

24. Itoh S., Katsuura G., Takashima A.: Modulation of memory processes by cholecystokinin. W: Gastrin and cholecystokinin: Chemistry, physiology and pharmacology. Wyd.: Bali J.P. i Martinez J. Excerpta Medica (Amsterdam) 49-56, 1987.
25. Lamers C.B., Morley J.E., Poitras P., Sharp B., Carison H.E., Hershman J.M., Walsh J.H.: Am. J. Physiol. 239, E232, 1980.
26. Lewius L.D., Williams J.A.: Am. J. Physiol. 238, G512, 1990.
27. Lin C.W., Holladay M.W., Witte D.G., Miller T.R., Wolfram C.A.W., Bianchi B.R., Bonnett M.J., Nadzan A.M.: Am. J. Physiol. 258, G648, 1990.
28. Lu L., Loie D., Owyang C.: Am. J. Physiol. 256, G430, 1989.
29. Masclee A.A.M., Jansen J.B.M.J., Driessen V.M.H., Geuskens L.M., Lamers C.B.H.W.: Gastroenterology 98, 1338, 1990.
30. Menozzi D., Gardner J.D., Jensen R.T., Maton P.N.: Am. J. Physiol. 257, 673, 1989.
31. Moran T.H., Robinson P.H., Goldrich M.S., Mc Hugh P.R.: Brain Res. 362, 175, 1986.
32. Morley E.: Life Sci. 30, 479, 1982.
33. Mutt V.: Cholecystokinin: isolation, structure and functions W: Gastrointestinal hormones. Wyd.: Glass G.B.J., Raven Press New York, 169-222, 1980.
34. Mutt V., Jorpes J.E.: Eur. J. Biochem. 6, 156, 1968.
35. Nakamura R., Miyasaka K., Kuyama Y., Kitani K.: Dig. Dis. Sci. 35, 55, 1990.
36. Palkovits M., Kiss J.Z., Beinfeld M.C., Williams T.H.: Brain Res. 253, 386, 1982.
37. Rattan S., Goyal R.K.: Gastroenterology 90, 94, 1986.
38. Rehfeld S., Golterman N., Larsson L.I., Emson P.M., Lee C.M.: Fed. Proc. 38, 2325, 1979.
39. Rehfeld J.F., Larsson L.I., Goltermann N.R., Schwartz I.W., Holst J.J., Jensen S.L., Morley J.S.: Nature 284, 33, 1980.
40. Rehfeld J.F.: Am. J. Physiol. 240, G255, 1982.
41. Roberts G.W., Woodhams P.L., Polak J.M., Crow T.J.: Neuroscience 11, 35, 1984.
42. Saito A., Sankaran H., Goldfine I.D., Williams J.A.: Science 208, 1155, 1980.
43. Sakamoto C., Williams J.W., Goldfine L.D.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 124, 497, 1984.
44. Vanderhaeghen J.J., Signeau J.C., Gepts W.: Nature (London) 257, 604, 1975.
45. Vanderhaeghen J.J., Lotstra F., de Mey J., Gilles C.: Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1190, 1980.
46. Villa-Nueva M.L., Collins S.M., Jensen R.T., Gardner J.D.: Am. J. Physiol. 242, G416, 1982.
47. Walsh J.H.: Gastrointestinal hormones. W: Physiology of the gastrointestinal tract. Wyd.: Johnson L.R., Raven Press, New York, 181-225, 1987.
48. Williams J.A.: Biomed. Res. 4, 191, 1982.
49. Zarbin M.S., Wamsley J.K., Innis R.B., Kuhar M.J.: Life Sci. 29, 697, 1981.
50. Zhou Z.Z., Eng J., Pan Y.C.E., Chang M., Hulmes J.D., Raufman J.P., Yalow R.S.: Peptides 6, 337, 1985.

Adres autora: dr Bogdan Feliks Kania, ul. Capri 4/18, 02-762 Warszawa

ANDRZEJ POSYNIĄK, STANISŁAW SEMENIUK, JOLANTA NIEDZIĘLSKA, JAN ŻMUDZKI

artykuł przeglądowy

Analiza pozostałości leków weterynaryjnych – przydatność chromatografii cienkowarstwowej do wstępnych oznaczeń jakościowych

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Analysis of veterinary drug residues: the usefulness of thin layer chromatography for screening procedures

This survey provides a general discussion on drug residue analysis in biological material. Quality criteria for the use of thin layer chromatography in residue analysis have been evaluated and compared with those of other methods. The present application of TLC in residue analysis of antibacterials, growth promoters and neuroleptics has been discussed.

Niektóre leki stosowane w praktyce weterynaryjnej pozostając w organizmie zwierzęcym stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. W związku z tym organizuje się systemy mające na celu kontrolę i eliminowanie żywności zawierającej niedopuszczalne stężenia leków. W próbkach mięśni i narządów pobranych w rzeźniach poszukuje się obecności specyfików dopuszczonych do lecznictwa weteryna-

ryjnego oraz leków, na które obowiązuje bezwzględny zakaz stosowania u zwierząt hodowlanych. Oprócz pozostałości antybiotyków i chemioterapeutyków wykonywane są badania umożliwiające wykrycie stymulatorów wzrostu (hormonów i β -agonistów), neuroleptyków i β -blokerów oraz leków przeciwpasożytniczych. W Instytucie Weterynarii oraz wyspecjalizowanych Zakładach Higieny Weterynaryjnej od wielu już lat prowadzi się stałą kontrolę wspomnianych grup leków w produktach zwierzęcych.

W analizie pozostałości leków w żywności stosuje się różne metody badawcze. Tradycyjnie, metody mikrobiologiczne wykorzystywane są do wykrywania śladowych ilości pozostałości leków przeciwbakteryjnych. Wzrastające zagrożenie toksykologiczne ze strony niektórych leków np. chloramfenikolu oraz wprowadzenie wymogu jednoczesnego badania substancji macierzystych wraz z ich metabolitami w znacznym stopniu przyczyniło się do powstawania nowych procedur analitycznych. Potrzebne były bowiem metody, które umożliwiłyby analizowanie różnych grup leków z odpowiednią czułością

i specyficznością. Stało się wówczas oczywiste, że metody fizykochemiczne mogą sprostać tym wymaganiom i obecnie są one szeroko wykorzystywane w badaniach zawartości leków w produktach zwierzęcych.

Przed procedurami analitycznymi stosowanymi w kontroli pozostałości stawiane są bardzo wysokie wymagania. Oprócz wspomnianej już wykrywalności i specyficzności zastosowane metody winny charakteryzować się niezawodnością, a więc uzyskiwaniem dokładnych i powtarzalnych wyników, a ponadto praktycznością i dostępnością, czyli prostotą i szybkością wykonania. Dość często zdarza się, że dla oznaczeń tego samego leku dostępne są różne procedury; wówczas wybiera się metodę charakteryzującą się większą dokładnością i precyzją. Niemniej ważne jest, aby metoda była bezpieczna w wykonaniu, a także możliwa do powtórzenia przy użyciu ogólnie dostępnej aparatury i odczynników. Bardzo istotnym elementem w ocenie metody jest jej wiarygodność sprawdzana w regularnych badaniach wewnątrzlaboratoryjnych i międzylaboratoryjnych.

Śród metod fizykochemicznych w badaniach pozostałości leków najczęściej wykorzystuje się różne techniki chromatograficzne. Dają one możliwość prowadzenia oznaczeń przesiewowych (skryningowych) oraz pozwalają na wykonanie pełnej analizy ilościowej zawartości leku. Techniki chromatograficzne preferowane są także w analizach potwierdzających. Metody postępowania analitycznego z zastosowaniem chromatografii zazwyczaj składają się z trzech etapów. Najpierw substancje lecznicze ekstrahuje się z materiału biologicznego odpowiednim rozpuszczalnikiem, następnie ekstrakt oczyszczony jest z substancji balastowych. W ostatnim etapie przeprowadzana jest identyfikacja i ewentualna ocena ilościowa zawartości analizowanego leku w badanym materiale.

Analizowanie pozostałości leków przeprowadza się przede wszystkim w mięśniach, nerkach i wątrobach oraz mleku i jajach. Do badań skryningowych przydatne mogą być również łatwo dostępne próbki kału, moczu, żółci i surowicy. Do ekstrakcji dobiera się rozpuszczalniki, które niemal całkowicie wyodrębniają analizowane leki z tak różnorodnego i złożonego materiału. Niektóre rozpuszczalniki, głównie metanol i acetonitryl, wraz z analizowaną substancją izolują z podłoża minimalne ilości lipidów, a jednocześnie denaturują białka. Denaturacja jest o tyle korzystna, że następuje wówczas uwalnianie leków związanych z białkami. Obecnie do oczyszczenia otrzymanych ekstraktów najczęściej wykorzystuje się technikę ekstrakcji do fazy stałej (solid-phase extraction), która w znacznym stopniu usprawniła i uprościła postępowanie w analizie leków.

Instrumentalne techniki chromatograficzne (chromatografia gazowa i wysoko sprawna chromatografia cieczowa) dysponują czułymi i selektywnymi detektorami, umożliwiającymi precyzyjne określenie śladowej zawartości analizowanej substancji w badanym materiale. Współczesne chromatografy cieczowe i gazowe wyposażone są w komputerowe sterowanie procesami analizy i zbierania wyników badań. Taka aparatura badawcza jest bardzo kosztowna i trudna do zastosowania w warunkach laboratoriów terenowych.

Często wystarczy zastosowanie mniej wyrafinowanego postępowania, zwłaszcza do wstępnych oznaczeń jakościowych, które preferowane są przez różne organizacje zajmujące się nadzorem handlu żywnością. Obserwuje się dwa kierunki rozwoju wstępnych metod jakościowych: pierwszy – skiero-

wany jest na selektywne wykrycie konkretnego, pojedynczego leku; mają tu zastosowanie przede wszystkim metody immunochemiczne. W drugim – dającym możliwość jednoczesnej identyfikacji obok siebie różnych substancji leczniczych – preferuje się metody chromatograficzne.

Wśród metod chromatograficznych do wstępnych analiz przesiewowych szczególnie przydatna jest chromatografia cienkowsarstwowa – będąca techniką prostą i łatwą do przeprowadzenia w warunkach laboratoriów terenowych.

Chromatografia cienkowsarstwowa – charakterystyka techniki

Chromatografia cienkowsarstwowa (TLC – thin layer chromatography) w odróżnieniu od innych technik chromatograficznych, które realizowane są w kolumnach, do rozdziału składników analizowanej próbki wykorzystuje otwarte warstwy sorbentów (faza stała) naniesione na płytki szklane lub folie. Rozpuszczalniki lub ich mieszaniny (faza ruchoma) przemieszczając się przez warstwę sorbentu na zasadzie sił kapilarnych powodują rozdział mieszaniny naniesionej na płytkę.

W klasycznej TLC używane są płytki pokryte 0,25 mm warstwą sorbentu, o średnicy ziaren ok. 12 μm , natomiast wysoko sprawne płytki (HPTLC) mają warstwy o grubości 0,2 mm i uziarnienie sorbentu o średnicy 6 μm . Płytki HPTLC są bardziej efektywne, dzięki temu uzyskuje się 4-krotne skrócenie czasu analizy i poprawę czułości. Wykrywalność jest zazwyczaj o rząd wielkości lepsza w porównaniu do klasycznej TLC.

Identyfikacji dokonuje się po rozwinięciu chromatogramu i przeprowadzaniu na powierzchni płytki odpowiednich reakcji chemicznych. Powstałe plamki oglądane są w świetle widzialnym lub w świetle UV przy długościach fali $\lambda = 254$ i 366 nm. Przy wizualnej ocenie chromatogramu nie powinna występować wyraźna różnica w jakości barwy lub fluorescencji pomiędzy plamką badanej substancji a plamką substancji wzorcowej. Dla potwierdzenia uzyskanych wyników przeprowadza się kilka reakcji charakterystycznych dla danej substancji.

Rozdzielone składniki próbki identyfikowane są na podstawie wartości współczynnika R_f , który wyrażany jest jako stosunek drogi środka plamki analizowanej substancji do drogi frontu rozpuszczalnika. W określonym układzie chromatograficznym wartość współczynnika R_f jest charakterystyczna dla analizowanej substancji i umożliwia przeprowadzenie oceny jakościowej.

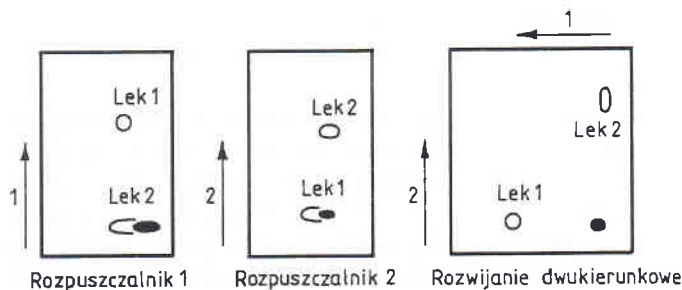
W analizie chromatograficznej istotne jest, aby rozdział wykonany został z odpowiednio dobraną rozdzielczością, sprawnością i selektywnością (13). W badaniach prowadzonych z zastosowaniem chromatografii cienkowsarstwowej wymagane jest przede wszystkim prawidłowe określenie współczynnika R_f , który winien odpowiadać wartości współczynnika R_f substancji wzorcowej. Warunek ten jest spełniony wówczas, gdy błąd w ocenie wartości R_f substancji analizowanej i wzorcowej nie jest większy od 3%, przy rozdziałach przeprowadzonych w tych samych warunkach. Rozdziały muszą być tak dobrane, aby na chromatogramie plamka analizowanej substancji była oddalona od najbliższej plamki o połowę sumy ich średnic.

Analiza za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej nie ogranicza się do podania wartości współczynnika R_f substancji rozdzielanych w jednym układzie. Ta sama próbka może być rozwijana na różnych sorbentach (np. żelu krzemionkowym silica 60 lub żelu modyfikowanym tzw. odwróconą fazą RP-18 lub CN), jak ma to miejsce w przypadku badania anabolików (35). Wykonanie kilku równoległych rozdziałów poprawia specyficzność i zwiększa niezawodność analizy.

W analizie TLC dość często wykorzystuje się dwukierunkowe rozwijanie chromatogramów. Wykazano, że chromatografia dwukierunkowa nie jest tym samym, co rozwijanie w dwóch różnych rozpuszczalnikach. Rozdzielczość i możliwość identyfikacji w chromatografii dwukierunkowej znacznie przekracza jakość dwóch rozdziałów uzyskanych przy jednokierunkowym rozwijaniu. Jak to przedstawiono na ryc. 1. przy pierwszym rozwijaniu nieznany składnik próbki przeszkadza w analizie klenbuterolu, natomiast przy drugim rozwijaniu interferuje z cimaterolem. Przy chromatografii dwukierunkowej możliwy jest pełny rozdział obu leków od utrudniających analizę składników próbki.

Oprócz jakościowej analizy TLC istnieje również możliwość wykorzystania tej techniki jako metody ilościowej. Wówczas stosuje się specjalną aparaturę tzw. denzytometry, które rejestrują intensywność zabarwienia lub fluorescencji plamek znajdujących się na płytce.

W tab. 1. porównano właściwości ilościowej TLC z innymi technikami chromatograficznymi. Na podstawie przedstawio-



Ryc. 1. Teoretyczne porównanie możliwości uzyskiwania rozdziałów TLC przy jedno- i dwukierunkowym rozwijaniu chromatogramów

Objaśnienia: lek 1 – cimaterol, lek 2 – klenbuterol

Tab. 1. Porównanie właściwości TLC z innymi technikami chromatograficznymi

Parametry	TLC	GC	LC
Czas przygotowania	+	++	0
Czas analizy	+	++	++
Koszt	++	+	0
Dokładność i powtarzalność	0	++	++
Zdolność rozdzielania	+	+	++
Niezawodność identyfikacji	+	++	0
Czułość detekcji	+	++	+
Analiza substancji nielotnych	++	0	++
Analiza substancji termolabil.	++	0	++

Objaśnienia: TLC – chromatografia cienkowsarstwowa, GC – chromatografia gazowa, LC – chromatografia cieczowa. Parametry: 0 – niewystarczające, + – dobre, ++ – bardzo dobre

nego zestawienia widać, że chromatografia cienkowsarstwowa nieznacznie ustępuje innym technikom, a w niektórych przypadkach je przewyższa.

W pracy dokonano przeglądu metod wykorzystujących chromatografię cienkowsarstwową w kontroli pozostałości leków weterynaryjnych. Przedstawiono przykłady zastosowań w analizie substancji leczniczych rutynowo stosowanych w praktyce weterynaryjnej – głównie chemioterapeutyków. Wskazano także na przydatność przy wykrywaniu obecności substancji farmakologicznie czynnych nie dopuszczonych do stosowania u zwierząt.

Analiza leków przeciwbakteryjnych

Ze względu na szerokie wykorzystywanie leków przeciwbakteryjnych w praktyce weterynaryjnej, należy liczyć się z możliwością występowania ich pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. Wśród dużej różnorodności grup leków przeciwbakteryjnych chromatografia cienkowsarstwowa znalazła praktyczne zastosowanie przede wszystkim do wykrywania pozostałości sulfametazyny i innych sulfonamidów. Problem występowania pozostałości tych chemioterapeutyków jest tym bardziej istotny, że zaczęto podejrzewać sulfametazynę o działanie kokancerogenne. Niektóre sulfonamidy dość długo utrzymują się w organizmie zwierzęcym, w związku z tym wymagane jest przestrzeganie tzw. okresu wyczekiwania (ok. 7 dni) dla usunięcia ich z tkanek i narządów poniżej dopuszczalnych poziomów tolerancji. W wielu krajach określono dozwolone stężenia sulfonamidów na poziomie 0,1 mg/kg produktu spożywczego.

W praktyce dość często kontrolę pozostałości sulfonamidów w mięsie i mleku przeprowadza się metodami mikrobiologicznymi, których czułość dla większości sulfonamidów waha się w granicach 0,1 – 0,3 mg/kg. Dlatego też proste testy mikrobiologiczne wymagają potwierdzeń innymi metodami.

Klasyyczna, kolorymetryczna metoda Brattona-Marshalla (38) jest czułą metodą wykrywania sulfonamidów, jednak ze względu na możliwość występowania interferencji nie nadaje się zbyt do oznaczeń ilości śladowych. Natomiast połączenie chromatografii cienkowsarstwowej z detekcją odczynnikami Brattona-Marshalla po rozdzieleniu na płytce z powodzeniem jest stosowane do wykrywania pozostałości sulfonamidów (18). W analizie sulfonamidów wykorzystuje się również reakcję z fluoresceiną (31, 34, 42); możliwe jest wówczas wykrycie w analizowanym mięsie stężeń poniżej 0,01 mg/kg.

Praktyczne zastosowanie znalazła TLC również do przyżyciowego wykrywania sulfonamidów u leczonych zwierząt. W tym celu pobiera się próbki moczu i bez uprzedniej obróbki nanosi się na płytki chromatograficzne. Po wykonaniu analizy możliwe jest eliminowanie z uboju zwierząt z wysokimi stężeniami leku.

Podobnie jak sulfonamidy, również i nitrofurany znalazły szerokie zastosowanie w profilaktyce i leczeniu infekcji u świń, drobiu i bydła, wywołanych przez bakterie *E. coli* i *Salmonella*. W odróżnieniu od sulfonamidów, furazolidon i jego 5-nitrofurany analogi są szybko eliminowane z mięśni i narządów leczonych zwierząt. Wobec faktu, że nitrofurany podejrzewane są o mutagenne i kancerogenne działanie, wprowadzono ostre limity na występowanie ich pozostałości. W wielu krajach w ogóle nie dopuszcza się możliwości wy-

stępowania tych leków w żywności, a w niektórych ustalono dopuszczalne stężenie na poziomie – 5 µg/kg.

Wprowadzenie tak ostrych limitów tolerancji wymagało zastosowania czułych technik detekcji, głównie chromatografii cieczowej z detektorem UV, a do potwierdzeń – połączeń z detektorem diodowym lub masowym (25, 32, 41). Przy zastosowaniu TLC możliwa jest również śladowa analiza pochodnych 5-nitrofuranu (furazolidonu, nitrofurantoiny i nitrofurazonu) dzięki specyficznej i bardzo czułej reakcji z pirydyną (20).

Podobnie jak w przypadku syntetycznych chemioterapeutyków, również ze stosowaniem antybiotyków wiąże się możliwość występowania ich pozostałości w produktach spożywczych i istnieje konieczność przestrzegania czasu potrzebnego do wydalenia przez organizm leczonych zwierząt.

Najczęściej do wykrywania pozostałości antybiotyków stosuje się testy mikrobiologiczne (22, 36), jednak metody te mogą czasami dawać zawodne wyniki i nie mają możliwości pełnej identyfikacji wykrytych leków. W ostatnich latach coraz częściej dla pełnej identyfikacji i ilościowych oznaczeń zawartości różnych grup antybiotyków opracowywane są liczne metody z zastosowaniem chromatografii cieczowej i gazowej z detekcją masową (4, 21, 23).

Chromatografię cienkowarstwową wykorzystuje się także do wykrywania obecności niektórych antybiotyków w produktach żywnościowych. W tym celu przeprowadza się na płytce specyficzne reakcje chemiczne, np. dla gentamycyny (40), chloramfenikolu (33) i tetracyklin (2) lub wykonuje bioautografię ze szczepem *Bacillus subtilis* (29). Połączenie TLC z detekcją mikrobiologiczną, pomimo że jest bardziej czasochłonne, to jednak pozwala na jednoczesne wykrycie obok siebie antybiotyków należących do różnych grup.

Analiza stymulatorów wzrostu

Oprócz grup leków dopuszczonych do leczenia stanów chorobowych, często nieuczciwi hodowcy mogą stosować substancje czynne, powodujące szybkie przyrosty masy ciała. Ze względu na udowodnione, uboczne skutki działania tych substancji obowiązuje bezwzględny zakaz podawania ich zwierzętom hodowlanym. Do wykrywania nielegalnie stosowanych stymulatorów wzrostu wykorzystuje się również chromatografię cienkowarstwową.

W ostatnich latach zaobserwowano, że podawanie zwierzętom leków sympatykomimetycznych, tzw. agonistów receptorów β w dawkach wyższych od terapeutycznych powoduje przyrost masy ciała (3, 9, 28). Jednak okazało się, że po spożyciu żywności z pozostałościami klenbuterolu i innych leków tej grupy mogą wystąpić objawy szkodliwego działania na układ krążenia i zaburzenia hormonalne. W krajach, gdzie próbowano zastosować klenbuterol w tuczu wprowadzono zakaz stosowania leków tej grupy u zwierząt (27).

Chromatografię cienkowarstwową wykorzystuje się do wykrywania klenbuterolu, cimaterolu i innych β -agonistów w moczu i tkankach zwierząt rzeźnych (8, 10, 37). Analizę przeprowadza się metodą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej, a rozdzielone związki identyfikuje po reakcji z odczynnikami Ehrlicha. Opisane procedury umożliwiają stwierdzenie obecności ok. 1 ng klenbuterolu w analizowanej próbce, co pozwala określić granicę wykrywalności metody na poziomie 1 µg/l moczu lub 1 µg/kg tkanki.

W przeprowadzonych badaniach porównawczych wyniki analizy TLC korespondują z oznaczeniami przeprowadzonymi metodami immunochemicznymi: radioimmunologiczną i

immunoenzymatyczną (RIA i ELISA) oraz instrumentalnymi technikami chromatograficznymi – cieczową i gazową z detekcją masową (LC – MS i GC–MS).

W wielu krajach wprowadzono zakaz stosowania estrogenów, androgenów i gestagenów u zwierząt (11, 12). Kontrolę obecności w produktach żywnościowych nielegalnie stosowanych anabolików prowadzi się w dwóch kierunkach wykorzystując metody immunochemiczne oraz metody chromatograficzne, umożliwiające jednoczesną analizę różnych hormonów sterydowych.

Jednak niektóre procedury przygotowujące próbki do analiz są dość mocno skomplikowane, pracochłonne i często zawodne. Opracowano więc metody, które między innymi wykorzystują chromatografię cieczową do oczyszczania ekstraktów (5, 6). Dzięki takiemu postępowaniu otrzymuje się czyste ekstrakty, lecz koszt przeprowadzonej analizy jest dość znaczny.

Chromatografię cienkowarstwową wykorzystuje się do wykrywania pozostałości hormonów anabolicznych w próbkach moczu lub kału pobranych na farmach lub w próbkach mięśni i żółci (2, 16, 24, 26). Identyfikację analizowanych związków przeprowadza się po reakcji z kwasem siarkowym, w wyniku której powstają fluoryzujące pochodne steroidów. Metoda jest dość czuła i umożliwia oznaczenie w analizowanym materiale stężeń w granicach od 1 do 10 µg/kg.

Również stosowanie leków hamujących funkcję gruczołów tarczycy objęte jest prawnym zakazem stosowania u zwierząt hodowlanych. Obecność tyreostatyków wykrywa się w tkankach i płynach ustrojowych po rozdziale chromatograficznym w reakcji z cysteiną i wzbudzeniu fluorescencji (7). Zastosowana metoda umożliwia wykrycie 50 µg leku w 1 kg analizowanego materiału.

Analiza neuroleptyków i β -blokerów

Weterynaryjne neuroleptyki i β -blokerzy podawane są w celu zmniejszenia stresu (padnięcia, zmniejszenie masy ciała lub pogorszenie jakości mięsa) związanego z transportem zwierząt rzeźnych. W praktyce zastosowanie z grupy β -blokerów znalazł karazolol, a wśród neuroleptyków – acepromazyna, azaperon, chloropromazyna, propiopromazyna, ksylazyna i inne. Leki te na ogół aplikowane są kilka godzin przed ubojem, co może prowadzić do występowania ich pozostałości w tkankach i narządach. Wprowadzono 3-dniowy okres karencji po zastosowaniu u świń karazololu i azaperonu, zaś dopuszczalne stężenie azaperonu, propiopromazyny i chloropromazyny w nerkach ustalono na poziomie 50 µg/kg, a dla karazololu – 5 µg/kg.

Do wykrywania i oznaczania pozostałości neuroleptyków i β -blokerów wykorzystuje się różne techniki chromatograficzne, fluorymetrię oraz metody immunochemiczne (1, 14, 15).

W oznaczeniach prowadzonych przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej możliwe jest wykrycie niedozwolonych stężeń tych leków przy zastosowaniu reakcji barwnych z odczynnikami Dragendorffa lub roztworem kwasu siarkowego. Ponadto azaperon posiada właściwość fluoryzowania na płytce w świetle UV – na niebiesko, a propiopromazyna – na różowo (17, 19).

Przedstawiony przegląd nie wyczerpuje możliwości zastosowań chromatografii cienkowarstwowej w analizie pozostałości leków weterynaryjnych. Wskazano jedynie na kierunki badań związane bezpośrednio z ochroną zdrowia i mające na celu eliminację produktów zwierzęcych ze szkodliwymi dla człowieka substancjami farmakologicznie czynnymi.

Technika ta może być również wykorzystywana do wykrywania przyczyn padnięć zwierząt po niewłaściwym podaniu leków lub substancji toksycznych, np. pestycydów. Stosuje się ją także do wykrywania środków dopingujących u zwierząt używanych w zawodach sportowych (39).

Piśmiennictwo

1. Arneith W.: Fleischwirtschaft 65, 945, 1985.
2. Bajaj K.L.: J. Chrom. 172, 417, 1979.
3. Baker P.K., Dalrymple R.H., Ingle D.L., Ricks C.A.: J. Anim. Sci. 59, 1256, 1984.
4. Bories G.S.F., Peleran J.C., Wal J.M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1521, 1983.
5. De Brabander H.F., Vanhee P., Vanhaye S., Verbelce R.: J. Planar. Chrom. 2, 33, 1989.
6. De Brabander H.F., Van Hoof J.: J. Planar Chrom. 3, 237, 1989.
7. De Brabander H.F., Verbelce R.: J. Chrom. 108, 141, 1975.
8. Brunn H.: Fleischwirtschaft 68, 11, 1988.
9. Dalrymple R.H., Baker P.K., Gingher D.E., Ingle J., Pensack M., Ricks C.A.: Poultry Sci. 63, 2376, 1984.
10. Degroot J.M., Wyhowski de Bukanski B., Beernaert H., Courtheyn D.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 198, 128, 1989.
11. EEC Directive 81/602 Nr L 222/32, 1981.
12. EEC Directive 86/469 Nr L 275/36, 1985.
13. EEC Directive 89/610 Nr L 351/39, 1989.
14. Engelsma J.W., Simens J.: Vet. Quart. 7, 73, 1985.
15. Etter R., Battaglie R., Noser J., Schuppisser F.: Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. 75, 447, 1984.
16. Garcia G., Saelzer R., Vega M.: J. Planar Chrom. 4, 223, 1991.
17. Van Ginkel L.A., Schwillens P.L.W.J., Ollino M.: Analytica Chimica Acta 225, 137, 1989.
18. Goodsped D.P., Simpson R.M., Ashworth R.B., Shafer J.W., Cooke H.P.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 61, 1050, 1978.
19. Haagsma N., Bathelt E.R., Engelsma J.W.: J. Chrom. 436, 73, 1988.
20. Heofis J.P., Mertz J.L., Herrett R.J., Diaz J.R., Van Hart D.C., Olivard J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 720, 1980.
21. Johannes B., Korfer K.H., Schod J., Ulbrich J.: Arch. Lebensmit. 34, 1, 1983.
22. Johnson R.W., Reamer R.M., Harris E.W., Fugate H., Schab B.: J. Food Prot. 44, 828, 1981.
23. Kenkens K.J., Beek W.M.J., Aerts M.M.L.: J. Chrom. 352, 445, 1986.
24. Van Look L., Deschuytere Ph., Van Peteghem C.: J. Chrom. 489, 213, 1989.
25. Malisch R.: Lebensm. Unters. Forsch. 183, 253, 1986.
26. Medina M.B., Schwartz D.P.: Food Addit. Contam. 4, 415, 1987.
27. Martinez N.J.F.: Lancet 336, 1311, 1990.
28. Miller M.F., Garcia D.K., Coleman M.E., Ekeren P.A., Lunt D.K., Wagner K.A., Procknor M., Weish T.H., Jr., Smith S.B.: J. Anim. Sci. 66, 12, 1988.
29. Neidert E., Saschenbrecker P.W., Tittger F.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 70, 197, 1987.
30. Oka H., Uno K., Harada K.J., Kaneyama M.: J. Chrom. 260, 457, 1983.
31. Reimer G.J., Suarez A.: J. Chrom. 955, 315, 1991.
32. Samuelsen O.B.: J. Chrom. 528, 495, 1990.
33. Schwartz D.P., McDonough F.E.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 67, 563, 1984.
34. Sigel C.W., Wooley J.L., Nickol C.A.: J. Pharm. Sci. 64, 973, 1975.
35. Smets F., De Brabander H.F., Bloom P.J., Pottie G.: J. Planar. Chrom. 4, 207, 1991.
36. Smither R.: J. Appl. Bacteriol. 45, 267, 1978.
37. Schmitz P., Pelcer G., Degand G., Gaspar P., Maghuin-Rogpster B.T.: Ann. Med. Vet. 133, 427, 1989.
38. Tishler F., Sutter J.L., Bathish J.A., Hagman H.E.: J. Agric. Food. Chem. 16, 5053, 1968.
39. Tsuneo T., Sugako A., Atoushi M.: J. Chrom. 496, 407, 1989.
40. Vega H.A., Garcia G., Gesche E., Saelzer R.: J. Planar. Chrom. 4, 142, 1991.
41. Vroomen L.H.M., Berghmans M.C.J., Van der Straijns T.D.B.: J. Chrom. 362, 141, 1986.
42. Woolley J.L., Murch O., Sigel C.W.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 61, 545, 1978.

Adres autora: dr Andrzej Posyński, ul. Sadowa 4/21, 24-100 Puławy

ZYGMUNT CYGAN, JAN BUCZEK*

Zachorowania cieląt wywołane przez *C. perfringens* A i C^{*)}

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

*Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

Calf morbidity caused by *Clostridium perfringens* A and C

Twelve *Clostridium perfringens* strains were isolated in 12 calves that had died with diarrhoea on two farms. On the basis of seroneutralization of antitoxins by diagnostic sera, 10 strains were classified into serotype A and 2 into serotype C. Most of the strains (7) were isolated from the small intestines of calves that died 7-18 h from the onset of diarrhoea. Characterization of the toxins revealed the presence of alpha, beta, kappa, mi and ni toxins, as well as enterotoxin. Pathogenic aerobic microflora was absent. The results point to the presence (for the first time) in Poland of nonenterotoxigenic strains of *C. perfringens* A, and in some cases together with *C. perfringens* C in the etiology of diseases in calves. Such cases were also found in other countries.

Choroby cieląt, związane etiologią z *C. perfringens*, są to zaburzenia uogólnione typu enterotoksemii o nadzwyczaj gwałtownym przebiegu, najczęściej z obecnością w treści jelit oraz we krwi serotypowo różnych jądów letalnych (głównie B, C, D, wg 5, 7, 16, 33, 36, rzadko A, E, wg 2, 6, 11, 26, 29, 30, 31), a także mniej poznane procesy lokalne, stanowiące stany zapalne jelit (*enteritis anaerobica*), coraz częściej łączone z oddziaływaniem toksyn (5, 22, 35), z reguły jednak trudnych do wykrycia, bowiem wiązanych niemal natychmiast w tkankach *in situ* działania (dotyczy szczepów serotypu A wg 4, 17, 35), względnie szybko po wytworzeniu inaktywowanych przez enzymy trawienne (odnosi się także do typu C, wg 10, 12, 19, 22). Zatem w przypadkach niewykrywalności antygenów letalnych maleje znaczenie klasycznych

*) Praca finansowana przez KBN, Nr umowy PB 1599/5/91