

# Kontrola kloramfenikola u uzorcima mesa, mesnih proizvoda i ribe

Bilandžić N., I. Varenina, B. Solomun Kolanović<sup>1</sup>

Znanstveni rad

## Sažetak

U svrhu kontrole ilegalne uprave te kontrole ostataka kloramfenikola tijekom 2010. godine sakupljeni su uzorci mišićnog tkiva peradi ( $n=33$ ), goveda ( $n=109$ ) i svinja ( $n=46$ ), mesnih proizvoda ( $n=21$ ) i ribe ( $n=7$ ), iz svih područja Republike Hrvatske. Koncentracije kloramfenikola određene su orijentacijskom ELISA metodom, te potvrdnom metodom tekućinske kromatografije-tandemske spektrometrije masa (LC-MS/MS). Validacijom metoda dokazana je njihova sposobnost kvantifikacije ispod zadane vrijednosti najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode od  $0,3 \mu\text{g/kg}$ . Određivane koncentracije kloramfenikola u mesu goveda, svinja, peradi, mesnim proizvodima te ribi kretale su se u rasponu od minimalne vrijednosti od  $0,177$  do najviše vrijednosti od  $202,9 \text{ ng/kg}$ . Najniža srednja koncentracija od  $3,54 \text{ ng/kg}$  utvrđena je u mesnim proizvodima, a najviša  $15,8 \text{ ng/kg}$  u mesu goveda. Niti u jednom uzorku kontroliranog mesa i ribe nisu utvrđene koncentracije iznad  $300 \text{ ng/kg}$ . S obzirom na utvrđene niske koncentracije kloramfenikola može se zaključiti da je meso kontroliranih životinja prikladno za konzumaciju odnosno sukladno tome da se u Republici Hrvatskoj poštuje zabrana uporabe tog antibiotika. Sukladno utvrđenim slučajevima povišenih koncentracija u mesu, ribi te škampima podrijetlom iz Azije, potrebna je stalna kontrole uvoznih pošiljaka iz zemalja tog dijela svijeta.

**Ključne riječi:** kloramfenikol, meso, riba, ELISA, LC-MS/MS

## Uvod

Kloramfenikol se kao veterinarski pripravak primjenjuje u tretmanu različitih infekcija životinja koje se koriste za proizvodnju hrane za ljudsku ishranu, zbog svog bakteriostatikog djelovanja protiv većine Gram pozitivnih i mnogih Gram negativnih bakterija, te također zbog sprječavanja rasta i razmnožavanja rikecija, klamidija i mikoplazmi (Dowling, 2006). Mehanizam djelovanja kloramfenikola je inhibicija sinteze bje-lančevina u bakterijskim stanicama te u stanicama koštane srži sisavaca (Kucers i sur., 1997). Nakon per oralne odnosno parenteralne primjene kloramfenikol se u najvećem dijelu biotransformira glukuridacijom u različitim organima uključujući jetru, bubrege i mišić u metabolite koji se transportiraju u cijelo tijelo i izlučuju

bubrezima (Anadon i sur., 1994; Akhtar i sur., 1996).

Sa toksikološkog stanovišta kloramfenikol je citotoksični, genotoksični i hematotoksični spoj koji u ljudi uzrokuje depresiju koštane srži te u najgorem slučaju i aplastičnu anemiju (Dowling, 2006). U najtežim slučajevima ireverzibilna aplastična anaemija može dovesti do leukemije pri čemu je utvrđena visoka stopa smrtnosti ( $> 50\%$ ). Također, kloramfenikol pridonosi razvoju rezistentnih sojeva bakterija što također, pridonosi ozbiljnim zdravstvenim problemima (Ferguson i sur., 2005).

Zbog potencijalnog toksičnog utjecaja na ljude, te mogućnosti pronalaska metabolita u jestivim tkivima, primjena kloramfenikola u

životinja čiji su proizvodi namijenjeni ljudskoj uporabi zabranjena je u Europskoj Uniji (EC, 1994). Također, Europska Unija uspostavila je i tzv. „zero tolerance“ te je kloramfenikol uvršten u skupinu supstanci za koje se maksimalno dozvoljena količina u namirnicama životinjskog podrijetla ne može odrediti iz toksikoloških razloga (EC, 2009). Sukladno tome u RH je Naredbom o zabrani primjene određenih veterinarskih lijekova na životinjama čije se meso i proizvodi koriste za prehranu, 2002. godine zabranjena upotreba kloramfenikola na životinjama koje se koriste u ishrani ljudi (Anonimno, 2002). Usprkos zabrani, ostaci kloramfenikola sustavno se pronalaze u svim vrstama proizvoda životinjskog podrijetla što izaziva veliku zabrinutost potrošača u Europskoj Uniji (RASFF, 2002. - 2011).

<sup>1</sup> dr. sc. Nina Bilandžić, znanstvena savjetnica, Ivana Varenina, dipl. ing. biotehnol., Božica Solomun Kolanović, dipl. ing. prehr. tehnol.; Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Tablica 1. Rezultati iskorištenja i preciznosti metoda ELISA i LC-MS/MS za određivanje kloramfenikola u mesu

Metoda	Dodana koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Izmjerena koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Iskorištenje (%)	Standardna devijacija	CV (%)
ELISA	0,15	0,16	108,4	0,021	10,6
	0,3	0,28	92,4	0,024	9,8
	0,45	0,35	78,8	0,035	9,5
	Srednja vrijednost		93,2	0,027	9,97
LC-MS/MS	0,15	0,155	103,8	0,022	10,5
	0,3	0,287	95,9	0,024	7,6
	0,45	0,458	101,8	0,031	6,3
	Srednja vrijednost		100,5	0,025	8,13

U svrhu određivanja ostataka kloramfenikola u hrani životinjskog podrijetla koriste se specifične i osjetljive metode. Za kloramfenikol je u Europskoj Uniji propisana granica najmanje zahtjevano učinkovitosti izvedbe metode (MRPL, eng. *minimum required performance limit*) od 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i predstavlja minimalnu koncentraciju kloramfenikola u uzorku koju primijenjena metoda mora moći detektirati (EC, 2003). Najčešće se se kao orijentacijske metode za određivanje kloramfenikola koriste imunoenzimski testovi (ELISA) te plinska kromatografija (Scortichini i sur., 2005; Cerkvenik-Flajs, 2006). U slučajevima uzoraka sa povišenim koncentracijama za određivanje i kvantifikaciju kloramfenikola primjenjuju se potvrdne metode plinske i tekućinske kromatografije-tandemske spektrometrija masa (GC-MS/MS, LC-MS/MS) (Gantverg i sur., 2003; Impens i sur., 2003; Mottier i sur., 2003; Bogusz i sur., 2004; Peng i sur., 2006; Rønning i sur., 2006)

U ovoj studiji koncentracije kloramfenikola određivane su imunoenzimskom orijentacijskom metodom, a uzorci s višim koncentracijama provjereni su tekućinskom kromatografijom-tandemskom spektrometrijom masa. Ostaci kloramfenikola određivani su u mesu peradi, goveda i svinja te mesnim proizvodima i ribi tijekom 2010. godine.

### Materijali i metode Uzorkovanje

Tijekom 2010. godine sakupljani su uzorci mišićnog tkiva peradi, goveda i svinja te mesnih proizvoda (pašteta, hamburger, kobasice, hrenovke) i ribe sa svih područja Republike Hrvatske. Uzorci su držani na hladnom do dolaska u laboratorij gdje su podijeljeni u manje komade, te zamrznuti na  $-18^{\circ}\text{C}$  do analize.

### Kemikalije i uređaji

Za analizu kloramfenikola ELISA metodom korišten je test proizvođača Laboratory of Hormonology (Marloie, Belgija) opremljen sa: mikrotitarska pločica (96 jažica), standardne otopine kloramfenikola od 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 i 2  $\text{ng}/\text{mL}$  kloramfenikola, koncentrirani konjugat (kloramfenikol vezan peroksidazom), liofilizirana antitijela anti-kloramfenikol, supstrat/kromogen otopina (peroksid/TMB), pufer za razrjeđivanje, pH 7,4, stop otopina ( $6\text{ N H}_2\text{SO}_4$ ), koncentrirani pufer za ispiranje. U analizama je korištena ultračista voda (Milli-Q Millipore,  $18,2\text{ MWcm}^{-1}$ ).

Standard kloramfenikola nabavljen je od proizvođača Sigma (St. Louis, USA). Diklorometan, petroleter i amonij acetat, te metanol i dietileter (HPLC grade) i kolonice za pročišćavanje uzoraka  $\text{C}_{18}$  SPE (500 mg per 3 mL) nabavljene su od J. T. Baker (Deventer, Netherlands). Aceton (HPLC

grade) i mononatrij fosfat (p.a.) nabavljeni su od proizvođača Merck (Darmstadt, Germany), a metanol, dietileter i etil acetat (za pročišćavanje uzoraka za ELISA metodu) te natrij sulfat (bezvodni) od Carlo Erba (Milan, Italy). Izooktan, natrij klorid i dinatrijhidrogenfosfat dihidrat nabavljeni su od Kemike (Zagreb, Croatia). Dušik 5,0 i 5,5 nabavljen je od SOL spa (Monza, Italy).

Za mobilnu fazu A za LC sustav korišten je 5 mM amonijacetat ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) pripremljen otapanjem 0,38 g  $\text{NH}_4\text{Ac}$  u 1 L ultra čiste vode. Za B mobilnu fazu korišten je metanol.

Za kromatografsku separaciju korištena je kolona Zorbax XDB C18, 4,6 x 75 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  (Agilent Technology, USA). U pripremi uzoraka korišteni su slijedeći uređaji: mješalica IKA® Ultra-Turrax® (IKA® -WERKE GMBH & CO.KG, Germany), centrifuga Rotanta 460R (Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Germany), uparivač dušikom N-EVAP model 111 (Orgamotion Associates Inc., Berlin, USA).

Vrijednosti apsorbance za ELISA metodu mjerene su na mikročitaču Tecan model Sunrise (Tecan Austria GmbH, Austria). Sustav za tekućinsku kromatografiju-tandemsku spektrometriju masa (LC-MS/MS) sastoji se od HPLC 1200 te spektrometra masa Triple Quad LC/MS 6410 (Agilent Technology, USA).

### Priprema uzoraka za ELISA metodu

Meso se homogenizira, odvaže se 3 g i miješa s 3 mL destilirane vode, te doda 6 mL etilacetata. Intenzivno se miješa 10 minuta te centrifugira 10 minuta na 3000 x g. Pipetira se 4 mL gornjeg sloja etilacetata i otpari do suha u blagoj struji dušika na  $50^{\circ}\text{C}$ . Ostatak se otopi u 1 mL mješavine izooktan/ diklorometan (2:3, v/v) te doda 0,5 mL pufera za razrjeđivanje (iz kita). Intenzivno se miješa 1 minutu te centrifugira 10 minuta na 3000

x g. Ako se pojavi emulzija u gornjem sloju, epruveta se stavi kratko, 2 min., u vodenu kupelj na 80 °C i ponovno centrifugira. Za test se koristi 50 µL vodenkastog gornjeg sloja.

### Priprema uzoraka za LC-MS/MS metodu

Ekstrakcija 10 g uzorka provodi se mješavinom acetona i diklormetana u omjeru 50:50 (v/v). Nakon uklanjanja vode odvaja se supernatant te se nakon uparavanja u struji dušika ostatak otapa fosfatnim puferom sa podešenim pH na 7,8. Slijedi pročišćavanje na SPE C18 kolonicama.

Aktivacija kolonica provodi se metanolom i vodom. Nakon nanošenja uzorka slijedi ispiranje vodom te sušenje punila kolonica zrakom. Interferencije se uklanjaju petroleterom nakon čega slijedi sušenje i eluiranje kloramfenikola dietileterom. Zatim je potrebno otpariti i rekonstituirati analit mobilnom fazom.

### ELISA test

Prije analize se sve kemikalije temperiraju 45 minuta na sobnoj temperaturi. Koncentrat pufera za ispiranje priprema se prije upotrebe (1 mL koncentriranog pufera + 9 mL destilirane vode). Koncentrat enzimskog konjugata (CAP-HRPO) razrijedi se 100 x u puferu za razrjeđivanje (npr. 10 µL konjugata + 990 µL pufera za razrjeđivanje). Također, liofilizirano antitijelo rekonstituira se dodavanjem 6 mL pufera za razrjeđivanje te dobro promiješa.

Postupak testa provodi se slijedećim redoslijedom dodavanja reagensa u jažice: dodaje se 50 µL otopina standarda od 0 do 2 ng/mL, te 50 µL otopine uzorka u duplikatu. Zatim se dodaje 100 µL pripremljene otopine enzim-konjugata u svaku jažicu i 100 µL pripremljene otopine antitijela u svaku jažicu. Ploča se dobro zatvori te snažno protrese (1 minutu) te inkubira u tami na 4 °C tijekom 2 sata. Zatim se ukloni otopina iz ploče i is-

Tablica 2. **Koncentracije kloramfenikola (ng/kg) u mesu goveda, svinja, peradi i mesnim proizvodima te ribi određene tijekom 2010. godine**

Vrsta mesa	Broj uzoraka	Koncentracije kloramfenikola (ng/kg)			
		Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Standardna pogreška
Govedina	109	0,108	202,9	15,8*	2,65
Svinjetina	46	0,263	92,7	11,3*	2,41
Perad	33	1,01	139,2	15,5*	15,5
Proizvodi	21	0,177	17,9	3,54	0,965
Riba	7	5,59	18,9	10,9**	1,96

\* p < 0,05

\*\*p < 0,01

pere tri puta sa pufe

rom za ispiranje (tri puta po 300 µL). Nakon svakog istresanja otopine za ispiranje na novi čisti upijajući papir do kraja se isprazne jažice lupkajući pločicom o njega. Dodaje se 150 µL spremne peroksid/TMB otopine u svaku jažicu i dobro promiješa. Inkubira se 30 minuta u tami i na sobnoj temperaturi (20-25 °C), dodaje 50 µL stop otopine u svaku jažicu i dobro promućka. Vrijednosti apsorbance očitavaju se na 450 nm unutar 30 minuta na mikročitaču (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria).

### Tekućinska kromatografija-tandemska spektrometrija masa, LC-MS/MS

Kromatografska separacija na koloni provodi se uz izokratni protok mobilne faze sastava od 30 % 5 mM amonijevog acetata i 70 % metanola pri protoku 0,5 mL/min. Na kolonu (temperatura 40 °C) se aplicira volumen uzorka od 15 µL. Vrijeme trajanja analize je 5 minuta sa dodatne 2 minute za stabilizaciju kolone.

Ionizacija molekula za maseni spektrometar provodi se izvorom za ionizaciju elektroraspršivanjem ESI (engl. Electrospray Ionization). Temperatura plina u izvoru je 350 °C, a protok plina 5 L/min. Tlak u nebulizeru iznosi 35 psi, a kapilara je pod naponom od 4000 V. Način skeni-

ranja je multiplo skeniranje reakcija (MRM) pri negativnoj ionizaciji čime se prate dvije molekulske mase (kloramfenikol m/z=321 i interni standard kloramfenikola m/z=326) iz kojih za kvantifikaciju koriste po dva fragmenta od svakog izvornog spoja.

### Validacija ELISA i LC-MS/MS metode

Validacija metoda provedena je prema kriterijima regulative Europske Unije 2002/657/CE za orijentacijske odnosno potvrdne metode (EC, 2002). Specifičnost metoda određena je analizom 20 negativnih uzoraka mišićnog tkiva različitih vrsta životinja. Za screening metodu ELISA određena je sposobnost dokazivanja CCβ obogaćivanjem 20 uzoraka na razinu ispod MRPL (0,15 µg/kg) te je izračunata kao zbroj izračunate vrijednosti granične koncentracije CCα i standardne devijacije uzoraka obogaćenih na 0,15 µg/kg pomnožene sa 1,64. Granična koncentracija CCα za ELISA metodu određena je kao zbroj srednje vrijednosti koncentracije slijepih uzoraka i standardne devijacije odgovora slijepih uzoraka pomnožene sa 2.

Granična koncentracija CCα LC-MS/MS metode određena je obogaćivanjem uzoraka u 3 serije po 6 uzoraka na 0,15 µg/kg te je izračunata kao zbroj vrijednosti najniže koncentracije validacijskog postupka (C<sub>0</sub>) i standardne devijacije pri C<sub>0</sub>

( $Sr/C_p$ ) pomnožene s 2,33. Za izračun sposobnosti dokazivanja  $CC\beta$  korišteni su rezultati na sve 3 validacijske razine ( $n = 54$ ), a zbroj je vrijednosti  $CC\alpha$  i standardne devijacije pri  $CC\alpha$  pomnožene s 1,64.

Iskorištenje i preciznost metoda određena je obogaćivanjem slijepih uzoraka CAP u tri serije na 3 koncentracijske razine (0,15, 0,3 i 0,45  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) po 6 ponavljanja.

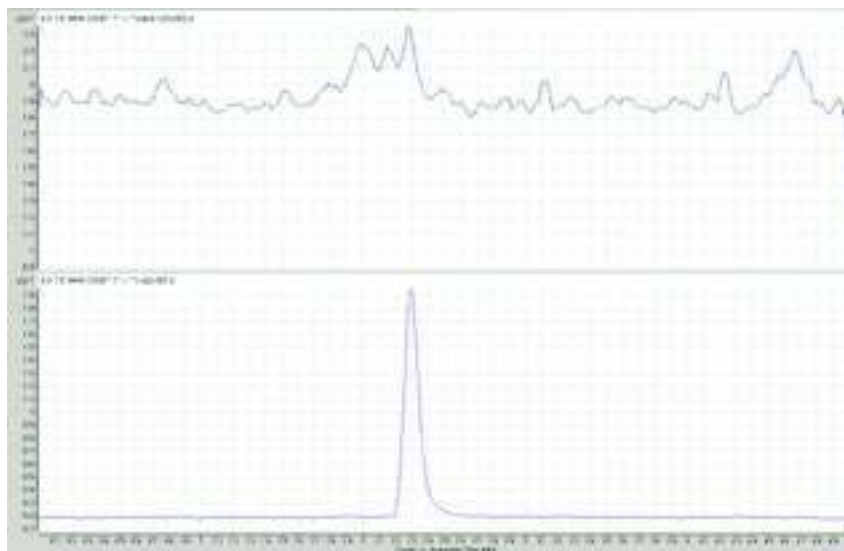
### Statistička analiza

Statistička analiza provedena je programom Statistica<sup>o</sup> 6.1 (StatSoft<sup>o</sup>, Inc., Tulsa, USA). Koncentracije kloramfenikola određene u mišićnom tkivu izražavane su kao minimalna i maksimalna određena koncentracija, srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Primijenjen je  $t$ -test za određivanje razlike između srednjih vrijednosti koncentracija kloramfenikola između vrsta mesa. Statistički značajne razlike izražavane su na nivou značajnosti  $p < 0,05$ .

### Rezultati i diskusija

U ovome radu koncentracije kloramfenikola određivane su ELISA metodom, a uzorci sa višim vrijednostima provjeravani su LC-MS/MS metodom. Rezultati iskorištenja odnosno točnosti metoda prikazani su u Tablici 1. Određeno je ukupno iskorištenje za ELISA metodu od 93,2%, a za LC-MS/MS metodu 100,5 %. Rasipanje rezultata metoda nije značajno što pokazuju koeficijenti varijacije (CV %) obje metode koji su manji od 20 %. Granična koncentracija  $CC\alpha$  za potvrdnu LC-MS/MS metodu je 170  $\text{ng}/\text{kg}$  a njena sposobnost dokazivanja  $CC\beta$  190  $\text{ng}/\text{kg}$ , odnosno sposobnost dokazivanja  $CC\beta$  za ELISA metodu je 280  $\text{ng}/\text{kg}$ .

Vrijednosti koncentracija kloramfenikola u vrstama mesa, mesnim proizvodima i ribi prikazane su u Tablici 2. Utvrđene koncentracije kloramfenikola u svim vrstama mesa te proizvodima kretale su se u rasponu od 0,177 do najviše vrijednosti od



Slika 1. LC-MS/MS kromatogram uzorka mesa i otopine standarda kloramfenikola od 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

202,9  $\text{ng}/\text{kg}$  uvrđene u mesu goveda. Nisu utvrđene koncentracije iznad zadane vrijednosti za MRPL od 300  $\text{ng}/\text{kg}$ . Najniža srednja koncentracija od 3,54  $\text{ng}/\text{kg}$  određena je u mesnim proizvodima, a najviša od 15,8  $\text{ng}/\text{kg}$  u mesu goveda. Statističkom analizom utvrđeno je da su koncentracije kloramfenikola određene u mesnim proizvodima značajno niže od vrijednosti određenih u mesu goveda, svinja i peradi ( $p < 0,05$ , svi) te ribe ( $p < 0,01$ ).

Utvrđene najviše koncentracije od 202,9 i 139,2  $\text{ng}/\text{kg}$  analizirane su potvrdnom metodom LC-MS/MS. Utvrđene koncentracije bile su ispod vrijednosti granične koncentracije  $CC\alpha$  od 190  $\text{ng}/\text{kg}$ . Kromatogrami negativnog uzorka i standarda kloramfenikola prikazani su na Slici 1.

Usprkos zabrani primjene ostataka kloramfenikola kontinuirano se pronalaze u svim vrstama proizvoda životinjskog podrijetla što pokazuju podaci sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) u Europskoj Uniji. U zadnjem desetljeću zabilježen je znatan broj prijava upotrebe kloramfenikola u proizvodima životinjskog podrijetla (RASFF 2002. - 2011.). Najveći broj

uzoraka povišenih koncentracija kloramfenikola u mesu (12 slučajeva) zabilježen je tijekom 2003., te u mesu peradi (4 prijave) i ribi (10 slučajeva) 2002. i 2004. godine. Pošiljke koje su sadržavale ostatke kloramfenikola bile su u najvećem broju podrijetlom iz Kine i jugoistočne Azije (WHO, 2004). Tijekom zadnjeg desetljeća RASFF sustavom prijavljene su povišene koncentracije kloramfenikola u: 33 uzorka mesa različitih vrsta životinja, 12 uzoraka mesa peradi, te 19 u ribi i ribljim proizvodima.

Najviše koncentracije kloramfenikola utvrđene RASFF sustavom određene su u Španjolskoj 2002. i 2007. g. u uzorcima jegulje (3,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i sušene svinjetine (> 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) podrijetlom iz Kine. Također, u svježoj piletini podrijetlom iz Belgije 2006. godine utvrđena je koncentracija kloramfenikola od 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Usprede radi, izrazito visoka koncentracija kloramfenikola, od čak 297  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , utvrđena je u Španjolskoj 2002. g. u škampima podrijetlom iz Kine.

U prva tri mjeseca 2011. godine prijavljeni su slijedeći slučajevi povišenih koncentracija kloramfenikola u Europskoj Uniji: riba trlja (0,858  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) podrijetlom iz Vijetnama, slana svinjetina (0,45 i 0,31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) iz Kine,

smrznuta lignja (2,26 i 1,01 µg/kg) podrijetlom iz Indije, te tri pošiljke smrznutih škampi (0,17, 0,23 i 0,24 µg/kg) podrijetlom iz Indije. U nedavnim istraživanjima povišene koncentracije kloramfenikola utvrđene su u tkivu peradi u sjevernoistočnom Iranu te su određene koncentracije od 7 mg/kg u mišiću, 55 mg/kg u bubregu, te najviša koncentracija 155,2 mg/kg u jetri (Tajik i sur., 2010).

Rezultati ove studije ukazuju da su meso goveda, svinja, peradi i mesni proizvodi te riba iz Hrvatske prikladni za konzumaciju s obzirom na određene vrlo niske koncentracije kloramfenikola. Također, sukladno velikom broju utvrđenih slučajevima povišenih koncentracija kloramfenikola u Europskoj Uniji u mesu i ribi te škampima podrijetlom iz Azije, smatramo da postoji potreba za sustavnom kontrolom ovog antibiotika u uvoznim proizvodima iz tog područja.

### Zaključak

U ovome radu primijenjene su validirane i osjetljive metode imunoenzimski ELISA te potvrdna metoda tekućinske kromatografije-tandemske spektrometrije masa LC-MS/MS u određivanju ostatka kloramfenikola u mesu, mesnim proizvodima i ribi. Validacijom je dokazano da obje metode zadovoljavaju odnosno da imaju sposobnost kvantifikacije ispod zadane MRPL vrijednosti od 300 ng/kg.

Određivane koncentracije kloramfenikola u mesu goveda, svinja, peradi, mesnim proizvodima te ribi kretale su se u rasponu od 0,177 do najviše vrijednosti od 202,9 ng/kg odnosno nisu utvrđene koncentracije iznad 300 ng/kg. S obzirom na utvrđene niske koncentracije kloramfenikola može se zaključiti da je meso kontroliranih životinja prikladno za konzumaciju, odnosno provedena kontrola upućuje na zaključak da u Republici Hrvatskoj nema ilegalne uporabe

tog antibiotika.

Sukladno utvrđenim slučajevima povišenih koncentracija u Europskoj Uniji u pošiljkama mesa, ribe te škampa iz Azije, smatramo da je potrebna stalna kontrola uvoznih pošiljaka podrijetlom iz zemalja tog dijela svijeta.

### Literatura

**Akhtar, M. H., K. Abo El Sooud, A. M.**

**Shehata, H. Anwar** (1996): Fate and residues of 14C-chloramphenicol in laying chickens. *J. Environ. Sci. Health B* 31, 1061–1084.

**Anadon, A., P. Bringas, M. R. Martinez-Laranaga, M. J. Diaz** (1994): Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 17, 52–58.

**Anonimno** (2002): Naredba o zabrani primjene određenih veterinarskih lijekova na životinjama čije se meso i proizvodi koriste za prehranu. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH (N. N. br. 4/2002).

**Bogusz, M. M., H. Hassan, E. Al-enazi, Z. Ibrahim, M. Al-tufail** (2004): Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography–electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 807, 343–356.

**Cerkvenik-Flajs, V.** (2006): Performance characteristics of an analytical procedure for determining chloramphenicol residues in muscle tissue by gas chromatography–electron capture detection. *Biomed. Chromatogr.* 20, 985–992

**Dowling, P. M.** (2006): Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, pp. 241–247. 4<sup>th</sup> Edition, Blackwell Publishing.

**EC (1994)**: Commission Regulation (EC) No 2701/94 amending Annexes I, II, III and IV to Council Regulation (EEC) no. 2377/90. *Off. J. Eur. Commun.* L287, 7.

**EC (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. *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8–28.

**EC (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. *Off. J. Eur. Commun.* L71, 17–18.

**EC (2009)**: Regulation (EC) No 470/2009 of the European parliament and of the council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Commun.* L152, 11–22.

**Ferguson, J., A. Baxter, P. Young, G. Kennedy, C. Elliott, S. Weigel, R. Gattermann, H. Ashwin, S. Stead, M. Sharman** (2005): Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex<sup>®</sup> kit chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta* 529, 109–113.

**Gantverg, A., I. Shishani, M. Hoffman** (2003): Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 483, 125–135.

**Impens, S., W. Reybroeck, J. Vercammen, D. Courtheyn, S. Ooghe, K. De Wasch, W. Smedts, H. De Brabander** (2003): Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. *Anal. Chim. Acta* 483, 153–163.

**Kucers, A., S. M. Crowe, M. L. Grayson, J. F. Hoy** (1997): Chloramphenicol and thiamphenicol. In: *The Use of Antibiotics*, pp. 548–599. Butterworth-Heinemann, Oxford.

**Mottier, P., V. Parisod, E. Gremaud, P. A. Guy, R. H. Stadler** (2003): Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 994, 75–84.

**Peng, L., Q. Yueming, C. Huixia, K. Ying, T. Yingzhang, W. Daning, X. Mengxia** (2006): Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Chin. J. Chromatogr.* 24,

## Chloramphenicolkontrolle in Fleischmustern, Fleischerzeugnissen und Fisch

### Zusammenfassung

Zur Kontrolle des illegalen Gebrauchs und zur Kontrolle von Chloramphenicolresten wurden während 2010 aus allen Gebieten Kroatiens Muskelmuster des Gewebes von Geflügel ( $n=33$ ), Rindern ( $n=109$ ) und Schweinen ( $n=46$ ), sowie Fleischerzeugnissen ( $n=21$ ) und Fisch ( $n=7$ ) gesammelt. Die Chloramphenicolkonzentration wurde mittels Orientations-ELISA-Methode festgestellt, sowie durch die Bestätigungsmethode der flüssig-chromatographie-tandem Spektrometrie der Massen (LC-MS/MS). Durch die Validität der Methoden wurde ihre Quantifikationsfähigkeit unter des vorgegebenen Wertes der niedrigst verlangten Wirksamkeit der Methodenausführung von  $0,3 \mu\text{g/kg}$  bewiesen. Die zu bestimmende Chloramphenicolkonzentrationen im Fleisch von Rindern, Schweinen, Geflügel, Fleischerzeugnissen und Fisch bewegte sich in der Spannweite von Minimalwert  $0,177$  bis Maximalwert  $202,9 \text{ ng/kg}$ . Die niedrigste mittlere Konzentration von  $3,54 \text{ ng/kg}$  wurde in Fleischerzeugnissen festgestellt, und die höchste von  $15,8 \text{ ng/kg}$  in Rindfleisch. In keinem der kontrollierten Fleischmuster und Fisch wurden Konzentrationen über  $300 \text{ ng/kg}$  vorgefunden. Mit Bezug auf die niedrigen Chloramphenicolkonzentrationen kann behauptet werden, dass das Fleisch der kontrollierten Tiere für die Konsumation günstig ist, bzw. kann dementsprechend festgestellt werden, dass in der Republik Kroatien der Gebrauchverbot dieses Antibiotikums beachtet wird. In Bezug auf die vorgefundenen höheren Konzentrationen in Fleisch, Fisch und Scampi des asiatische Ursprungs, ist eine ständige Kontrolle der eingeführten Lieferungen aus diesen Ländern nötig.

**Schlüsselwörter:** Chloramphenicol, Fleisch, Fisch, ELISA, LC-MS/MS

## Controllo di cloramfenicolo in campioni di carne, prodotti a base di carne e pesce

### Sommario

Al fine di controllare l'uso illegale e dei residui di cloramfenicolo, durante il 2010 sono stati raccolti i campioni di tessuto muscolare pollame ( $n = 33$ ), i bovini ( $n = 109$ ) e dei suini ( $n = 46$ ), i prodotti a base di carne ( $n = 21$ ) e pesce ( $n = 7$ ), da tutto il territorio croato. Le concentrazioni di cloramfenicolo sono state determinate con il metodo ELISA, mentre il metodo di conferma è stato il metodo di spettrometria di massa cromatografia-tandem (LC-MS/MS). La valutazione dei metodi ha dimostrato la loro capacità di quantificazione al di sotto del valore dato dalla minore efficienza necessaria al  $0,3 \text{ mg/kg}$ . Le concentrazioni di cloramfenicolo misurate in bovini, suini, pollame, prodotti a base di carne e pesce hanno variato da un valore minimo di  $0,177$  fino ad un valore massimo di  $202,9 \text{ ng/kg}$ . La più bassa concentrazione media di  $3,54 \text{ ng/kg}$  è stata trovata in prodotti a base di carne, mentre la più alta  $15,8 \text{ ng/kg}$  nella carne di bovini. In nessun campione di carne o di pesce sono state determinate concentrazioni superiori a  $300 \text{ ng/kg}$ . Visto le bassi concentrazioni di cloramfenicolo determinate, si può concludere che la carne degli animali controllati è adeguato al consumo umano, e di conseguenza che in Repubblica di Croazia si rispetta il divieto di uso di questo antibiotico. In conformità con i casi accertati di elevate concentrazioni in carne, pesce e gamberetti provenienti dall'Asia, è necessario un costante controllo delle spedizioni di importazione dai paesi di questa parte del mondo.

**Parole chiave:** cloramfenicolo, carne, pesce, ELISA, LC-MS/MS

14-18.

**RASFF** (2002): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2003, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2003): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2003, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2004): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2004, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2005): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2005, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2006): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2006, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2007): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2007, Publi-

cations Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2008): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2008, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2009): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2009, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2010): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2010, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.

**RASFF** (2011): Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList>.

**Rønning, H. T., K. Einarsen, T. N. Asp**, (2006): Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/

EC. J. Chromatogr. A 1118, 226-233.

**Scortichini, G., L. Annunziata, M. N. Haouet, F. Benedetti, I. Krusteva, R. Galarni** (2005): ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. Anal. Chim. Acta 535, 43-48.

**Tajik, H., H. Malekinejad, S. M. Razavi-Rouhani, M. R. Pajouhi, R. Mahmoudi, A. Haghazari** (2010): Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. Food Chem. Toxicol. 48, 2464-2468.

**WHO** (2004): Food Additives series: 53, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, pp. 7-84. World Health Organization, Geneva.

Dostavljeno: 28.3.2011.

Prihvaćeno: 9.5.2011. 