

# Određivanje ostataka sulfonamida u mesu, mesnim proizvodima, ribi i jajima

Bilandžić N.<sup>1</sup>, I. Varenina<sup>1</sup>, B. Solomun Kolanović<sup>1</sup>, B. Šimić<sup>2</sup>

znanstveni rad

### Sažetak

U svrhu određivanja ostataka sulfonamida sakupljeni su uzorci mesa (n=350), te mesnih proizvoda kobasica (n=59), paštete (n=13) i šunke (n=8), te ribe (n=46) i jaja (n=278) sa svih područja Republike Hrvatske. Koncentracije sulfonamida određene su validiranim imunoenzimskom metodom. Određena je granica određivanja sulfonamida u jajima od 1,7 µg/kg odnosno 2,1 µg/kg u mišićnom tkivu, a sposobnost dokazivanja metode (CC<sub>β</sub>) za jaja iznosi 4,9 µg/kg, odnosno za mišić 59,9 µg/kg. Koncentracije sulfonamida u mesu i proizvodima, te ribi i jajima kretale su se u rasponu od minimalne vrijednosti od 0,001 do najviše od 84,9 µg/kg. Ni u jednom uzorku kontroliranih uzoraka nije utvrđena koncentracija iznad najviše dopuštene koncentracije od 100 µg/kg. Utvrđene niske koncentracije sulfonamida ukazuju da nije zabilježena zlorabljena uporaba sulfonamida, odnosno da se prilikom njihove primjene pri liječenju životinja pazi na propisanu karenciju lijeka te time nije upitna upotreba mesa i mesnih proizvoda u čovjekovoj prehrani.

**KLjučne riječi:** sulfonamidi, meso, mesni proizvodi, riba, jaja, ELISA

### Uvod

Farmakološki aktivne tvari se još od njihovog otkrića koriste u širokom spektru kako u humanoj, tako i veterinarskoj medicini. Tijekom posljednjih desetljeća njihova intenzivna primjena uzrokovala je popratne pojave na zdravlje ljudi te ekosustav (Kümmer, 2003). U velikom opsegu farmakološke tvari koriste se za suzbijanje bolesti u svim vrstama životinja što za posljedicu ima prisutnost njihovih ostataka u tkivima životinja namijenjenim za prehranu te u proizvodima, mlijeku i jajima. Ulaskom u hranidbeni lanac farmakološke tvari, odnosno njihovi ostaci, posljedično mogu izazvati i poticati alergijske reakcije u čovjeka (Wang i sur., 2006). Uz to, njihovo korištenje dovodi do pojave rezistencije pojedinih patogenih bakterija, što može rezultirati ozbiljnijim zdravstvenim problemima (Choma i sur., 1999; Wise, 2002).

Sulfonamidi su strukturni analozi i kompetitivni antagonisti para-ami-

nobenzojeve kiseline i onemogućuju njeno korištenje u sintezi folne kiseline. Zamjene u amidnoj skupini (NH<sub>2</sub>) imaju različite učinke na antibakterijsku aktivnost molekule sulfonamida (Campbell, 1999). Sulfonamidi su desetljećima bili primjenjivani u humanoj medicini za tretman različitih vrsta infekcija. Ove sintetičke kemijske tvari imaju široki spektar djelovanja protiv većine gram-pozitivnih i mnogih gram-negativnih mikroorganizama. Prema kategorizaciji veterinarski aktivnih supstanci prema njihovoj važnosti u primjeni protiv bolesti, sulfonamidi su uz amiloglikozide, makrolide cefalosporine, peniciline, tetracikline i kinolone svrstani u kritično važne farmakološki aktivne tvari (FAO/WHO/OIE, 2007). Danas se u razmjerno velikim količinama primjenjuju za tretiranje i prevenciju respiratornih infekcija, infekcija genitalno-urinarne trakta, infekcija trbušnog i mekog tkiva, uključujući razne infekcije, te difterije u domaćih životinja (Hormazabal i sur.,

1993; Campbell, 1999; Wise, 2002). Prednost sulfonamida je i u njihovoj niskoj cijeni te se naširoko koristi kao promotori rasta i antimikrobiološki agensi u stočarstvu (Hela i sur., 2003). Danas se najviše primjenjuju u kombinaciji s diaminopirimidinom trimetoprimom zbog sinergističkog djelovanja (Kunec-Vajić, 2004).

Primjenu sulfonamida karakterizira kratko djelovanje, biotransformacija u jetri postupcima acetiliranja ili glukuronizacije, te brzo izlučivanje iz organizma, čime se maksimalno moguće osigurava minimalna opasnost od toksičnosti. Neželjeni potencijalni učinci u ljudi su poremećaj urinarnog trakta, porfirija i reakcija preosjetljivosti. Sulfonamidi oštećuju i homeopatski sustav odnosno izazivaju trombocitopeniju, anemiju, leukopeniju i različite promjene na koži (Seol i sur., 2010).

U svrhu određivanja sulfonamida danas se primjenjuju mikrobiološke metode (Gaudin i sur., 2004; Marcin-

Tablica 1. Rezultati iskorištenja i preciznosti ELISA metode za određivanje sulfonamida u uzorcima mesa i jajima.

Metoda	Dodana koncentracija (µg/kg)	Izmjerena koncentracija (µg/kg)	Iskorištenje (%)	Standardna devijacija	CV (%)
Mišićno tkivo	25	25,25	99,5	18,5	18,6
	50	43,9	87,2	14,6	16,7
	100	54,2	53,9	9,3	17,2
	Srednja vrijednost		80,2	14,1	17,5
jaja	10	9,5	94,5	22,9	24,2
	25	19,9	79,5	16,3	20,5
	50	38,0	76,1	14,6	19,2
	Srednja vrijednost		83,4	17,9	21,3

Tablica 2. Koncentracije sulfonamida (mg/kg) u mesu, mesnim proizvodima, ribi i jajima.

Proizvod	Broj uzoraka	Koncentracije sulfonamida (mg/kg)			
		Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Standardna devijacija
jaja	278	0,004	84,9	2,27	0,32
riba	46	0,001	31,6	3,37	5,97
meso	350	0,59	44,5	2,76	3,63
kobasica	59	0,64	19,9	2,28	2,55
pašteta	13	1,16	3,64	2,38	0,79
šunka	8	1,10	2,73	1,91	0,63

ček i sur., 2006; Janošová i sur., 2007; Schneider i sur., 2009) i imunoenzimski testovi (Cliquet i sur., 2003; Zhang i Wang, 2009), te u najvećoj mjeri za detekciju i potvrdu povišenih koncentracija tekućinska kromatografija kombinirana sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) (Boglialli i sur., 2003; Biak-Bielinska, 2009; Forti i Scorticini, 2009; Garcia-Galan i sur., 2010; Won i sur., 2011).

U ovom radu koncentracije ostataka sulfonamida sulfametazina, sulfamerazina, sulfisoksazola, sulfadiazina i sulfakloropiridazina određivane su primjenom imunoenzimске metode u mišićnom tkivu odnosno mesu, mesnim proizvodima kao što su kobasice, paštete i šunka te u tkivu riba i jajima.

### Materijal i metode

#### Uzorkovanje

Sakupljeni su uzorci svih vrsta mesa (n=350), te mesnih proizvoda

odnosno kobasica (srijemska, bečka, čajna, posebna, itd., n=59), paštete (n=13) i šunke (n=8), te ribe (n=46) i jaja (n=278) sa svih područja Republike Hrvatske. Uzorci su držani na hladnom do dolaska u laboratorij, a zatim su homogenizirani i zamrznuti na -18°C do analize.

#### Kemikalije

Za analizu sulfonamida ELISA metodom korišten je test Multi-Sulfonamides EIA (type 5101SULMp), proizvođača Euro Proxima B.V. (Arnhem, Nizozemska) opremljen sa: mikrotitarska pločica (96 jažica), standardne otopine sulfonamida od 0, 0,125, 0,25, 0,5, 0,8, 2,5 i 5 ng/mL, otopina enzim-konjugata (sulfonamid vezan peroksidazom), liofilizirana antitijela anti-sulfonamida, supstrat/kromogen otopina (tetrametilbenzidini), pufer za razrjeđivanje, stop otopina (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i koncentrirani pufer za ispiranje.

Standardi sulfametazina, sulfamerazina, sulfisoksazola, sulfadiazi-

na i sulfakloropiridazina nabavljeni su od proizvođača Sigma (St. Louis, Sjedinjene Države). Metanol, natrij hidrogenfosfat x 2 H<sub>2</sub>O i natrij klorid nabavljeni su od Kemike (Zagreb, Hrvatska). Dušik 5,5 nabavljen je od SOL spa (Monza, Italija). Etili acetat, kalij dihidrogenfosfat, izooktan i kloroform nabavljeni su od Mercka (Darmstadt, Njemačka). Pufer za ekvibraciju uzorka (Multi Sulfonamide Sample Equilibration Buffer) nabavljen je od Euro Proxima, B.V. (Arnhem, Nizozemska).

Otopine standarda sulfonamida (sulfametazina, sulfamerazina, sulfisoksazola, sulfadiazina ili sulfakloropiridazina) pripremane su tjedno otapanjem u metanolu. Radne otopine standarda za obogaćivanje uzoraka mišićnog tkiva i jaja pripremane su otapanjem u metanolu na različitim koncentracijama prije svake analize.

U analizama je korištena ultracista voda (18,2 MW/cm) dobivena sustavom NIRO VV UV UF 20 (Nirosta d.o.o. Water Technologies, Osijek, Hrvatska).

#### Aparatura

U pripremi uzoraka korišteni su sljedeći uređaji: mješalica Ultra-Turrax® (IKA® -WERKE GMBH & CO.KG, Germany), centrifuga Rotanta 460R (Hettich zentrifugen, Tuttingen, Njemačka), vodena kupelj GFL model 1083 (Gesellschaft für Labor Technik mbH, Burgwedel, Njemačka), pH metar inoLAB WTW (Willheim, Njemačka) i uparivač dušikom N-EVAP model 111 (Organoation Associates Inc., Berlin, Sjedinjene Države).

Mikročitačem Tecan model Sunrise (Tecan Austria GmbH, Austrija) korišten je za očitavanje vrijednosti apsorbance ELISA metode.

#### Priprema uzoraka tkiva i jaja

Odvaže se 1 g homogeniziranih uzoraka jaja i tkiva i miješa sa 5 mL acetonitrila te miješa vorteksom namanje 30 minuta. Uzorci se zatim

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

<sup>2</sup> dr. sc. Branimir Šimić, redoviti profesor, Laboratorij za toksikologiju, Prehrambeno-biotehnički fakultet, Zagreb

centrifugiraju 5 minuta na 2000 x g. Supernatanti se prebace u epruvete od 10 mL i otpare do suha u struji dušika na 40 °C. Pipetira se 1 mL etilacetatnog supernatanta u čistu epruvetu te se otapalo otpari do suhoga u blagoj struji dušika na 50 °C. Ostatak u epruveti otpari se u 1 mL fosfatnog pufera (PBS, pH 7.4). Uzorak se odmasni dodatkom 1 mL smjese izooktan/triklorometana (2:3, v/v). Miješa se vorteksom nekoliko sekundi i centrifugira 5 minuta na 2000 x g. Pipetira se 100 mL supernatanta u čistu epruvetu i dodaje 300 mL PBS, a za test se koristi 50 mL ovakve otopine.

**ELISA test**

Prije analize sve kemikalije se 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 razrijedi se 100 x u puferu za razrjeđivanje (npr. 10 µL konjugata + 990 µL pufera za razrjeđivanje). Također, liofilizirano antitijelo rekonstituiraju se dodavanjem 6 mL pufera za razrjeđivanje te dobro promiješa.

Postupak testa provodi se slijedećim redoslijedom dodavanja reagenasa u jačice: dodaje se 50 µL otopina standarda od 0 do 5 ng/mL, te 50 µL otopine uzoraka u duplikatu. Zatim se dodaje 25 µL pripremljene otopine enzim-konjugata u svaku jačicu i 25 µL pripremljene otopine antitijela u svaku jačicu. Ploče se dobro zatvori te snažno protrese (1 minutu) te inkubira u tami na 4°C kroz 1 sat. Zatim se ukloni otopina iz ploče i ispere tri puta sa puferom za ispiranje (tri puta po 300 µL). Nakon svakog istresanja otopine za ispiranje na novi čisti upijajući papir, do kraja se isprazne jačice lupkajući pločicom o njega. Dodaje se 100 µL otopine supstrata/kromogena u svaku jačicu i dobro promiješa. Inkubira se 30 minuta u tami na sobnoj temperaturi, a zatim dodaje 100 µL stop otopine u svaku jačicu i dobro promućka. Vrijednosti apsorbance očita-

vaju se na 450 nm unutar 30 minuta.

**Validacija ELISA metode**

Validacija metode provodena je prema kriterijima direktive Europske Unije 2002/657/CE za orijentacijske (EC, 2002). Specifičnost metode određena je analizom 20 negativnih uzoraka mišićnog tkiva i jaja. Sposobnost dokazivanja CCβ određena je obogaćivanjem 20 uzoraka jaja i tkiva na koncentraciju ispod MRL (50 µg/kg) te je izračunata kao zbroj izračunate vrijednosti granične koncentracije CCα i standardne devijacije uzoraka 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.

Iskorištenje i preciznost metode određeni su obogaćivanjem uzoraka tkiva odnosno jaja otopinom sulfonamida u tri serije na 3 koncentracijske razine (tkiva: 25, 50 i 100 µg/kg; jaja: 10, 25 i 50 µg/kg) po 6 ponavljanja.

**Statistička analiza**

Statistička analiza provedena je programom Statistica<sup>®</sup> 6.1 (StatSoft<sup>®</sup>, Inc., Tulsa, Sjedinjene Države). Koncentracije sulfonamida određene u mesu, proizvodima, ribi i jajima izražavane su kao minimalna i maksimalna određena koncentracija, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Rezultati i diskusija**

Ostaci sulfonamida, kao sastojaka farmaceutskih pripravaka primijenjenih u veterini, putem prehrambenog lanca mogu se naći u mesu, proizvodima odnosno jajima te izazvati neželjene utjecaje u čovjeka. U svrhu zaštite zdravlja potrošača u državama Europske Unije provodi se kontrola ostataka sulfonamida u namirnicama životinjskog podrijetla. Najveće dopuštene količine ostataka (NDK) svih tvari iz skupine sulfonamida u jestivim tkivima (mišić, jetra, bubrež, masno tkivo) svih vrsta životinja koje

se koriste za proizvodnju hrane te mlijeku u Europi (EC, 2010), odnosno Hrvatskoj (N. N. br. 21/2011), kao i Kanadi i Sjedinjenim Državama su 100 µg/kg, dok je npr. u Japanu NDK 20 µg/kg (Zhang i sur., 2011). Za jaja nisu utemeljene granične koncentracije sulfonamida pa uzorci jaja ne smiju sadržavati ostatke ovih tvari. Iz tog razloga koriste se osjetljive analitičke metode koje su sposobne detektirati pojedine supstance pri vrlo niskim koncentracijskim razinama.

U ovome radu primijenjena je imunoenzimka metoda za koju se određeni rezultati iskoristištenja odnosno točnosti prikazani u Tablici 1. Validacijom metode utvrđeno je ukupno iskoristištenje metode od 80,2 % za uzorke mišićnog tkiva odnosno za jaja od 83,4 %. Rasipanje rezultata metode nije značajno što pokazuju koeficijenti varijacije (CV %) manji od 20 % za obje vrste uzorka. Granica određivanja sulfonamida je 1,7 µg/kg za jaja odnosno 2,1 µg/kg za mišićna tkiva. Utvrđena je sposobnost dokazivanja metode CCβ za jaja 4,9 µg/kg, odnosno za mišić 59,9 µg/kg. Utvrđene vrijednosti CCβ su ispod zadanih NDK vrijednosti za tkiva, odnosno vrijednosti iskoristištenja za obje vrste uzorka veće od 70 %, što je skladno zahtjevima za provođenje analitičkih metoda prema direktivi 2002/657 (EC, 2002).

Koncentracije sulfonamida u uzorcima mesa, mesnih proizvoda (kobasice, šunke, paštete), ribe i jaja prikazane su u Tablici 2. Srednje koncentracija kretale su se u rasponu od 1,91 do 3,37 µg/kg u uzorcima te su za 30 do 50 puta niže od NDK vrijednosti. Maksimalna vrijednost sulfonamida od 84,9 µg/kg utvrđena je u uzorku jaja. Dobiveni rezultati ukazuju da nije zabilježena zlouporaba korištenja sulfonamida odnosno da se prilikom njihove primjene pri liječenju životinja pazi na propisanu karenciju lijeka te time nije upitna upotreba mesa i mesnih proizvoda u čovjekovoj prehrani.

Praćenjem količina sulfonamida u Italiji od ukupnog broja pretraženih uzoraka 4 uzorka imala su koncentracije sulfokvinksalina iznad 50 µg/kg te je u jednom uzorku jetre prelazio NDK vrijednost i iznosio 116 µg/kg utvrđene u jetri peradi (Weiss i sur., 2007). Povišene koncentracije sulfonamida (10 do 30 µg/kg) utvrđene su u 5 uzoraka ribe iz uzgajališta riba u Sloveniji, a među njima jedan uzorak je sadržavao 130 µg/kg sulfamerazina (Šinigoi-Gačnik i sur., 2005). U ovome radu najviša određena koncentracija sulfonamida u uzorcima mišićnog tkiva riba iznosila je 31,6 µg/kg.

Kontrola sulfonamida u proizvodima mora u Koreji pokazala je povišene koncentracije sulfadiazina u 2 uzorka, ali s vrijednostima ispod NDK vrijednosti (Won i sur., 2011). Međutim, u jednom uzorku jegulje određen je sulfametaksol u koncentraciji od 5 104 µg/kg (Won i sur., 2011). Sustavom brzog uzbuñivanja za hranu i hranu za životinje u Europskoj Uniji (RASFF, engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) od 2000. do 2011. godine prijavljeno je 13 slučajeva povišenih koncentracija sulfonamida od kojih se 12 uzoraka odnosilo na med, a samo jedan uzorak rakova iz uzgoja prijavljen je u Italiji (RASFF, 2011).

Sulfonamidni se i dalje u velikoj mjeri koriste, te ponovo dobivaju na interesu u slučajevima infekcija izazvanih bakterijama rezistentnim na druge antibiotike i dalje se primjenjuju u tretmanu životinja važnih u čovjekovoj prehrani. Stoga je njihova kontrola primjenom osjetljivih metoda neminovna. Dobiveni rezultati ukazuju da nije zabilježena zlouporaba korištenja sulfonamida jer nije utvrđen niti jedan uzorak s koncentracijama višim od 100 µg/kg. To sugerira da se pri njihovoj primjeni u liječenju životinja pazi na propisanu karenciju lijeka te time nije upitno korištenje mesa i mesnih proizvoda u čovjekovoj prehrani.

**Zaključak**

U ovome radu koncentracije sulfonamida određivane su validiranim imunoenzimskom metodom. Validacijom metode utvrđena je granica određivanja sulfonamida u jajima od 1,7 µg/kg odnosno 2,1 µg/kg u mišićnom tkivu, te sposobnost dokazivanja metode (CCβ) od 4,9 µg/kg za uzorke jaja, odnosno 59,9 µg/kg za mišić.

Koncentracije sulfonamida u mesu, mesnim proizvodima (kobasice, paštete, šunke), te ribi i jajima kretale su se u rasponu od 0,001 do najviše od 84,9 µg/kg. Nije utvrđen niti jedan uzorak sa koncentracijom iznad najviše dopuštene koncentracije od 100 µg/kg. Određene niske koncentracije sulfonamida ukazuju na ispravno korištenje ovih antibiotika te su ispitivani uzorci prikladni za konzumaciju.

**Literatura**

Bialk-Bielinska, A., J. Kumirska, R. Palavinkas, P. Stepnowski (2009): Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* 80, 947-953.  
 Bogjalli, S., R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, M. Sergi (2003): Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to a single- or triple-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1146-1156.  
 Campbell, K. L. (1999): Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. *Vet. Dermatol.* 10, 205-215.  
 Choma, I., D. Grenda, I. Malinowska, Z. Suprynovic (1999): Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr. B* 734, 7-14.  
 Cluquet, P., E. Cox, W. Haasnoot, F. Schacht, B. M. Godderis (2003): Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal. Chim. Acta* 494, 21-28.  
 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.* L231, 8-28.  
 EC (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22

December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L15, 1-72.  
 FAO/WHO/OIE (2007): Report of the FAO/WHO/OIE expert meeting FAO. Joint of FAO/WHO/OIE expert meeting of critically important antimicrobials. Rome, Italy.  
 Finegold, S. M., I. Ziment (1968): Sulfonamides, nitrofurans, and nalidixic acid. U: *The Pediatric Clinic of North America: Antimicrobial Therapy*, Vol. 15. (Kagan, B.M., ured.), W. B. Saunders Company, Philadelphia.  
 Forti, A. F., G. Scortichini (2009): Determination of ten sulfonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 637, 213-219.  
 Garcia-Galin, M. J., M. S. Diaz-Cruz, D. Barceló (2010): Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* 81, 355-366.  
 Gaudin, V., P. Maris, R. Fuselle, J.-L. Ribouchon, N. Cadieu, A. Rault (2004): Validation of a microbiological method: The STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit. Contam.* 21, 422-433.  
 HeLa, W., M. Brandtner, R. Wiedl, R. Schuh (2003): Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. *Food Chem.* 83, 601-608.  
 Hormazabal, V., I. Steffanak, M. Yndestad (1993): Simultaneous determination of residues of flufenicol and the metabolite flufenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 616, 161-165.  
 Janošová, J., I. Kožárová, D. Matěš, M. Kovalíková (2007): A comparison of the sensitivity of antibiotic residue screening methods – four plate test (FPT), the screening test for antibiotics residues (STAR), and Premi test to sulphonamide standards. *Meso IX* (1), 37-43.  
 Kunec-Vajčić, E., M. Bulat, V. Gjuriti (1993): Medicinska farmakologija. 1. izdanje. Medicinska naklada Zagreb, Zagreb.  
 Kimmereer, K. (2003): Significance of antibiotics in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 5-7.  
 Marčinkić, S., K. Hussein, N. Zdolec, J. Janošová (2006): PremiTest – fast screening test for detection of sulphonamide residues in poultry tissues. *Meso VII* (5), 276-279.  
 Anonimno (2011): Pravilnika o farmakološki dje-

### Determination of sulfonamide residues in meat, meat products, fish and eggs

#### Summary

For the purpose of controlling sulfonamides, samples of meat (n=350), then meat products such as sausages (n=59), pates (n=13) and hams (n=8) and also fish (n=46) and eggs (n=278) were collected from all areas of the Republic of Croatia. The concentration of sulfonamides was determined using validated enzyme immunoassay. The method detection limit was 1.7 µg/kg for egg and 2.1 µg/kg for meat, and the detection capability (CCB) was 4.9 µg/kg for eggs and 59.9 µg/kg for meat. Determination of sulfonamide concentrations in meat, meat products, fish and eggs ranged from the minimum value of 0.001 to the maximum value of 84.9 µg/kg. There is no concentration exceeding the maximum residue levels (MRL) of 100 µg/kg determined in any of the samples tested. Considering the low concentrations of sulfonamides established, it can be concluded that there is no misusage of sulfonamides and that when animals are treated, drug withdrawal period is taken into account and in that way usage of the controlled meat is suitable for consumption.

**Key words:** sulfonamides, meat, meat products, fish, egg, ELISA

### Bestimmung von Sulfonamidresten in Fleisch, Fleischzeugnissen, Fisch und Eiern

#### Zusammenfassung

Zur Bestimmung von Sulfonamidresten wurden aus allen Gebieten der Republik Kroatien Muster von Fleisch (n=350), Fleischzeugnissen (n=59), Pasteten (n=13) und Schinken (n=8), Fisch (n=46) und Eiern (n=278) gesammelt. Die Konzentrationen von Sulfonamid wurden mittels validierten Immunoenzymen Methode bestimmt. Die Grenze der Bestimmung von Sulfonamid wurde festgesetzt, in Eiern von 1,7 µg/kg bzw. 2,1 µg/kg im Muskelgewebe, und die Beweisfähigkeit der Methode (CCB) für Eier beträgt 4,9 µg/kg bzw. für Muskel 59,9 µg/kg. Die Konzentrationen von Sulfonamid in Fleisch und Fleischzeugnissen, in Fisch und Eiern, bewegten sich in der Spanne von Minimalwert 0,001 bis Maximalwert 84,9 µg/kg. In keinem der kontrollierten Muster wurde höhere Konzentration als genehmigte Konzentration von 100 µg/kg vorgefunden. Die festgestellten niedrigen Konzentrationen von Sulfonamid weisen darauf hin, dass kein Missverbrauch von Sulfonamid stattfand, bzw. dass bei dessen Anwendung bei Tierpflege und Tiergesundheit die vorgeschriebene Karenz des Medikamentes beachtet wurde, womit der Verbrauch von Fleisch und Fleischzeugnissen in menschlicher Ernährung nicht in Frage gestellt wird.

**Schlüsselwörter:** Sulfonamide, Fleisch, Fleischzeugnisse, Fisch, Eier, ELISA

### Determinazione di residui di sulfonamidi nella carne, prodotti di carne, nel pesce e le uova

#### Somario

Volendo determinare i residui di sulfonamidi, da tutte le parti della Repubblica di Croazia sono stati presi i campioni di carne (n=350), e dei prodotti di carne – salsicce (n=59), pâté (n=13) e prosciutto (n=46), ma anche pesce (n=46) e uova (n=278). Le concentrazioni di sulfonamidi sono state determinate con un validato metodo immunoenzimatico. È stato determinato il confine di determinazione di sulfonamidi nelle uova di 1,7 µg/kg cioè di 2,1 µg/kg nel tessuto muscolare, e l'abilità d'approvazione del metodo (CCB) 4,9 µg/kg per le uova, cioè 59,9 µg/kg per il muscolo. Le concentrazioni di sulfonamidi nella carne e nei suoi prodotti, e nel pesce e le uova, variavano dal valore minimo di 0,001 a quello massimo di 84,9 µg/kg. Non c'era nemmeno un campione che sovrappassava la determinata concentrazione permessa di 100 µg/kg. Le determinate basse concentrazioni di sulfonamidi sono la prova del loro corretto uso ed è evidente che si presta l'attenzione alla carenza prescritta del medicamento durante la loro applicazione nella cura di animali, e perciò non bisogna dubitare dell'uso di carne e dei prodotti di carne nell'alimentazione dell'uomo.

**Parole chiave:** sulfonamidi, carne, prodotti di carne, pesce, uova, ELISA

latrim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (Narodne novine broj 21/2011).

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

**Schneider, M. J., K. Mastovska, S. J. Lehotay, A. R. Lightfield, B. Kinsella, C. E. Shultz** (2009): Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. *Anal. Chim. Acta* 637, 40-46

**Sukul, P., M. Spittler** (2006): Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 187, 67-101.

**Šeol, B., K. Matanović, S. Terzić** (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. *Utr. Herak-*

**Perković, V.**, Medicinska naklada, Zagreb.

**Šinigoj-Gučnik, K., V. Cerkvenik-Flajš, S. Vadrnjak** (2005): Evidence of veterinary drug residues in Slovenian Freshwater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 109-114.

**Wang, J., D. Leung, S. P. Lenz** (2006): Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 54, 2873-2880.

**Wise, R.** (2002): Antimicrobial resistance: priorities for action. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 585-586.

**Weiss, C., A. Conte, C. Milandri, G. Scortichini, P. Sempinini, R. Usberti, G. Migliorati** (2007): Veterinary drugs residue monitoring in Italian poultry: Current strategies and possible developments. *Food*


*Control* 18, 1068-1076.

**Won, S. Y., C. H. Lee, H. S. Chang, S. O. Kim, S. H. Lee, D. S. Kim** (2011): Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. *Food Control* 22, 1101-1107.

**Zhang, W., S. Wang** (2009): Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *J. Immunol. Meth.* 350, 1-13.

**Zhang, W., C. Duan, M. Wang** (2011): Analysis of seven sulfonamides in milk by cloud point extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 126, 779-785.

Dostavljeno: 30.9.2011.

Prihvaćeno: 28.10.2011. 

## Učinak dodatka selena u hranu na kakvoću mesa peradi

Pušić<sup>1</sup>, I., L. Kozadžinski<sup>2</sup>, B. Njari<sup>2</sup>, Ž. Čvrtla Fleck<sup>2</sup>

pregledni rad

### Sažetak

Kakvoća mesa procjenjuje se na osnovi nekoliko objektivnih, uglavnom vanjskih obilježja. Pa su tako u količinske pokazatelje tržišne i preradbene vrijednosti mesa, značajna i ona svojstva koja neposredno utječu na ocjenu njegove kakvoće, prvenstveno senzorička i tehnološko-preradbeno svojstva. Jedan od prihvaćenih pristupa očuvanja navedenih svojstava mesa jest i dodatak antioksidansa, poput selena ili vitamina E, direktno u stočnu hranu ili tijekom tehnološkog procesa obrade. Brojna istraživanja potvrđuju pretpostavku kako upotreba organskog selena dovodi do povećanja ukupne količine selena u mesu peradi uz istovremeno povećanje senzoričkih, preradbenih i preradbenih svojstava mesa u smislu očuvanja zdravstvene ispravnosti tijekom pohrane u različitim temperaturnim i vremenskim uvjetima. Meso peradi se pokazalo kao važan izvor selena u prehrani ljudi posebno u zemljopisnim područjima čija su tla siromašna selenom gdje se ubraja i područje Republike Hrvatske dok se u nekim područjima obavlja i gnojidba poljoprivrednih površina sa preparatima selena.

**Ključne riječi:** selen, kakvoća mesa peradi

### Uvod

Selen (Se), esencijalni element u tragovima, važan je čimbenik zdravlja sisavaca jer utječe na rast, imunitet, mišićnu i neuromišićnu funkciju, plodnost, a očituje i antikancerogeno djelovanje. Svakodnevno uzimamo Se ima bitnu ulogu u zaštiti od karcinoma prostate, kolona, pluća (Clark i sur., 1996.). Nadalje, važan je i u razvoju imunološkog sustava organizma (Taylor, 1995.), pojačava djelovanje T-limfocita (Roy i sur., 1994.). Može štiti od toksičnog učinka teških metala, dima cigarete, alkohola, oksidacije masti, a posebno od oštećenja živom i kadmijem (Izardus i sur., 2010.). Svoje djelovanje ispoljava u obliku selenocisteina, aminoselena koja je sastavni dio brojnih enzima i neenzimskih molekula koje se zbog svoje građe nazivaju selenoproteini. Pri tome najvažniji su enzim glutatjon peroksidaza, tirodoksinkin reduktaza, selenoprotein P, jodotironin dehidrogenaza, seleno-fosfat sintetaza i selenoprotein W (Suraj, 2006.).

Spomenuti razlozi ukazuju kako je potreba za unosom selena u organizam velika, te se osim upotrebe dnevnih dodataka organskog selena (tablete), smatra kako je hrana (meso, mlijeko, jaja) obogaćena selenom u tom smislu najvrednija (Rayman, 2000.). Istraživanja pokazuju da je u Republici Hrvatskoj povrće siromašno selenom, pa su jaja, meso i mesni proizvodi najbolji izvor tog mikroelementa (Klavec i sur., 2004.).

Nema sumnje da su za uspjeh uzgoja životinja ključni dobar prirast uz povoljnu konverziju obroka i niski mortalitet. Za klaoničare je uvijek značajan visoki prirast mesa, te ujednačenost trupova sa što manjim gubicima nastalim zbog oštećenja pri klaoničkoj obradi. S druge, pak, strane trgovački lanci žele što više udovoljiti željama potrošača koji traže povoljniju boju i dobar izgled obrađenih trupova uz povoljan odnos mesa i kostiju, a posebno sočnost, dobar miris i okus mesa ili proizvoda od mesa. S

obzirom na veliku količinu višestruko nezasićenih masnih kiselina koje se tijekom pohrane u kontaktu s kisikom razlažu na kratko lančane spojeve poput (aldehida, ketona, kiselina i alkohola) što u konačnici dovodi do kvarenja te time i do smanjene prehrambene vrijednosti i ekonomskih gubitaka.

Osim količinskih pokazatelja tržišne i preradbene vrijednosti mesa, bitna su i ona svojstva koja neposredno utječu na ocjenu njegove kakvoće, prvenstveno senzorička i tehnološko-preradbeno svojstva. Kakvoća mesa procjenjuje se na osnovi nekoliko objektivnih, uglavnom vanjskih obilježja. Ovdje treba svakako navesti boju, nježnost odnosno žilavost i sočnost mesa pri čemu su promjena boje mesa i stupanj oksidacije masti svakako vrlo važni u ocjeni kakvoće mesa. Važni su također i količina mišićne mase, sposobnost vezanja vode što je naročito važno za preradu, kao i gubitak vode kuhanjem (Živković,

<sup>1</sup> dr.sc. Ivan Pušić, viši inspektor zaštite okoliša, Ministarstvo zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva, Zagreb, Republike Austrije 20  
<sup>2</sup> dr.sc. Lidija Kozadžinski, redoviti profesor; dr.sc. Bela Njari, redoviti profesor; dr.sc. Željka Čvrtla Fleck, docentica; Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Zagreb, Heinzelova 55