

# Występowanie i oznaczanie hormonów wzrostowych w żywności pochodzenia zwierzęcego

RENATA PIETRZAK-FIEĆKO, STEFAN S. SMOCZYŃSKI, KRYSZYNA A. SKIBNIEWSKA

Zakład Higieny Żywności i Żywnienia Instytutu Żywnienia Człowieka Wydziału Technologii Żywności AR-T,  
Plac Cieszyński 1, 10-718 Olsztyn

Pietrzak-Fiećko R., Smoczyński S. S., Skibniewska K. A.

## The rate of occurrence and level of growth hormones in food products of animal origin

### Summary

The GC-MS method was applied to determine residues of growth hormones in muscle tissue. Following the analysis of the results of the method it was found out that only 42% of internal standard added to the sample remained in the silicised extract. The low recovery of the substances analysed might have led to a wrong conclusion regarding the absence of anabolic hormones in meat. No residues were found with the GC-MS method in samples of muscle tissue of turkey, chicken, cattle and swine collected in the Olsztyn region.

**Keywords:** growth hormones, hormones in food.

W produkcji zwierzęcej trwają obecnie nieustanne poszukiwania różnego rodzaju środków przyspieszających proces wzrostu i opasu zwierząt czyli tak zwanych stymulatorów wzrostu (9, 13). Zainteresowanie związkami hormonalnymi stosowanymi jako stymulatory wzrostu sięga 1939 r., kiedy zaobserwowano zwiększoną zawartość tłuszczu w wątrobie, płucach i mięśniach jako wynik pozajelitowego zastosowania benzoesu estradiolu w drobiu (11). Wyniki późniejszych badań dały podstawę do zastosowania w produkcji zwierząt rzeźnych różnych preparatów hormonalnych o działaniu anabolicznym, które już w latach 50-tych i 60-tych stosowano na szeroką skalę w wielu krajach świata. Najbardziej znanymi były stilbeny – syntetyczne hormony o właściwościach estrogennych, cechujące się wysoką aktywnością anaboliczną, wśród nich diethylstilbestrol (DES) i hexestrol. W 70-tych latach doświadczalnie potwierdzono rakotwórcze działanie DES i innych hormonów, kiedy wykryto rak piersi i szyjki macicy u dziewczynek, hipogonadyzm jądrowy u chłopców oraz rak macicy u kobiet leczonych DES-em przez kilka lat (2). Po stwierdzeniu kancerogennych właściwości stilbenów (14) główne znaczenie jako anaboliki znalazły hormony naturalne, takie jak estradiol  $17\beta$ , testosteron, ich syntetyczne pochodne oraz ksenobiotyczne substancje anaboliczne, np. octan trenbolonu, medroxyprogesteron i roślinny estrogen zeranol. Doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach wykazały działanie rakotwórcze również i tych związków. Dane literaturowe opisujące przedwcześnie rozwinięte seksualnie dzieci w Puerto Rico i

w Włoszech są cytowane na dowód zagrożenia zdrowia przez stosowanie anabolicznych substancji hormonalnych (DES, Zeranol) u zwierząt hodowlanych (11). Te niepokojące obserwacje spowodowały zakaz stosowania anabolicznych związków hormonalnych najpierw w USA, a od 1988 r. w krajach EWG. Od 1 stycznia 1989 r. zabronione jest również stosowanie naturalnych hormonów jako stymulatorów wzrostu zwierząt. Wydanie tych zakazów stało się przyczyną do poszukiwania przez hodowców innych związków chemicznych, które mogą spełnić tę funkcję. Do preparatów tego typu należą między innymi antyhormony zwane także tyreostatykami. Substancje te blokują syntezę hormonów tarczycowych (tyroksyny, trójjodotyroniny) u zwierząt, co sprzyja procesom tuczu. Przyrost masy ciała jest wynikiem zatrzymania wody w tkankach podskórnych, tkance mięśniowej i przewodzie pokarmowym. W Europie Zachodniej w latach 80-tych stosowano z paszą w intensywnym tuczu zwierząt takie związki tyreostatyczne jak tiouracyl, metylotiouracyl, propylotiouracyl, fenylotiouracyl i topazol. Z upływem czasu wykazano jednak szkodliwość tych związków dla zdrowia ludzi i zwierząt. Preparaty te powodują zaburzenia akcji serca, duszność a nawet bezdech, przerost gruczołu tarczycowego i powstanie wola (2).

Znacznie większe w skutkach zagrożenie dla zdrowia ludzi niosą stosowane w wielu krajach zachodnich preparaty należące do grupy tzw.  $\beta$ -agonistów adrenergicznych, z których najbardziej popularne to clenbuterol i cimaterol. Preparaty te zwiększają przy-

rosty wagowe i poprawiają umięśnienie zwierząt, redukując jednocześnie przyrost tkanki tłuszczowej. W 1990 r. wystąpiły zatrucia clenbuterolem w Hiszpanii, gdzie zachorowało 125 osób oraz we Francji, gdzie zachorowały 22 osoby. Objawami choroby były: przyspieszona akcja serca, nudności, bóle głowy, drżenie mięśni, gorączka i uczucie zimna. Przyczyną zatrucia była konsumpcja wątroby wołowej zawierającej od 160-500 µg clenbuterolu w kg. Przeprowadzone śledztwo wykazało, że zwierzętom podano toksyczne dawki leku, a po pojawieniu się objawów zatrucia zwierzęta poddano ubojowi (10, 11).

Dyrektywy EWG zabraniają stosowania stymulatorów wzrostu, jednak wiele krajów członkowskich zezwoliło na ich stosowanie ze względu na korzyści ekonomiczne (4). Według raportu z 1992 r. w Wielkiej Brytanii ustalono maksymalny poziom pozostałości dla clenbuterolu w wysokości 0,5 µg/kg (8). Pozostałości clenbuterolu są wykrywane w moczu i żółci przez ok. 5 dni po zaprzestaniu podawania związku, w wątrobie do 56 dni, a w siatkówce oka do 140 dni. W siatkówce stwierdzono również znacznie wyższe stężenie tego związku, niż w pozostałych tkankach. Elliot i wsp. (5) zalecają stosowanie siatkówki oka jako materiału do kontroli niedozwolonych związków stosowanych w hodowli zwierząt rzeźnych.

W latach 90-tych przemysł farmaceutyczny rozpoczął wytwarzanie zupełnie nowych związków podwyższających efektywność produkcji zwierzęcej. Należą do nich: hormon wzrostu (GH), somatotropina (ST) i związki stymulujące receptor adrenergiczny B 2. Obecnie opracowano na skalę przemysłową wytwarzanie aktywnych somatotropin dla poszczególnych gatunków zwierząt: dla bydła (bST), świń (pST), owiec (oST), drobiu (cST), ryb łososiowatych (sST). Opracowano również syntezę ludzkiego GH (hST) oraz podwzgórzowego czynnika uwalniającego ludzki hormon wzrostu (hGRF). Wytwarzane są również: somatomedyna – insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) – substancja pośrednicząca w działaniu somatotropiny na tkanki oraz somatostatyna (SRIF), która hamuje wytwarzanie i uwalnianie somatotropiny z przedniego płata przysadki (1, 9). Wysoka specyficzność hormonów wzrostu odnosząca się tylko do danego gatunku zwierząt, duża wrażliwość na wysoką temp. (gotowanie) i słabe wchłanianie się w przewodzie pokarmowym powodują, że jest to jeszcze jedna propozycja stymulacji wzrostu, która może w przyszłości znaleźć szerokie zastosowanie. Badania nad tym zagadnieniem prowadzone są również w Polsce na drobiu (6).

W Hong Kongu przez 10 lat prowadzono wiele badań nad pozostałościami hormonów wzrostowych w żywności pochodzenia zwierzęcego (7). Corocznie poddano analizie 900 prób, w których w 1991 r. było 3,4% prób z pozostałościami hormonów wzrostowych. Najczęściej występującym hormonem był hexestrol i oznaczano go przede wszystkim w drobiu. Te i inne

dane wskazują, że mimo prawnych zakazów anaboliczne substancje hormonalne są stosowane nielegalnie w hodowli zwierząt rzeźnych, dlatego konieczna jest kontrola pozostałości tych związków. W Polsce od 1990 r. prowadzone są w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach oraz w Zakładach Higieny Weterynaryjnej w Białymstoku, Gdańsku, Poznaniu, Katowicach i Warszawie badania monitoringowe pozostałości niektórych hormonów anabolicznych i naturalnych w moczu, krwi i tkankach jadalnych zwierząt rzeźnych. Badania te warunkują eksport mięsa z Polski do krajów UE i chronią konsumentów przed niepożądanymi pozostałościami. Wyniki 6-letnich badań wskazują, że dotąd w Polsce pozostałości hormonów anabolicznych nie stanowią problemu. W tym okresie czasu stwierdzono jednak 5 przypadków przekroczenia dopuszczalnego poziomu testosteronu w surowicy bydłowej, mimo iż polskie prawo rygorystycznie zabrania stosowania hormonów (12). Uzasadnia to potrzebę prowadzenia dalszych tego typu badań.

Celem badań była adaptacja metody oznaczania wybranej grupy hormonów wzrostowych jako dodatków paszowych oraz wykorzystanie nowo opracowanej metody do oznaczeń badanej grupy związków w tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych.

### Material i metody

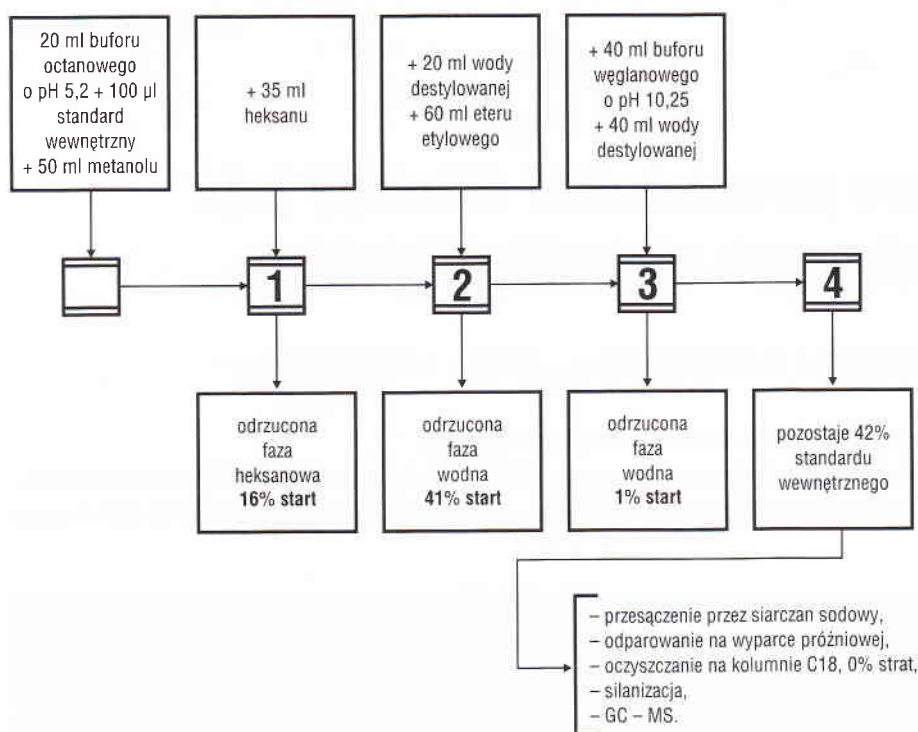
Badania przeprowadzono na próbach tkanki mięśniowej pochodzącej od czterech gatunków zwierząt: indyka, kurczęcia, bydła, świni.

Zasada zastosowanej metody polegała na zhomogenizowaniu prób z buforem octanowym, hydrolizie enzymatycznej z zastosowaniem glukuronidazy, ekstrakowaniu metanolem, odtłuszczeniu n-heksanem, następnie ekstrakowaniu eterem etylowym, odparowaniu, rozpuszczeniu suchej pozostałości w buforze octanowym i oczyszczeniu na kolumnkach octadecylowych C18. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu gazu obojętnego i silonizowano mieszaniną składającą się z 60 części acetonitrylu i 40 części MSTFA zawierającego 5% TMS, następnie oznaczano metodą GC – MS. Oznaczenie pozostałości hormonów wzrostowych wykonywano stosując chromatograf firmy Hewlett – Packard 6890, detektor MSD, kolumna kapilarna RTX – 1:30 m × 0,32 mm, temp. detektora: 250°C, temp. kolumny: 160-260°C, gradient temp.: Δt = 10°C/min, gaz nośny: hel – 0,6 ml/min, dozownik: Splitless.

### Wyniki i omówienie

Zastosowana procedura analityczna do badania pozostałości hormonów wzrostowych w tkankach mięśniowych zwierząt rzeźnych nie potwierdziła obecności badanych związków. Warto w tym miejscu omówić trudności związane z analityką badanych związków. Każdy z etapów przygotowania niesie ze sobą ryzyko częściowej utraty badanego związku co wymaga zastosowania standardu wewnętrznego. W rezultacie, w końcowym ekstrakcie badany związek





Ryc. 1. Procentowy udział standardu wewnętrznego traconego na poszczególnych etapach analizy

występuje w stężeniu bliskim granicy wykrywalności metody lub poniżej.

Przedstawiona schematycznie próbna analiza pozwala na określenie krytycznych punktów metody oznaczania hormonów wzrostowych (ryc. 1).

Stwierdzono, iż z 0,1 µg standardu wewnętrznego dodanego na początku analizy pozostało w końcowym etapie ekstrakcji jedynie 42%. Największa ilość (41%) standardu przechodziła do odrzucanej fazy wodnej na drugim etapie ekstrakcji. Można podejrzewać, że tak duże straty spowodowały właściwości rozpuszczalnika, którym był eter etylowy. Należy zwrócić również uwagę na to, iż dichlorofen jest związkiem bardzo nietrwałym i zaleca się sporządzanie jego roztworu przed rozpoczęciem każdej kolejnej analizy. Podobnie należy postąpić podczas silanizowania próbek, ponieważ uzyskane pochodne są nietrwałe i silanizowanie próby powinno odbywać się bezpośrednio przed analizą chromatograficzną. Wszystkie powyższe czynniki mogą być przyczyną nie wykrycia badanego związku w próbce.

Do oznaczania hormonów anabolicznych w tkankach zwierząt rzeźnych wybrano metodę chromatografii gazowej z detekcją masową. Wybór ten podyktowany był wysoką czułością metody oraz odpowiednimi wymaganiami analitycznymi względem materiału biologicznego.

### Podsumowanie

W wybranych próbach tkanki mięśniowej pochodzącej od różnych gatunków zwierząt rzeźnych nie stwierdzono pozostałości wybranej grupy hormonów anabolicznych. Uzyskane wyniki nie pozwalają na ocenę

czy w Polsce stosuje się stymulatory wzrostu w hodowli zwierząt. W celu zwiększenia możliwości wykrycia przypadków nielegalnego stosowania stymulatorów wzrostu należy kontrolować materiał biologiczny (krew, mocz) pobrany od zwierząt na pewien czas przed ubojem. Od zwierząt poddanych ubojowi należy analizować te tkanki lub organy, które gromadzą najwyższe stężenia badanych związków. Liczne przykłady innych ksenobiotyków występujących w żywności (np. DDT, którego działanie kancerogenne i estrogenne zostało dowiedzione (3)) powinno stymulować dalsze działania mające na celu wyeliminowanie przypadków stosowania niedozwolonych dodatków w tuczu zwierząt. Niezbędne są również dalsze badania nad doskonaleniem technik analitycznych oznaczania hormonów wzrostowych w materiale biologicznym.

### Piśmiennictwo

1. Barej W.: Medycyna Wet. 52, 139, 1996.
2. Crawford L., Franko D.: Animal drugs and human health. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, Pa. 1994.
3. Davis D. L., Bradlow H. L., Wolff M., Woodruff T., Hoel D. G., Anton-Culver H.: Environ. Health Persp. 101, 372, 1993.
4. Dyrektywny EWG Nr 86/469/EEC i 88/146/EEC.
5. Elliot C. T., Crooks S. R. H., Mc Evoy J. G. D., Mc Caughey W. J., Hewitt S. A., Patterson D., Kilpatrick D.: Vet. Res. Comm. 17, 459, 1993.
6. Korelski J.: Biul. Inf. Inst Zoot. 30, 91, 1992.
7. Lee W.-O.: Asean Food J. 9, 13, 1994.
8. Report 1992 Animals, Meat and Meat Products, No 39 (HMSO, London).
9. Roliński Z., Kowalski C., Właż P.: Medycyna Wet. 48, 549, 1992.
10. Szczawiński J.: Medycyna Wet. 49, 27, 1993.
11. Waltner-Toews D., Mc Even S. A.: Prev. Vet. Med. 20, 235, 1994.
12. Wojtoń B., Woźniak B.: Trzoda Chlewna 34, 91, 1996.
13. Woźniak B., Wojtoń B., Michalski M.: Medycyna Wet. 50, 484, 1994.
14. Wyllie S., Liehr J. G.: Arch. Biochem. Biophys. 346, 180, 1997.

Adres autora: mgr inż. Renata Pietrzak-Fiecko, Plac Cieszyński 1, 10-718 Olsztyn

**JOHNSON P., TYAGI S. C., KATWA L. C., GANJAM V. K., MOORE L. A., KREEGER J. M., MESSER N. T.: Aktywacja metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej u koni z ochwatem. (Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis). Vet. Rec. 142, 392-396, 1998 (15)**

W testach zymograficznych przebadano próbki tkanki łącznej pobranej z kopyt 6 koni z ochwatem oraz od 8 zdrowych koni. Celem badań było określenie aktywacji lub indukcji metaloproteinaz w macierzy tkanki łącznej kopyta. Aktywność metaloproteinaz oznaczono metodą Tyagi i wsp. (1993). Aktywność tych enzymów w macierzy tkanki łącznej kopyta była znacznie wyższa u koni z ochwatem. Aktywność kolagenolityczna odpowiadała frakcjom o masie 92, 72 i 66 kDa.