

## RISK ASSESSMENT OF NITROFURANS IN ARMENIAN HONEY

**MELINE BEGLARYAN**

PhD, Head of Food Security and Nutrients Assessment Group at the Informational-Analytical Center for Risk Assessment of Food Chain, Center for Ecological-Noosphere Studies, NAS RA  
*meline.beglaryan@cens.am*

**DAVIT PIPOYAN**

Head of the Informational-Analytical Center for Risk Assessment of Food Chain,  
Center for Ecological-Noosphere Studies, NAS RA,  
Doctor in Food Science (Italy)  
*david.pipoyan@cens.am*

**VICTORIA CHIRKOVA**

Research Laboratory Assistant at the Informational-Analytical Center for Risk Assessment of Food Chain,  
Center for Ecological-Noosphere Studies, NAS RA  
*victoria.chirkova@cens.am*

**DOI: 10.54503/2579-2903-2024.1-153**

### **Abstract**

The development of the country and care for its population, along with the growing demand for Armenian honey abroad, require compliance with increasingly stringent safety and quality standards for this product.

Based on the detection of residues of contaminants in Armenian honey, researchers from CENS are concerned about the potential risk to consumers. Besides the health risk to consumers, the presence of contaminations in honey could have a negative impact on the export of the product and its contribution to the country's economy.

The article analyzed data from tested samples of Armenian honey for the presence of nitrofurans metabolite residues. According to the test results, out of the four metabolites, only one metabolite, 1-aminoguanidine (AHD), was detected in the honey samples. To assess the risk, the Margin of Exposure (MOE) method and the formation of homogeneous consumer clusters were used, considering different daily honey consumption levels and gender of consumers. Also, the worst-case scenario was considered, simulating an increase in the daily consumption of honey with a maximum concentration of AHD. The results showed safe MOE values for all consumer groups, indicating no concerns associated with nitrofurans exposure. Moreover, the worst-case scenario demonstrates the possibility of increasing the daily consumption of honey without harmful effects on the consumers. Nevertheless, the presence of contaminant in honey is a cause for concern.

The absence of adverse effects of the pollutant in this study doesn't exclude that other studies will find a risk to the health of consumers. Contamination of the product on any level is an occasion for more thorough research, re-evaluation of the rules of production and quality control of honey.

**Key words and phrases:** food safety, contaminant, daily consumption, exposure.

## ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՄԵԴԻԱ ՄԵՋ ՆԻՏՐՈՖՈՒՐԱՆՆԵՐԻ ՌԻՍԿԻ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄ

### ՄԵԼԻՆԵ ԲԵԳԼԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ էկոլոգանոսֆերային հետազոտությունների կենտրոնի  
սննդի շղթայի ռիսկերի գնահատման տեղեկատվական  
վերլուծական կենտրոն,  
պարենային անվտանգության և սննդանյութերի  
գնահատման խմբի ղեկավար,  
տեխնիկական գիտությունների թեկնածու  
*meline.beglaryan@cens.am*

### ԴԱՎԻԹ ՊԻՊՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ էկոլոգանոսֆերային հետազոտությունների կենտրոնի  
սննդի շղթայի ռիսկերի գնահատման տեղեկատվական վերլուծական  
կենտրոնի ղեկավար,  
սննդագիտության դոկտոր (Իտալիա)  
*david.pipoyan@cens.am*

### ՎԻԿՏՈՐԻԱ ՉԻՐԿՈՎԱ

ՀՀ ԳԱԱ էկոլոգանոսֆերային հետազոտությունների կենտրոնի  
սննդի շղթայի ռիսկերի գնահատման տեղեկատվական  
վերլուծական կենտրոնի  
լաբորանտ-հետազոտող  
*victoria.chirkova@cens.am*

### Համառոտագիր

Երկրի զարգացումը և նրա բնակչության նկատմամբ մտահոգությունը, ինչպես նաև արտերկրում հայկական մեդրի աճող պահանջարկը ստիպում են պահպանել այս արտադրանքի անվտանգության և որակի ավելի խիստ պահանջները: Հայկական մեդրի մեջ աղտոտիչների մնացորդային քանակությունների հայտնաբերման դեպքերով պայմանավորված՝ հետազոտողները մտահոգված են սպառողների համար հնարավոր ռիսկի առկայությամբ: Բացի սպառողների առողջության համար վտանգից, մեդրի մեջ աղտոտիչների առկայությունը կարող է բացասաբար ազդել արտադրանքի արտահանման և երկրի տնտեսության մեջ դրա ներդրման վրա:

Սույն հոդվածում իրականացվել է հայկական մեդրի փորձանմուշներում նիտրոֆուրանի մետաբոլիտների մնացորդների առկայության վերաբերյալ տվյալների վերլուծություն: Փորձարկման արդյունքների համաձայն՝ չորս մետաբոլիտներից մեդրի նմուշներում հայտնաբերվել է մեկ մետաբոլիտ՝ 1-ամինոհիդրանտոինը (AHD): Ռիսկի գնահատման համար կիրառվել է «ներգործության սահմանի» մեթոդը (MOE) և սպառողների հոմոգեն կլաստերների ձևավորումը՝ հաշվի առնելով մեդրի օրական սպառման տարբեր քանակներն ու սպառողների սեռը: Դիտարկվել է նաև վատագույն սցենարը՝ ենթադրելով AHD-ի առավելագույն կոնցենտրացիա պարունակող մեդրի օրական սպառման

ավելացումը: Արդյունքները ցույց են տվել անվտանգ MOE արժեքներ սպառողների բոլոր խմբերի համար, ինչը վկայում է, որ նիտրոֆուրանի ներգործության մասով մտահոգություններ չկան: Ավելին, վատագույն սցենարի դիտարկման արդյունքում, պարզվել է, որ հնարավոր է մեղրի օրական սպառման ավելացում՝ առանց սպառողների վրա բացասական ազդեցության: Այնուամենայնիվ, մեղրի մեջ աղտոտիչի առկայությունը մտահոգիչ է:

Սույն հետազոտության շրջանակում աղտոտիչի բացասական ազդեցության բացակայությունը չի բացառում, որ այլ ուսումնասիրությունների արդյունքում կարող են սպառողների առողջության համար ռիսկեր հայտնաբերվել: Արտադրանքի ցանկացած մակարդակի աղտոտումը պատճառ է առավել մանրակրկիտ հետազոտության, մեղրի արտադրության կանոնների վերազնահատման և որակի վերահսկման համար:

**Բանալի բառեր և բառակապակցություններ.** մեղր, սննդամթերքի անվտանգություն, աղտոտիչ, օրական սպառում, ներգործություն:

## ОЦЕНКА РИСКА НИТРОФУРАНОВ В АРМЯНСКОМ МЕДЕ

МЕЛИНЕ БЕГЛАРЯН

Кандидат технических наук

Руководитель группы оценки продовольственной безопасности и нутриентов

Информационно-аналитического центра оценки рисков пищевой цепи,

Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА

*meline.beglyan@cens.am*

ДАВИД ПИПОЯН

Руководитель Информационно-аналитического центра оценки рисков пищевой цепи,

Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА,

доктор пищевых наук (Италия),

*david.pipoyan@cens.am*

ВИКТОРИЯ ЧИРКОВА

Лаборант-исследователь Информационно-аналитического центра оценки рисков пищевой цепи,

Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА

*victoria.chirkova@cens.am*

### Аннотация

Развитие страны и забота о ее населении, а также растущий спрос на армянский мёд за рубежом вызывают необходимость соответствия всё более строгим требованиям безопасности и качества этого продукта. На основании случаев обнаружения остатков загрязняющих веществ в армянском мёде исследователи обеспокоены возможным наличием риска для потребителей. Кроме риска здоровью потребителей, наличие контаминаций в мёде может негативно сказаться на экспорте продукта и его вкладе в экономику страны.

В статье проанализированы данные тестирования образцов армянского мёда на наличие остатков метаболитов нитрофурана. Согласно результатам тестирования,

из четырех метаболитов в образцах мёда был обнаружен один метаболит – 1-аминогидантоин (АНД). Для оценки риска использован метод Предела Воздействия (МОЕ) и формирование гомогенных кластеров потребителей с учетом различных суточных уровней потребления меда и пола потребителей. Также рассматривался наихудший сценарий, имитирующий увеличение суточного потребления меда с максимальной концентрацией АНД. Результаты показали безопасные значения МОЕ для всех групп потребителей, что свидетельствует об отсутствии проблем, связанных с воздействием нитрофурана. Более того, наихудший сценарий демонстрирует возможность увеличения суточного потребления мёда без вредного воздействия на потребителей. Тем не менее наличие загрязняющих веществ в мёде вызывает беспокойство.

Отсутствие неблагоприятных последствий воздействия загрязнителя в этом исследовании не исключает, что другие исследования обнаружат риск для здоровья потребителей. Загрязнение продукта на любом уровне является причиной для более тщательного исследования, переоценки правил производства и контроля качества меда.

**Ключевые слова и словосочетания:** безопасность пищевых продуктов, загрязнитель, ежедневное потребление, экспозиция.

## Introduction

Armenian honey is a valuable product known for its unique properties and flavors, derived from the rich variety of plants including rare and endemic species [1, 2]. In addition, beekeeping in Armenia is one of the developing branches of agriculture [3] further enhancing the prestige of Armenian honey for export. The export figures reflect the increasing demand: in 2022, a total of 67.4301 tons of honey were exported, amounting to \$411.16 thousand. Even in the first three months of 2023, there was a significant export of honey, with 16.9732 tons valued at \$78.96 thousand. As a matter of fact, there was a substantial growth in honey exports from Armenia, with a staggering increase of 13.6 times between 2012 and 2022 [4].

As the honey industry in Armenia continues to grow, with increasing export figures and recognition in both domestic and international markets, concerns have emerged regarding the presence of contaminants in Armenian honey [5, 6]. The reported cases of contamination necessitate thorough research to assess the safety of Armenian honey for consumers. Among the various contaminants, one particular group that has drawn significant attention is nitrofurans, a group of synthetic antibiotics commonly used in veterinary medicine. Nitrofurans are known to possess antimicrobial properties, making them effective in treating bacterial infections [7]. However, their use is strictly regulated or banned in many countries due to potential health risks associated with their residues.

In Armenia, the Eurasian Economic Union, and the European Union, there are specific restrictions on the use of drugs in food-producing agriculture. In particular, the use of nitrofurans is prohibited, that is, their presence in food products should be eliminated. Moreover, there is a strong emphasis on organic production, which entails a complete rejection of the use of any synthetic substances [8, 9]. While beekeeping holds a sustainable position in organic development, it faces challenges. Beekeeping distinguishes itself from other forms of livestock farming and carries specific risks associated with its unique characteristics. Monitoring bee colonies presents greater challenges since bees can explore an area within a radius of 6 km from their hives [10], potentially coming into contact with their wild relatives, such as wild bees and bumblebees. Both domesticated and wild bees, along with closely related bumblebees, are susceptible to similar diseases, including fungal, bacterial, viral, and parasitic diseases [11]. The constant risk of introducing pathogens into

the beehive prompts beekeepers to use medications for the treatment or prevention of bee diseases, which directly affects the honey contamination with these medications. Rare exceptions can be found in cases where hives are isolated and strict control is implemented regarding the introduction of new insects, as observed in Newfoundland (Canada) and Australia [12, 13]. Stringent isolation measures in these locations have resulted in the complete absence of certain highly dangerous bee diseases there. However, in many other beekeeping contexts, where bees interact with various environmental factors and potentially encounter pathogens from wild bees and other sources, the use of medications may be necessary to maintain colony health. It is crucial for beekeepers to strike a delicate balance between ensuring the well-being of their colonies and minimizing potential contamination of honey with medication residues such as nitrofurans.

The presence of nitrofurantoin residues in honey raises concerns about consumer safety since nitrofurantoin metabolites (NMs) can have adverse effects on human health, including carcinogenic and genotoxic properties [7]. Therefore, it is crucial to conduct thorough research and monitoring to assess the prevalence of nitrofurantoin contamination in Armenian honey and its associated risks. Therefore, by analyzing the monitoring data on NMs' residues in Armenian honey, this research aims to assess the prevalence of contamination and evaluate the associated risks for honey consumers.

## Materials and Methods

### *Analysis of honey samples*

In 2019, as part of the annual residue monitoring, four samples of multifloral honey were collected from different regions of Armenia. The weight of the samples ranged from 0.5 to 1 kg. At the Republican Veterinary and Phytosanitary Center for Laboratory Services, the samples were tested for the presence of residues of four nitrofurantoin metabolites: 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD), and semi-carbazide (SEM). Primary screening of honey samples for the presence of NM residues was conducted using MaxSignal ELISA Kits, then positive samples were re-tested by LC-MS-MS in accordance with the standard protocol [14].

### *Honey consumption data*

In 2018, the CENS employees interviewed 1040 residents of the capital city of Yerevan, between ages of 18 and 65. The survey questionnaire used was a Food Frequency Questionnaire (FFQ) [15]. The survey aimed to gather data on portion sizes, frequency of food consumption, and demographic information. Based on the questionnaires, a consumption database was compiled and subjected to cluster analysis. As a result, three consumer clusters of honey were identified [6].

### *Risk assessment*

The risk assessment associated with the consumption of NMs in honey was conducted using the Margin of Exposure (MOE) approach. The calculations involved two formulas:

$$MOE = \frac{BMD}{EDI} \quad (1),$$

where BMD (Benchmark Dose) represents the reference point for NMs in terms of human health (mg/kg/day), and EDI (Estimated Daily Intake) represents the daily intake of the metabolite through honey consumption (mg/kg/day).

$$EDI = \frac{C_{\text{honey}} \times CNM}{BW} \quad (2),$$

where  $C_{\text{honey}}$  (Consumption) represents the daily honey consumption (kg/day),  $C_{\text{NM}}$  (Content) represents the concentration of the metabolite in honey (mg/kg), and BW (Body

Weight) represents the body weight of the consumer (kg). According to the survey data, the average weight of men is 74.7 kg, and the average weight of women is 59.8 kg.

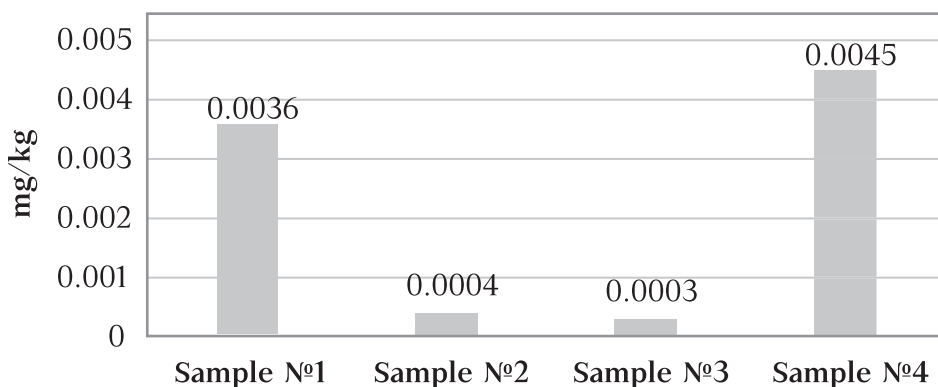
### ***The worst-case scenario***

For the worst-case scenario, the following approach was taken: The highest detected concentration of the metabolite in honey was considered as the average value. Additionally, for the daily portion, the value from the cluster with the highest daily portion was used in the calculations. This worst-case scenario helps to assess the potential risk associated with the consumption of honey containing NMs under the conditions that pose the highest exposure to the metabolites.

## **Results and Discussion**

### ***NM residues in honey***

Based on the examination of honey samples, it was found that all of them contained nitrofurant metabolite AHD (Fig. 1), while none of the samples showed the presence of the other metabolites (AOZ, AMOZ, and SEM). The AHD content in the samples ranged from 0.0003 mg/kg to 0.0045 mg/kg, with an average content of 0.0022 mg/kg (Table 1).



**Fig. 1.** AHD content levels in honey samples, mg/kg

**Table 1.**

AHD contents in honey samples, mg/kg

Nitrofurant metabolite (NM)	Min	Max	Mean	SD±
AHD	0.0003	0.0045	0.0022	0.0022

Note: SD - standard deviation.

### ***Honey consumption***

Out of the total respondents, 70.2% reported being consumers of honey. Among the 730 honey consumers, cluster analysis was conducted, which revealed three homogeneous clusters of honey consumers (Table 2). The first cluster represents the largest proportion of respondents (80%) and is characterized by the lowest daily honey consumption of 0.006 kg/day. The second cluster has an average representation in terms of the proportion of respondents (14.7%) with an average daily consumption of 0.028 kg/day. The third cluster, with the smallest proportion of respondents (5.3%), is characterized by the highest daily honey consumption of 0.059 kg/day.

Table 2.

Characteristics of honey consumer clusters

Consumer clusters	Number of respondents	Percentage of respondents (%)	Daily consumption (kg/day)
Cluster 1	584	80	0.006
Cluster 2	107	14.7	0.028
Cluster 3	39	5.3	0.059

**Daily intake and exposure of AHD**

Daily intake of AHD resulting from honey consumption was calculated for male and female consumers in the three clusters (Table 3). Among male consumers, the lowest daily intake of AHD was observed in the first consumer cluster, while the highest was observed in the third consumer cluster. The data indicates that the AHD intake varies among different consumer clusters and highlights the differences in honey consumption patterns among men in these groups.

Table 3.

EDI of AHD residues via honey consumption, mg/kg/day

Consumer clusters	EDI of AHD (mg/kg/day)	
	Males	Females
Cluster 1	1.61E-07	2.01E-07
Cluster 2	7.50E-07	9.36E-07
Cluster 3	1.58E-06	1.97E-06

For the calculation of MOE, two benchmark dose (BMD) values were used: BMD = 29.5 mg/kg bw, which is associated with a carcinogenic effect (neoplastic effect), and BMD = 4.5 mg/kg bw, which is associated with a non-carcinogenic effect (non-neoplastic effect) [7]. The results of the MOE calculations are presented in Table 4. The MOE values provide insights into the potential health risks associated with the daily intake of AHD from honey consumption, considering both the carcinogenic and non-carcinogenic effects at different BMD levels.

Table 4.

MOE of AHD residues

Consumer clusters	MOE of AHD			
	Males		Females	
	Neoplastic effect	Non-neoplastic effect	Neoplastic effect	Non-neoplastic effect
Cluster 1	1.84E+08	2.99E+07	1.47E+08	2.39E+07
Cluster 2	3.94E+07	6.40E+06	3.15E+07	5.13E+06
Cluster 3	1.87E+07	3.04E+06	1.50E+07	2.43E+06

The MOE values ranged from 2.43E+06 in the third cluster for a non-carcinogenic effect among women to 1.84E+08 in the first cluster for a carcinogenic effect among men.

**Risk assessment and characterization**

There are currently no studies demonstrating the carcinogenic effects of AHD on humans. However, according to the EFSA CONTAM panel, AHD should be considered genotoxic and carcinogenic based on studies conducted on rats [15]. Based on this, we will consider an MOE value of  $\geq 10000$  as safe for consumer health. As seen in Table 4, all MOE



values exceed the threshold of 10000. Even the lowest MOE value (2.43E+06) exceeds 10000 by more than 200 times. These MOE values indicate that the consumption of AHD in honey does not pose a potential risk for all the considered consumer groups.

**The worst-case scenario**

For the worst-case scenario calculation, we considered the average concentration of AHD in honey to be 0.0045 mg/kg. The daily consumption value used in this scenario is taken from the third cluster of consumers, which is 0.059 kg/day. The results of the MOE calculation for the worst-case scenario are presented in Table 5.

**Table 5.**

Worst-case scenario for AHD risk assessment

MOE of AHD			
Males		Females	
MOE <sub>neoplastic effect</sub>	MOE <sub>non-neoplastic effect</sub>	MOE <sub>neoplastic effect</sub>	MOE <sub>non-neoplastic effect</sub>
8.30E+06	1.35E+06	6.64E+06	1.08E+06

In the worst-case scenario, it is important to note that all MOE values also exceeded the threshold of 10000. Even the lowest MOE value for non-neoplastic effect value for women exceeded the threshold by more than 100 times. These results demonstrate that even under the hypothetical circumstance of a theoretical increase in the daily consumption of honey, there is no significant risk for any of the consumer groups.

**Conclusions**

Our study provided strong evidence that honey consumption by all consumer groups didn't pose potential risk associated with AHD exposure. Even in the worst-case scenario, which considered an increase in honey consumption, no danger to consumers was observed. However, the presence of AHD in honey samples raises concerns. It highlights the need to address the discrepancy between honey production and modern requirements, as well as the possible gaps in regulatory measures and supervisions.

The specific challenges faced by beekeeping may present difficulties in avoiding the use of prohibited drugs. Nevertheless, it is essential to emphasize that the use of prohibited drugs cannot be justified. Instead, these challenges should serve as a driving force for conducting further research and developing solutions within the industry.

**References**

1. Belyaeva O., Sargsyan K., Hovhannisyan L., & Sahakyan L. Multifloral honey from Artsakh: quality and safety // Electronic Journal of Natural Sciences. – 2020. 34(1).
2. Pipoyan D. A., Beglaryan M. R., Sireyan L. A., & Shakhnazarova Y. G. Investigation of Antioxidant Activity of Armenian Honey // of Armenian National Agrarian University. – 2019. № (65) 1.
3. Darbinyan N., Rundgren G., Balke V., & Leshchynskyy A. The status and potential of organic agriculture in Armenia: A background document for the Greening Economies in the Eastern Neighbourhood (EaP-GREEN) partnership programme. – 2018.
4. <https://armstat.am/en/?nid=160> (accessed on 08.06.2023).
5. Pipoyan D., Stepanyan S., Beglaryan M., Stepanyan S., Asmaryan S., Hovsepyan A., & Merendino N. Carcinogenic and non-carcinogenic risk assessment of trace elements and POPs



- in honey from Shirak and Syunik regions of Armenia //Chemosphere. – 2020. 239, 124809.
6. Stepanyan S. A., Khachatryan M. V., Pipoyan D. A. Assessing Copper Risk in Honey Sold in City of Yerevan //AGRICULTURE AND TECHNOLOGY. – 2022. 202.
  7. EFSA. Scientific Opinion on nitrofurans and their metabolites in food. *EFSA Journal*. 2015. 13(6).
  8. Ramos T. M. et al. Assessment of biological soil amendments of animal origin use, research needs, and extension opportunities in organic production //Frontiers in Sustainable Food Systems. – 2019. 3, 73.
  9. Singh M. Organic farming for sustainable agriculture //Indian Journal of Organic Farming. – 2021. 1(1),1-8.
  10. Savarino A. E. Terio, V., Barrasso, R., Ceci, E., Panseri, S., Chiesa, L. M., & Bonerba, E. Occurrence of antibiotic residues in Apulian honey: Potential risk of environmental pollution by antibiotics //Italian journal of food safety. – 2020. 9 (1).
  11. Lannutti, L., Gonzales, F. N., Dus Santos, M. J., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. Molecular detection and differentiation of arthropod, fungal, protozoan, bacterial and viral pathogens of honeybees //Veterinary Sciences. – 2022. 9(5), 221.
  12. Giordani, L. Food Futures: Growing a Sustainable Food System for Newfoundland and Labrador by Catherine Keske //Anthropologica. – 2020. 62(1), 205–206.
  13. Phillips, C. The force of Varroa: Anticipatory experiences in beekeeping biosecurity //Journal of Rural Studies. – 2020. 76, 58–66.
  14. GOST. State Standard 32014–2012: Food Products, Food Raw Materials. Method of Determination of the Nitrofurans Mytobolites by High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLC–MS). 2012.
  15. Pipoyan, D., Stepanyan, S., Beglaryan, M., Stepanyan, S., & Mantovani, A. Health risk assessment of toxicologically relevant residues in emerging countries: A pilot study on Malachite Green residues in farmed freshwater fish of Armenia //Food and Chemical Toxicology. – 2020. 143.

*The article has been submitted for publication: 29.02.2024*  
*Հոդվածը ներկայացվել է քննադրության. 29.02.2024*  
*Статья представлена к публикации: 29.02.2024*

*The article is sent for review: 11.03.2024*  
*Հոդվածն ուղարկվել է գրախոսության. 11.03.2024*  
*Статья отправлена на рецензию: 11.03.2024*

*The article is accepted for publication: 02.04.2024*  
*Հոդվածն ընդունվել է քննադրության. 02.04.2024*  
*Статья принята к печати: 02.04.2024*