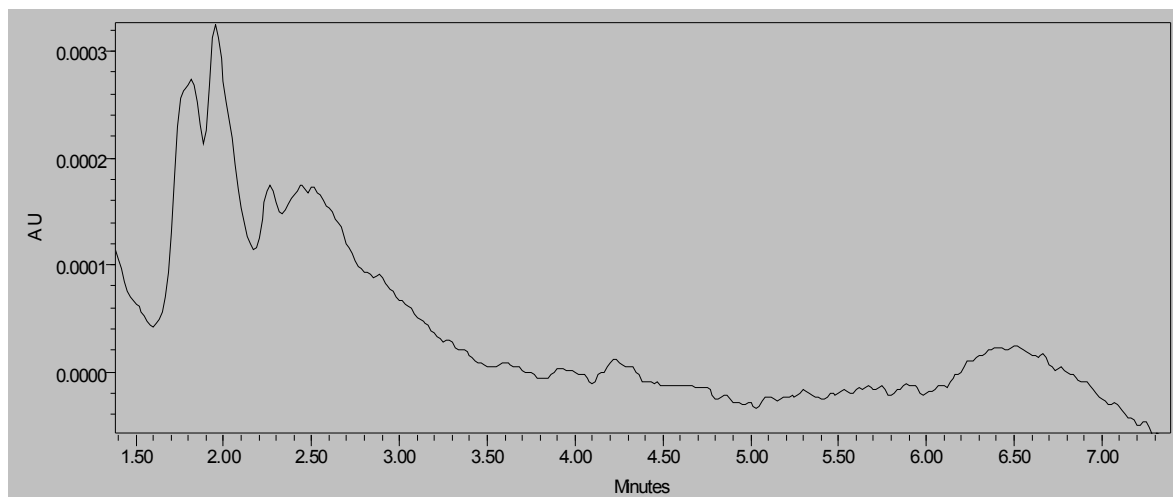


Figura 3. Cromatograma unei matrice blank.

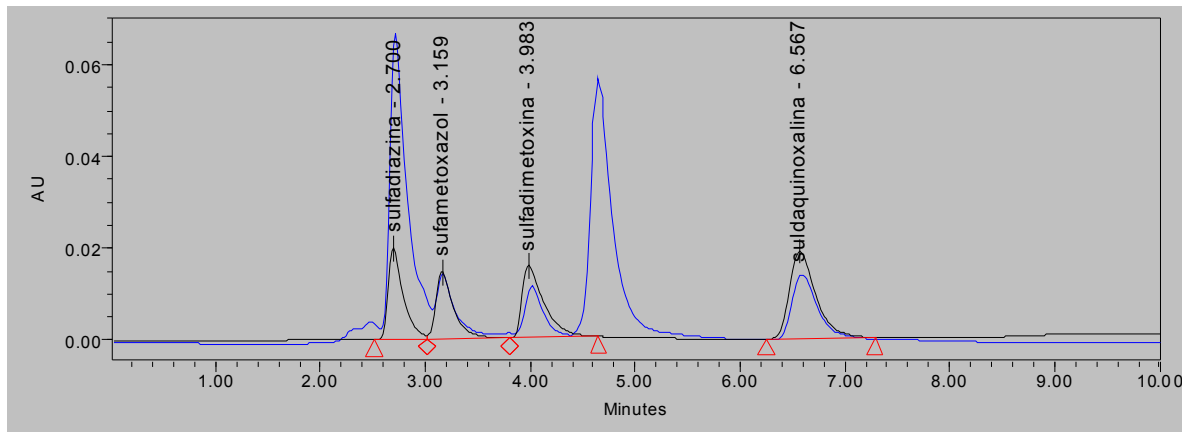


Figura 4. Cromatograma unei probe de matrice imbogata cu 150 μ g/kg si cromatograma unei matrice blank

Linearitatea:

- 6 probe au fost imbogate cu: 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 și 1.75 μ g/ml, din fiecare analit.
- probele au fost analizate, calculandu-se concentratia de analiti in fiecare proba.
- s-a trasat curba de linearitate (concentratia practica, fata de concentratia teoretica).

Ecuatiile de linearitate si coeficientii de corelatie sunt prezentati in Tabelul 4.

Limitele de detectie si de cuantificare

S-au determinat prin analizarea a unui numar semnificativ de matrice blank (>20) cu masurarea semnalului din zonele de interes.

Limita de detectie s-a determinat ca fiind media aritmetica a concentratiei analitului plus

de trei ori deviatia standard, iar limita de cuantificare ca fiind media concentratiei analitilor plus de zece ori deviatia standard.

Limita de cuantificare a fost in limita a 6.6-0.34 μ g/kg, mult sub $\frac{1}{2}$ MRLs. (Tabelul 5).

Limita de decizie (CC α) si capacitatea de detectie (CC β)

Au fost calculate ca fiind media aritmetica:

- a concentratiei analitului la nivel MRL plus 1.64 x deviatia standard a repetabilitatii la $\alpha = 5\%$ (CC α) si respective,
- media aritmetica a concentratiei analitului la nivel CC α plus 1.64 x deviatia standard a repetabilitatii la $\alpha = 5\%$ (CC α) (Tabel 6).

Tabel 2

Media si coeficientul de variatie al repetabilitatii

Nivelul de imbogare μ g/kg	Tipul sulfonamidei							
	Sulfadiazina		Sulfadimetoxina		Sulfamethoxazol		Sulfaquinoxalina	
	Media (μ g/kg)	srel %	Media (μ g/kg)	srel %	Media (μ g/kg)	srel %	Media (μ g/kg)	srel %
50	47.5	17.1	38.7	19.8	27.9	6.5	26.4	2.1
100	80.3	1.3	67.9	8	64.7	10.6	60.7	13
150	124.7	14.5	108.5	12.9	124.1	10	121.2	8.5
Media S _{rel} (%)		10.9		13.5		9		7.8

Tabel 3

Media si deviatia standard relativă a recuperarii

Nivelul de imbogare μ g/kg	Tipul sulfonamidei							
	Sulfadiazina		Sulfadimetoxina		Sulfamethoxazol		Sulfaquinoxalina	
	Media recuperarii (μ g/kg)	srel %	Media recuperarii (μ g/kg)	srel %	Media recuperarii (μ g/kg)	srel %	Media recuperarii (μ g/kg)	srel %
50	86.1	9.05	83.4	10.3	73.08	8.1	75	6.8
100	80.3	1.3	67.9	8	64.7	10.6	60.7	13
150	86.3	10.05	80.58	8.8	71.6	17.5	79.3	8.92
Mean recovery		84.23		77.29		69.8		71.66

Tabel 4

Ecuatiile de linearitate si coeficientii de corelatie

Component	Ecuatie linearitate	Coeficienti corelatie, R
Sulfadiazina	Y = 0.8242 X + 0.0245	0.9958
Sulfadimetoxina	Y = 0.00873 X - 0.0488	0.9834
Sulfamethoxazola	Y = 0.8551 X - 0.0652	0.9913
Sulfaquinoxalina	Y = 0.8043 X - 0.0806	0.9800

Tabel 5

Limita de detectie si cuantificare pentru cei patru analiti

Tipul sulfonamidei	Valoarea determinata			
	Media ($\mu\text{g/kg}$)	S	LD ($\mu\text{g/kg}$)	LQ ($\mu\text{g/kg}$)
Sulfadiazina	0.06	0.028	0.144	0.34
Sulfadimethoxina	0.15	0.07	0.36	0.75
Sulfametoxazol	0.45	0.045	0.58	0.9
Sulfaquinoxalina	6.5	0.01	6.53	6.6

Tabel 6

Limita de decizie ($CC\alpha$) si capacitatea de detectie ($CC\beta$)

$CC\alpha / CC\beta$	Sulfadiazina	Sulfadimethoxina	Sulfametoxazol	Sulfaquinoxalina
	104.64	109.02	111.31	112.95
	108.5	121	119.3	125

CONCLUZII

- In momentul de fata in Uniunea Europeana siguranta alimentului se bazeaza pe o evaluare cuprinzatoare a riscului pe intregul lant alimentar. In cazul alimentelor expunerea este subinteleasa iar riscul contaminarii acestora cu sulfonamide este evident datorita intensei folosiri a acestor substante in practica veterinara.
- Metoda prezentata a fost dezvoltata pentru a determina simultan reziduuri de sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfadimethoxina si sulfaquinoxalina in muschiul de pui prin analiza HPLC, dupa extractie cu solventi organici.
- Metoda este simpla, rapida si economica.
- Criteriile de validare impuse: specificitate, precizie, acuratete, limita de detectie si de cuantificare, linearitate, au respectat conditiile impuse de Decizia comisiei Europene 2002/657/EC, cu privire la validarea metodelor de analiza.
- Metoda poate detecta reziduuri de sulfonamide, fara utilizarea spectrofotometriei de masa sau derivatizarea fluorimetrica a componentilor
- Metoda propusa este foarte potrivita pentru utilizare in studii de depletie si determinare a timpului de asteptare pentru oricare din analitii prezentati.

BIBLIOGRAFIE

- Barlow, S.M. Greig, J.B. Bridges, J.W., Carrere, A. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology, *Food and Chemical Toxicology* 40, 145-191.
- Bevill, R.F. (2008). Sulfonamides residue in domestic animals *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1368-2885.
- Blackburn, S.T. (2007). Maternal, fetal & neonatal physiology: a clinical perspective, Saunders Elsevier.
- Cochrane, B., Doyle, E.M., Steinhart, C.E. (1995). *Food Safety*, New York USA, p. 247.
- Cordle, M.K. (1989). Sulfonamide Residues in Pork: Past, Present and Future, *J. Anim. Sci.*, 67: 2810-2816.
- Furusawa, N., Hanabusa, R. (2002). Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food Res. Int.* 35: 37-42.
- Furusawa, N., Kishida, K (2002). A High-performance chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. *Fresenius, J. Anal. Chem.*, 1002, 371(7):1031-3.
- Hess, D. A., Sisson, M. E., Suria, H. Wijsman, J., Puvanesasingham, R., Madrenas, L. (1999). Cytotoxicity of sulfonamide reactive metabolites: apoptosis and selective toxicity of CD81 cells by the hydroxylamine of sulfamethoxazole. *The FASEB Journal*, Vol. 13, (October).
- Loghin, Felicia (2002) Toxicologie generala, Ed. Medicala Universitara "Iuliu Hateganu" Cluj Napoca.
- Moller, G. (2000). Animal Drug Residues in Food, Food Toxicology, University of Ibado.
- Montanaro, A. Naisbitt, D.J., Farrell, J., Gordon, S.F. (1998). Sulfonamide allergy. *Immuno. Allergy Clin. North Am.*, 18:843.
- Reea, J.C. (1993). Preventing Sulfa Residues in Pork, *University of Missouri Extension*.
- Singh, H. Purnell, E., Smith, C. (2007). Mechanistic study on aniline-induced erythrocyte toxicity, *Arh. Hig. Rada Toksikol.*; 58:275-285.
- Slatore, C. G., Tilles S. A. (2004). Sulfonamide hypersensitivity. *Immuno. Allergy Clin. of North Am.* – Vol. 24, Issue 3 (August).
- Stoev, G., Michailova, A. (2000). Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 871:37-42.
- Tansakul, N. (2008). A sulfadimidine model evaluate pharmacokinetics and residues various concentration in hens, Inaugural Dissertation, Hanover, 2008
- Verdel, B.M. Souverein, P.C. Egberts, A.C.G. Leufkens, H.G.M. (2004). Diference in Risk of Allergic Reaction of Sulfonamide Drugs based on Chemical Structure, *The Annals of Pharmacotherapy*.
- Wang, S., Zhang, H.Y. Wang, L. Duan, Z.J., Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamides residues in edible animal products: A review. *Food Additives and Contaminants*.

19. ***Commission Decision 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
20. ***Committee on Drugs, American Academy of Pediatrics. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics*; 93:13750. 1994
21. ***Council Directive 96/23/EC, Concerning the performance of analytical methods and interpretation of result.
22. ***European Union Regulation 1990. Establishment of Maximum Residue Levels of Veterinary Medical Products in foodstuffs of animal origin. Council Regulation (EEC) No. 2377/90. Official Journal of the European Communities. No. L 224, Brussels, 1990.
23. ***Guidance for the Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies VICH GL49, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug, Administration Center for Veterinary Medicine, April 9, 2010.
24. ***Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drugs Residues in Foods (CAC/GL 16-1993).
25. ***ORDIN nr. 95 din 2 aprilie 2007, privind aprobarea Normei sanitare veterinare și pentru siguranța alimentelor privind măsurile de supraveghere și control al unor substanțe și al reziduurilor acestora la animalele vii și la produsele de origine animală.
26. ***Ordinul nr. 187/2007 din 31/10/2007, pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind Codul produselor medicinale veterinare.
27. ***Recommended international Code of practice for control of the use of veterinary drugs CAC/RCP 38-1993.
28. ***Sulfathiazole (WHO Food Additives Series 25)
29. ***The rules governing medicinal products in the European Union October 2005, Volume 8-Notice to applicants and Guideline-Veterinary medicinal products: Establishment residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
30. ***Validation Requirements for Testing for Residues of Veterinary Drugs, James D. McNeil, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. Joint FAO-WHO Technical Workshop on Residues of Veterinary Drugs without ADI-MRL - Bangkok, 24-26 August 2004.