

Występowanie antybiotyków w żywności – aspekty prawne i analityczne kontroli pozostałości

Andrzej Posytniak

z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach

Współczesna medycyna weterynaryjna dysponuje naturalnymi lub półsyntetycznymi antybiotykami i syntetycznie otrzymywanymi substancjami wykazującymi różny mechanizm i zakres działania przeciwbakteryjnego. Ta możliwość uzyskania różnorodnych efektów terapeutycznych wynika z faktu, że obecnie w praktyce weterynaryjnej stosowane są β -laktamy (penicyliny i cefalosporyny), tetracykliny, makrolidy i azalidy, linkozamidy i pleuromutyliny, aminoglikozydy i aminocyklitolle, amfenikole, peptydy i jonofory. Natomiast syntetycznymi chemioterapeutykami wykazującymi działanie przeciwbakteryjne są sulfonamidy, chinolony, nitrofurany i nitroimidazole. Mimo że pochodzenie antybiotyków i chemioterapeutyków jest różne, to jednak ze względu na zakres działania dość często określa się je wspólnym mianem substancji przeciwbakteryjnych, ale pojawia się również synonim „antybiotyki” dla wszystkich substancji wykazujących działanie skierowane przeciwko bakteriom chorobotwórczym.

Skuteczna i bezpieczna antybiotykoterapia uzależniona jest od wzajemnych zależności zachodzących pomiędzy drobnoustrojami wywołującymi zakażenie, organizmem zwierzęcym oraz zastosowanym lekiem przeciwbakteryjnym, który z jednej strony działa na bakterie, ale z drugiej ulega oddziaływaniom wywieranym przez organizm zwierzęcy. Z punktu widzenia efektywności działania istotne jest, aby antybiotyk jak najdłużej i w jak najwyższych stężeniach pozostawał w organizmie zwierzęcym, w szczególności w miejscu zakażenia. O ilościach leku, które przechodzą do organizmu zwierzęcego oraz o czasie utrzymania się efektywnego stężenia decydują właściwości fizykochemiczne, a w zwłaszcza lipofilność, postać i droga podania, ale również gatunek zwierząt (1, 2, 3).

Jednak antybiotyki, pozostając w tkankach i narządach zwierząt oraz ich produktach – mleku, jajach i miodzie, stają się potencjalnym źródłem niekorzystnych oddziaływań na zdrowie konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego (4). Okazuje się bowiem, że nawet małe dawki antybiotyków przyjmowane z żywnością przez dłuższy okres mogą przyczynić się do

powstawania w organizmie ludzkim lekoopornych szczepów bakteryjnych. Ponadto mogą być wywoływane reakcje alergiczne lub też zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu tkanek lub narządów (działanie mutagenne i kancerogenne).

Występowanie niezgodnych z przepisami pozostałości jest konsekwencją niespektowania zasad dobrej praktyki hodowlanej lub też dobrej praktyki weterynaryjnej. Najczęściej stwierdzaną przyczyną występowania niezgodnych z przepisami stężeń antybiotyków w żywności jest nieprzestrzeganie czasów karencji, niezgodnie ze wskazaniami dawkiowanie weterynaryjnych produktów leczniczych oraz stosowanie leków (wbrew zaleceniom) u tych gatunków zwierząt, dla których nie są przeznaczone.

W celu ochrony zdrowia konsumentów Unia Europejska, jak również inne organizacje międzynarodowe, wydając liczne dyrektywy ściśle regulują użycie antybiotyków u zwierząt, których produkty przeznaczone są do konsumpcji. Między innymi wprowadzono zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu, nie przedłużono autoryzacji do dalszego stosowania lekom wykazującym silne działania toksyczne, wprowadzono obowiązek systematycznej kontroli pozostałości antybiotyków w produktach spożywczych.

W artykule zostaną przedstawione przepisy prawne regulujące zasady kontroli pozostałości antybiotyków stosowanych u zwierząt, których produkty przeznaczone są do konsumpcji przez ludzi, organizację kontroli pozostałości antybiotyków oraz wymagania, jakie powinny spełniać techniki analityczne umożliwiające uzyskanie wiarygodnej oceny zawartości antybiotyków w produktach spożywczych.

Regulacje prawne

Ochrona zdrowia konsumenta przed szkodliwym oddziaływaniem pozostałości odbywa się poprzez wyznaczenie najwyższych dopuszczalnych limitów pozostałości (maximum residue limit – MRL) dla leków weterynaryjnych, które wraz z produktami pochodzenia zwierzęcego mogą dostawać się do łańcucha pokarmowego ludzi.

Regulatory and analytical aspects of antibiotics residues in food

Posytniak A., Department of Pharmacology and Toxicology, National Veterinary Research Institute in Pulawy

The aim of this paper was to present the current status of regulatory and analytical measurements of antibiotic residues in human food of animal origin. Antibiotic residues are considered as a serious pollution in public health surveillance. It is essential for the safety of human populations and professional reputation of veterinarians practicing food animal medicine, that antibacterial withdrawal times are observed. The residues of antibiotics and other drugs may arise from improper use of licensed products and/or from the illegal use of non-authorized substances. Analysis of drug residues is required, therefore maximum residue limits (MRLs) and methods for food analysis have been established in EU. For regular food safety control liquid chromatography-tandem mass spectrometry is recommended. This review gives indications for the results interpretation in accordance with EU law.

Keywords: antibiotics, residues, food analysis.

Wartość MRL wyznaczana jest w wyniku szacowania ryzyka (risk assessment), kiedy w oparciu o wielokierunkowe badania toksykologiczne ustala się najwyższą dawkę, która nie wywołuje szkodliwych skutków (no observable adverse effect level – NOAEL). W oparciu o wartość NOAEL wyznaczane jest akceptowane dzienne pobranie (acceptable daily intake – ADI), które następnie służy do wyliczenia wartości MRL. W konsekwencji tylko leki mające wyznaczone wartości MRL w jadalnych częściach zwierząt (mięśnie, nerki, wątroba, tłuszcz) oraz w mleku, jajach i w miodzie mogą być stosowane u zwierząt, których produkty są przeznaczone do konsumpcji przez ludzi.

Do niedawna w krajach Unii Europejskiej obowiązywało rozporządzenie Rady 2377/90, które opisywało procedury wyznaczania MRL weterynaryjnych produktów medycznych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Rozporządzenie zawierało wartości MRL dla beta-laktamów, tetracyklin, makrolidów, amfenikoli, linkozamidów, pleuromutylin, aminoglikozydów, fluorochinolonów i sulfonamidów. Spośród substancji mających właściwości przeciwbakteryjne autoryzacji nie uzyskały nitrofurany, nitroimidazole i chloramfenikol, dla których to substancji ze względu na silne działania toksyczne (kancerogenne), nie ustalono wartości ADI, a w dalszej konsekwencji wartości MRL (substancje zabrano w załączniku 4 regulacji 2377/90). W związku tym stosowanie nitrofuranów, nitroimidazoli i chloramfenikolu

u zwierząt, których produkty przeznaczone są do konsumpcji przez ludzi, jest prawnie zabronione, zaś wykrycie i następnie potwierdzenie ich obecności w badanych produktach spożywczych wiąże się z uruchomieniem określonych działań administracyjnych.

Obecnie regulacja 2377/90 została zastąpiona przez rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady 470/2009 (6 maja 2009 r.), natomiast aktualny wykaz leków weterynaryjnych z podanymi wartościami MRL oraz matrycami biologicznymi i gatunkami zwierząt, dla których te wartości ustalono został zebrany w tabeli 1 rozporządzenia Komisji 37/2010 (22 grudnia 2009 r.), natomiast substancje bez autoryzacji zebrano w tabeli 2 tego rozporządzenia.

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na fakt, że nie dla wszystkich leków przeciwbakteryjnych stosowanych w praktyce weterynaryjnej wyznaczono wartości MRL dla wszystkich gatunków zwierząt lub dla wszystkich tkanek i narządów, lub produktów zwierzęcych. Między innymi wartości MRL nie zostały wyznaczone dla doksycyliny w mleku i jajach, dla sulfonamidów i fluorochinolonów w jajach, nie ma także MRL dla leków przeciwbakteryjnych w miodzie. Brak wartości MRL dla wymienionych leków w mleku, jajach czy miodzie może wynikać z faktu, że substancje te łatwo przechodzą do tych produktów w dużych ilościach i pozostają tam przez dość długi czas, często trudno do ustalenia. W związku z tym stosowanie tych leków u kur niosek, krów mlecznych czy też pszczoł jest zabronione, a wykrycie obecności leków w produktach, dla których nie wyznaczono MRL, wiąże się ze wszczęciem postępowania podobnego, jak dla wspomnianych nitrofuranów, nitroimidazoli czy też chloramfenikolu.

Dyrektywa Rady 96/23 jest przewodnikiem zawierającym procedury określające zasady prowadzenia kontroli pozostałości leków weterynaryjnych. Według tej dyrektywy substancje z załącznika 4 rozporządzenia 2377/90 (obecnie tabela 2 rozporządzenia Komisji 37/2010) zostały zaszeregowane razem z substancjami o charakterze anabolicznym do grupy A, a dokładniej do podgrupy A6. Natomiast wszystkie leki przeciwbakteryjne zostały włączone z innymi lekami i substancjami skażającymi środowisko do grupy B, w której tworzą samodzielną podgrupę B1 (załącznik 2 dyrektywy 96/23).

Zaszeregowanie badanych substancji do określonej grupy według dyrektywy 96/23 określa wymagania, jakie powinny spełniać metody służące do wykrywania i potwierdzania obecności antybiotyków. W badaniu pozostałości leków zebranych w grupie B1 oznaczenia wykonywane są

w jadalnych częściach zwierząt – wątrobie, nerkach i mięśniach. Szczególnie przydatne do badań kontrolnych są wątroby i nerki, w których leki mogą występować w znacznie wyższych stężeniach niż w mięśniach. Ponadto pobierane są produkty zwierzęce – mleko, jaja i miód. W kontroli pozostałości tych leków stosowane są techniki analityczne, które umożliwiają wykrycie, identyfikację i potwierdzenie obecności w stężeniach odpowiadających przynajmniej połowie wartości MRL leku. Odstępstwo od tej zasady następuje, gdy analizowana jest substancja z grupy B1, dla której nie ma wyznaczonego MRL dla danej matrycy. Wówczas obowiązuje tolerancja „zero” i w tym przypadku stosowane są techniki analityczne, które wykrywają i potwierdzają ich obecność w jak najniższych stężeniach.

O wiele bardziej złożona jest kontrola pozostałości substancji zebranych w grupie A6 (chloramfenikol, nitrofurany i nitroimidazole), którą prowadzi się po przyżyciowym pobraniu próbek krwi, moczu, sierści oraz próbkach paszy i wody, w materiale pobieranym w rzeźni od ubijanych zwierząt (mięśnie, nerki, wątroba), jak również w mleku, jajach i miodzie. Ponieważ dla nitrofuranów, nitroimidazoli i chloramfenikolu obowiązuje tolerancja „zero” w analizie tych substancji stosowane są techniki analityczne, które mają możliwość wykrycia i potwierdzenia ich obecności w możliwie jak najniższych stężeniach. Jednak laboratoria zajmujące się kontrolą pozostałości mogą mieć różne możliwości aparaturowe, a tym samym z różną sprawnością mogą analizować substancje z grupy A6, a to może prowadzić do komplikacji, szczególnie w międzynarodowym obrocie produktami żywnościowymi. W związku z tym dla metod stosowanych w kontroli pozostałości tych substancji wprowadzono pojęcie: minimalny wymagany limit sprawności (minimum required performance limit – MRPL), czyli najmniejszego stężenia, które powinno być wykryte i potwierdzone. Wartość MRPL, jak dotąd, została wyznaczona dla chloramfenikolu (0,3 µg/kg) i metabolitów nitrofuranów (1 µg/kg).

Wymagania w zakresie sprawności metod stosowanych w kontroli pozostałości żywności pochodzenia zwierzęcego określone zostały w decyzji Komisji 657/2002, która w miejsce granicy wykrywalności i granicy oznaczalności wprowadziła pojęcie limitu decyzyjnego (CCa) i zdolności wykrywania (CCb). CCa definiowane jest, jako „stężenie, które z błędem prawdopodobieństwa a może być uznane, jako niezgodne”. Natomiast CCb definiowane jest jako „najmniejsze stężenie substancji, która może być zidentyfikowana i/lub oznaczona ilościowo z prawdopodobieństwem b”. W b% przypadkach próbki niezgodne będą

klasyfikowane jako zgodne, a tym samym będą dawać fałszywie negatywne wyniki.

Przy wyznaczaniu wartości tych parametrów wymagane jest, aby metody służące do wykrywania i oznaczania substancji zakazanych (chloramfenikol, nitroimidazole i metabolity nitrofuranów) lub leków przeciwbakteryjnych, dla których nie wyznaczono wartości MRL miały wartości dla CCa i CCb niższe od wartości MRLP lub innych limitów decyzyjnych. Natomiast dla metod stosowanych do wykrywania i oznaczania leków przeciwbakteryjnych z ustalonymi wartościami MRL parametry te mają wartości wyższe od limitów decyzyjnych.

Wymagania stawiane przed metodami analitycznymi

Przy doborze metod służących do kontroli pozostałości leków przeciwbakteryjnych jest dość duża dowolność, ale wymagane jest, aby posiadały one sprawność analityczną, dającą gwarancję uzyskania wiarygodnych wyników. Wybór odpowiedniej dla badań pozostałości metody zależy od rozwiązywanego problemu i konieczności osiągnięcia zamierzonego celu (5).

Tradycyjnie mikrobiologiczne testy przesiewowe stosowane są w badaniach kontrolnych pozostałości leków przeciwbakteryjnych w żywności (6). Dzięki prostocie oraz niskim kosztom wykonania przy użyciu tych testów możliwe jest dokonanie w bardzo krótkim czasie oceny, czy w badanych próbkach znajdują się jakieś substancje hamujące wzrost testowych szczepów bakteryjnych (wynik dodatni), czy też jest to materiał wolny od substancji hamujących (wynik ujemny). Jednak tego typu testy nie dają jednoznacznego określenia, czy substancja powodująca zahamowanie wzrostu bakterii jest antybiotykiem, a jeśli jest to antybiotyk, czy występuje on w stężeniach zgodnych z obowiązującymi unormowaniami prawnymi, czy też nie. A tylko pełna wiedza w tym zakresie, a więc określenie, jakie substancje przeciwbakteryjne i w jakich stężeniach występują, pozwala podjąć ostateczne decyzje administracyjne w stosunku do badanego materiału, w którym wcześniej wykryto obecność substancji hamujących. Uzyskanie tych informacji i w konsekwencji podjęcie określonego postępowania możliwe jest dopiero po wykonaniu analiz potwierdzających, które umożliwiają wykluczenie lub też potwierdzenie obecności antybiotyków oraz określenie ich stężeń. Pełna i wiarygodna informacja o wykrytym antybiotyku możliwa jest po zastosowaniu do badań technik chromatograficznych, które połączone z różnymi systemami wykrywania pozwalają na wykonanie badań jakościowych (identyfikacja) oraz ilościowych

(potwierdzenie). Ponadto zastosowanie technik chromatograficznych w analizie pozostałości leków daje możliwość określenia czy w badanych próbkach, oprócz substancji macierzystych występują również produkty przemian metabolicznych; takich możliwości nie mają ani testy mikrobiologiczne, ani też testy ELISA.

Chromatografia, jako technika rozdzielania znana jest od ponad stu lat i obecnie jest podstawową techniką w analizie substancji organicznych, w tym również pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego. W kolejnych etapach rozwoju pojawiły się 3 różne chromatograficzne techniki analityczne: cienkowarstwowa, gazowa i cieczowa. Przydatność chromatografii cienkowarstwowej lub gazowej do wykrywania pozostałości leków w żywności opisano już dość dawno (7). Jednak obecnie chromatografia cieczowa, dzięki swoim właściwościom stała się techniką dominującą w analizie pozostałości leków. W klasycznej analizie pozostałości leków weterynaryjnych chromatografię cieczową najczęściej łączy się z detektorami UV wykorzystującymi zdolność pochłaniania światła ultrafioletowego przez analizowaną substancję lub detektorami fluorescencyjnymi (FLD) wykorzystującymi naturalną fluorescencję leku lub też pochodnej otrzymanej w wyniku syntezy. Jednak coraz częściej do potwierdzania obecności leków przeciwbakteryjnych w żywności stosowana jest spektrometria mas (MS), która umożliwia nie tylko wykrycie obecności analizowanego związku chemicznego, lecz również określenie jego struktury (8, 9, 10).

Klasyczne techniki detekcji nie mają możliwości tak pełnej identyfikacji, ponadto zastosowanie spektrometrii mas daje możliwość jednoczesnego analizowania wielu różnych grup leków przeciwbakteryjnych, podczas gdy klasyczne sposoby pozwalają na jednoczesną analizę jednej lub co najwyżej dwóch grup substancji przeciwbakteryjnych. Rozwój spektrometrii mas oraz wykazywanie jej przydatności w analizie leków weterynaryjnych sprawia, że jest ona coraz częściej wykorzystywana nie tylko w do badań substancji z grupy A6, ale też i weterynaryjnych leków przeciwbakteryjnych (grupa B1).

Oprócz wspomnianych powyżej kryteriach decyzja 657/2002/EC określa wymagania dla metod potwierdzających, są to tzw. punkty identyfikacyjne. Dla substancji z grupy A6 wymagane jest, aby zastosowana technika analityczna miała przynajmniej 4 punkty, natomiast dla metody stosowanej w analizie leków z grupy B1 wymagane są 3 punkty. Użycie do analizy chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorami UV lub FLD, umożliwia uzyskanie 1 punktu, natomiast zastosowanie

chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas (LC-MS) pozwala na uzyskanie 3, a nawet 4 punktów identyfikacyjnych.

Użycie określonej techniki analitycznej daje konkretne korzyści, ale też ma określone ograniczenia. Dość istotnym ograniczeniem w wykonaniu analiz przy zastosowaniu technik chromatograficznych jest konieczność odpowiedniego przygotowania próbek. Oznaczenia pozostałości leków przeciwbakteryjnych wykonywane są w mięśniach, mleku, jajach lub miodzie, które, oprócz miodu, bogate są w białka (od 3 do 20%). Zaś wszystkie stosowane w praktyce weterynaryjnej leki wykazują powinowactwo do białek, z którymi tworzą silne wiązania. Ponadto niektóre leki, jak chociażby tetracykliny czy fluorochinolony, mają właściwość tworzenia silnych kompleksów z dwu- lub trójwartościowymi jonami metali występującymi w matrycy biologicznej (11, 12). W związku z tym w trakcie przygotowania próbek stosuje się różne rozwiązania prowadzące do w izolowania leku i oddzielenia ich od składników matrycy biologicznej. Przygotowanie próbek do badań jest istotnym elementem każdego postępowania analitycznego, gdyż może mieć wpływ na wiarygodność i uzyskiwanie fałszywie dodatnich lub też fałszywie ujemnych wyników.

Analiza występowania pozostałości leków przeciwbakteryjnych

W kontroli pozostałości mamy do czynienia z dwójakiemu rodzaju sytuacjami, z jednej strony w dość krótkim czasie należy wykonać dużą liczbę analiz, a z drugiej w badanych próbkach mogą wystąpić niedozwolone stężenia leków przeciwbakteryjnych lub też mogą być wykryte substancje, których stosowanie jest zabronione.

W związku z tym w laboratoriach zajmujących się kontrolą pozostałości leków przeciwbakteryjnych stosowane są metody umożliwiające wykonanie badań w krótkim czasie oraz metody dające możliwość analizowania substancji, których obecność może okazać się niezgodna z obowiązującymi regulacjami unijnymi lub krajowymi. Dlatego też w praktyce laboratoryjnej bardzo często łączy się prowadzenie badań z użyciem testów przesiewowych (jakościowych) i metod potwierdzających (ilościowych).

W analizie potwierdzającej obecność chloramfenikolu, metabolitów nitrofuranów i nitrimidazoli wykorzystuje się chromatografię cieczową połączoną tandemowo ze spektrometrią mas (LC-MS; 13, 14, 15). W przypadku badania pozostałości nitrofuranów nie wykonuje się oznaczeń zawartości substancji czynnych, lecz produktów ich metabolizmu (AOZ, AMOZ,

SEM, AHD), które są bardziej odporne na działanie czynników zewnętrznych, a to gwarantuje większą skuteczność wykrycia ich obecności. Natomiast w przypadku poszukiwania nielegalnego stosowania nitroimidazoli kontruje się obecność zarówno substancji czynnych, jak i ich metabolitów. Wyznaczone wartości limitu decyzyjnego (CCa) i zdolności wykrywania (CCb) w analizie chloramfenikolu są poniżej wartości MRPL (0,3 µg/kg), natomiast dla metabolitów nitrofuranów poniżej 1 µg/kg wszystkich analizowanych matryc. W przypadku oznaczania nitroimidazoli wymagane jest, aby metoda była w stanie oznaczyć stężenia poniżej 3 µg/kg (zalecenie EURL w Berlinie).

W przypadku potwierdzania obecności antybiotyków i innych leków przeciwbakteryjnych początkowo stosowano technikę chromatografii cieczowej połączonej z detektorami UV lub FLD. Jednak w praktyce wykonywanie badań przy zastosowaniu tych metod w zasadzie ograniczało się do analizowania sulfonamidów, fluorochinolonów i tetracyklin, gdyż zastosowanie tych sposobów detekcji do oznaczania penicylin, aminoglikozydów czy też makrolidów wymagało przeprowadzania żmudnego i często zawodnego otrzymywania syntetycznych pochodnych. Dopiero zastosowanie chromatografii cieczowej, połączonej ze spektrometrem mas umożliwiło sprawne potwierdzanie obecności w żywności wszystkich grup leków przeciwbakteryjnych stosowanych w praktyce weterynaryjnej (9, 10).

Antybiotyki β-laktamowe stanowią bardzo liczną grupę substancji przeciwbakteryjnych, wśród których najistotniejsze dla praktyki weterynaryjnej są penicyliny i cefalosporyny. Wartości MRL wyznaczone dla wszystkich gatunków zwierząt produkujących żywność mieszczą się w zakresie od 4 µg/l dla ampicyliny w mleku do 6000 µg/kg dla ceftiofuru w nerkach. Opracowano metody oznaczania obecności tych antybiotyków w mięśniach i w mleku przy zastosowaniu technik LC-MS, dostępne są również metody oznaczania kwasu klawulanowego często stosowanego z penicylinami, a będącego inhibitorem β-laktamazy (16, 17).

Sulfonamidy weterynaryjne produkty lecznicze w swoim składzie zawierają dwie, a czasem i więcej substancji czynnych, są też produkty zawierające sulfonamid i działający synergistycznie trimetoprim. W praktyce weterynaryjnej stosowanych jest przynajmniej 10 różnych sulfonamidów, zaś MRL na poziomie 100 µg/kg został wyznaczony dla sumy sulfonamidów w mleku i tkankach. Opracowano liczne metody do wykrywania i potwierdzania obecności sulfonamidów w tkankach, mleku, jajach i miodzie (11, 12, 18).

W krajach UE tetracykliny są antybiotykami najczęściej stosowanymi u zwierząt, między innymi ze względu na szeroki zakres działania, jak i na niski koszt leczenia. Spośród 8 dostępnych na rynku tetracyklin, u zwierząt, których produkty przeznaczone są do konsumpcji, dozwolone jest stosowanie oksytetracykliny, tetracykliny, chlorotetracykliny i doksycykliny. Wartość MRL dla oksytetracykliny, tetracykliny, chlorotetracykliny jest sumą substancji macierzystych i ich epimerów (produkt rozkładu), natomiast w przypadku doksycykliny, jak dotąd, powstawania epimerów nie potwierdzono. W krajach UE wartość MRL dla tetracyklin w mięśniach wszystkich gatunków zwierząt ustalono na poziomie 100 µg/kg. Chromatografia cieczowa w tandemie ze spektrometrią mas wykorzystywana jest do potwierdzania obecności tetracyklin w tkankach, mleku i ich przetworach (19, 20).

Chinolony i flurochinolony są względnie nową i dość liczną grupą chemioterapeutyków, które znalazły szerokie zastosowanie w praktyce weterynaryjnej. Unijne wartości MRL wahają się od 10 µg/kg dla sarafloksacyny w tłuszczu drobiu do 1900 µg/kg dla difloksacyny w wątrobie drobiowej. Obecność tych substancji potwierdzana jest przy zastosowaniu techniki LC-MS w różnym materiale, między innymi w mleku, jajach, rybach i innych organizmach hodowanych w wodzie (21).

Makrolidy i azalidy, antybiotyki stosowane w chorobach dróg oddechowych zwierząt posiadają właściwość dość długiego pozostawania w tkankach i narządach. Wyznaczono unijne MRL dla acetyloizowalerylotylozyny, erytromycyny, spiramycyny, tylmikozyzyny, tulatromycyny i tylozyzyny. Zakres wartości waha się od 40 µg/kg dla erytromycyny w mleku do 3000 µg/kg dla tulatromycyny w wątrobie i nerkach bydła i świń. Dla celów potwierdzenia obecności tych antybiotyków w żywności opisano oznaczanie przy zastosowaniu techniki LC-MS (22).

Mimo że aminoglikozydy starej generacji obarczone są możliwością wywoływania działań neurotoksycznych i ototoksycznych, to nadal są stosowane w praktyce weterynaryjnej. Wartości MRL dla tych antybiotyków wahają się od 50 µg/kg dla gentamycyny w mięśniach wołowych i wieprzowych oraz tłuszczu do 20 000 µg/kg dla apramycyny w nerkach wołowych. Apramycyna nie jest dozwolona do stosowania krów, których mleko przeznaczone jest do konsumpcji przez ludzi. Aminoglikozydy są antybiotykami różniącymi się dość znacznie właściwościami fizykochemicznymi od innych grup substancji przeciwbakteryjnych i do niedawna sprawne ich oznaczanie przy zastosowaniu klasycznych technik chromatograficznych było bardzo trudne

(konieczność przeprowadzenia złożonej syntezy). Dopiero zastosowanie techniki LC-MS umożliwiło wykonywanie oznaczeń streptomycyny, gentamycyny, neomycyny i innych antybiotyków tej grupy w mleku i w mięśniach (23, 24).

W miejsce chloramfenikolu, którego stosowanie w praktyce weterynaryjnej jest od 1994 r. prawnie zakazane, wprowadzono dwa analogi – tiamfenikol i florfenikol, które pozbawione są wywoływania działań niepożądanych. Unijny MRL dla tiamfenikolu został ustalony dla tkanek bydła i drobiu na poziomie 50 µg/kg. Zastosowanie tiamfenikolu u kur niosek jest prawnie zabronione. Opracowano metody dla potwierdzania amfenikoli, tiamfenikolu i florfenikolu wraz z jego aminowym markerem w tkankach zwierząt (25).

Spośród antybiotyków peptydowych w krajach UE dozwolone jest stosowanie kolistyny i bacytracyny, jednak użycie tych antybiotyków jako dodatków paszowych jest zabronione. Opracowano metody oznaczania tych antybiotyków w materiale biologicznym (26).

Znaczne różnice w budowie chemicznej i związane z tym różnice we właściwościach fizykochemicznych były istotną przyczyną w powolnym rozwoju tzw. metod wieloskładnikowych, które umożliwiają jednoczesne wykrywanie i oznaczanie antybiotyków należących do różnych grup chemicznych. Dopiero od niedawna istnieją metody, które pozwalają na jednoczesne analizowanie kilkudziesięciu antybiotyków należących do beta-laktamów, tetracyklin, makrolidów, amfenikoli, linkozamidów, pleuromutylin, aminoglikozydów, fluorochinolonów i sulfonamidów, a tym samym swoim zakresem obejmują wszystkie grupy weterynaryjnych leków przeciwbakteryjnych. Sprawność analityczna metod została tak ustawiona, że jest możliwe potwierdzenie, czy wykryte stężenia leków przeciwbakteryjnych są powyżej czy też poniżej ustalonych wartości MRL (27, 28, 29). Tego typu metody, mimo że są znacznie droższe od testów mikrobiologicznych, jednak mają tę przewagę, że już po pierwszym wykonaniu badań pozwalają na jednoznaczne określenie, jakie i w jakich stężeniach występują wykryte leki. Dzięki temu możliwe jest znacznie szybsze podejmowanie decyzji administracyjnych. Należy oczekiwać, że w miarę obniżania kosztów spektrometrii mas zdominuje badania przesiewowe antybiotyków, podobnie jak ma to miejsce w innych kierunkach kontroli żywności. Również w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach opracowano i wdrożono do praktyki laboratoryjnej procedurę badawczą, która daje możliwość jednoczesnego wykrycia i potwierdzenia obecności kilkudziesięciu

antybiotyków należących do różnych grup chemicznych (30). W ostatnim czasie metoda była sprawdzana w badaniach biegłości zorganizowanych przez EURL (EU Reference Laboratories) w Fougères (Francja), a uzyskane wyniki potwierdziły jej przydatność do wyznaczonych zadań.

Podsumowanie

Rosnące wymagania w zakresie bezpieczeństwa żywności sprawiają, że przed laboratoriami zajmującymi się kontrolą pozostałości leków stawiane są coraz większe zarówno jakościowe, jak i ilościowe wymagania analityczne. W związku z tym zarówno do wykrywania, jak i potwierdzania wyników uzyskiwanych metodami przesiewowymi wprowadza się metody wykorzystujące chromatografię cieczową, połączoną tandemowo ze spektrometrią mas. Zastosowanie tej techniki pozwala na sprawne wykrywanie i potwierdzanie obecności antybiotyków i innych leków przeciwbakteryjnych w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

Piśmiennictwo

- Girardi C., Odore R.: Pharmacological treatments and risks for food chain. *Vet. Res. Commun.* 2008, **32** (Suppl 1), S11-S18.
- Lui P., Muller M., Derendorf H.: Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Internat. J. Antimicrobial Agents* 2002, **19**, 285-290.
- Posyniak A.: Czynniki wpływające na farmakokinetykę weterynaryjnych leków przeciwbakteryjnych. *Życie Wet.* 2010, **85**, 243-246.
- Pejsak Z., Trusczyński M.: Racjonalne stosowanie chemioterapeutyków w terapii i profilaktyce. *Życie Wet.* 2005, **80**, 642-645.
- Reig M., Toldra F.: Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science* 2008, **78**, 60-67.
- Posyniak A., Semeniuk S., Niedzielska J., Żmudzki J.: Analiza pozostałości leków weterynaryjnych – przydatność chromatografii cienkowarstwowej do wstępnych oznaczeń jakościowych. *Medycyna Wet.* 1994, **50**, 312-315.
- Różańska H., Lewak-Piłat A.: Metody przesiewowe wykrywania pozostałości antybiotyków w żywności. *Życie Wet.* 2011, **86**, 59-61.
- Stolker A.A.M., Brinkman U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *J. Chromatogr. A* 2005, **1067**, 15-53.
- Blasco C., Torres C.M., Pico Y.: Progress in analysis of residual antibacterials in food. *Trends in Analytical Chemistry* 2007, **26**, 895-913.
- Bogilli S., Di Corcia A.: Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antibacterials in food of animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, **395**, 947-966.
- Posyniak A., Śniegocki T., Żmudzki J.: Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2002, **46**, 111-117.
- Posyniak A., Mitrowska K., Żmudzki J.: Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2005, **1087**, 259-264.
- Śniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J.: Determination of chloramphenicol residues in milk by gas and liquid chromatography mass spectrometry methods. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2007, **51**, 59-64.
- Śniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J.: Determination of nitrofurantolone residues in eggs by liquid chromatography mass spectrometry. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2008, **52**, 421-425.

15. Mitrowska K., Posyński A., Żmudzki J.: Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 2010, **81**, 1273-1280.
16. Msagati T.A.M., Nindi M.M. Determination of b-lactam residues in foodstuff of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 2007, **100**, 836-844.
17. Becker M., Zittlau E., Petz M.: Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2004, **520**, 19-32.
18. Shao B., Dong D., Wu Y., Hu J., Meng J., Tu X., Xu S.: Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2005, **546**, 174-181.
19. Alfredsson G., Branzell C., Graneli K., Lundstrom A.: Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by dipstick test and LC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta* 2005, **529**, 47-51.
20. Koesukwiwat U., Jayanta S., Leepitapiboon N.: Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multiresidue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *J. Chromatogr. A* 2007, **1140**, 147-156.
21. McMullen S.E., Schenck F.J., Vega V.A.: rapid method for the determination and confirmation of fluoroquinolone residues in catfish using liquid chromatography/fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2009, **92**, 1233-1240.
22. Codony R., Compano R., Granados M., Garcia-Regueiro J.A., Prat M.D.: Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2002, **959**, 131-141.
23. Bagialli S., Curini R., Di Corcia A., Lagana A., Mele M., Nazzari M.: Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2005, **1067**, 93-100.
24. Zhu W., Yang J., Wei W., Lui Y., Zhang S.: Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *J. Chromatogr. A* 2008, **1207**, 29-37.
25. Luo P., Chen X., Liang C., Kuang H., Lu L., Jiang Z., Wang Z., Li C., Zhang S., Shen J.: Simultaneous determination of thiamfenicol, florfenicol and florfenicol amine in swine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with immunoaffinity chromatography clean up. *J. Chromatogr. A* 2010, **878**, 207-212.
26. Wan E.C., Ho C., Sin D.W., Wong Y.C.: Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, **385**, 181-188.
27. Martos P., Jayasundara E., Dolbeer J., Jin W., Spilsbury L., Mitchell M., Varilla C., Shurmer B.: multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissues using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2010, **58**, 5932-5944.
28. Romero-Gonzales R., Lopez-Martinez J.C., Gomez-Milan E., Garrido-Frenich A., Martinez-Vidal J.L.: Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead seabream (*Sparus Aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2007, **857**, 142-148.
29. Boscher A., Guignard C., Pellet T., Hoffman P., Bohn T.: Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2010, **1217**, 6394-6404.
30. Błądek T., Posyński A., Gajda A., Gbylik M., Żmudzki J.: Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in animal muscle by liquid chromatography-mass spectrometry *Bull. Vet. Inst. Pulawy (w druku)*.

Prof. dr hab. Andrzej Posyński, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy