

# Tempo eliminacji 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny, markera pozostałości tiamuliny, u świń

RAFAŁ ZAŃ, CEZARY KOWALSKI, ZBIGNIEW ROLIŃSKI, ARTUR BURMAŃCZUK

Zakład Farmakologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Zań R., Kowalski C., Roliński Z., Burmańczuk A.

## Elimination rates of 8- $\alpha$ -hydroxymutilin, a residue marker of tiamulin in pigs

### Summary

Tiamulin, a semi-synthetic antibiotic agent, is exclusively used in veterinary medicine and is rapidly distributed in the body and intensively metabolized in the liver.

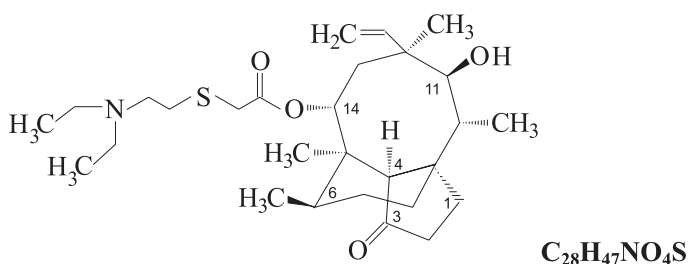
The aim of the study was to estimate the residue levels of tiamulin metabolite in pigs' tissues after oral and intramuscular administration.

The experiment was carried out on 38 pbz breed weaners, divided into two groups. One of the groups was administered Tiamowet 45% granulate orally at a dose of 24 mg/kg b.w./day, and the other was administered Tiamowet 200 intramuscularly at a dose of 15 mg/kg b.w./day. Both drugs were taken for 5 days. The weaners from both groups were slaughtered on days 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 15 following the end of drug administration. Samples of tested tissues from the livers and muscles were isolated in order to measure the residue marker level. 8- $\alpha$ -hydroxymutilin residues were estimated according to the GC method by Marcus and Sherma in their own modification. A validation method procedure was also carried out. The GC experiment showed that 8- $\alpha$ -hydroxymutilin concentration in the tested muscles attains a lower level than that of MRL i.e. 100  $\mu$ g/kg on day 10 following intramuscular Tiamowet 200 preparation administration and on day 12 following oral Tiamowet 45% granulate administration.

**Keywords:** tiamulin, 8- $\alpha$ -hydroxymutilin, pigs

Tiamulina (ryc. 1) jest półsyntetyczną pochodną pleuromutyliny, mającą zastosowanie wyłącznie w lecznictwie zwierząt. Ze względu na swoją stabilność, krystaliczną strukturę oraz dobrą rozpuszczalność w wodzie, antybiotyk ten jest idealnym środkiem do stosowania w paszach, z wodą do picia, jak również w postaci iniekcyjnej u świń. W lecznictwie weterynaryjnym tiamulina stosowana jest najczęściej w postaci rozpuszczalnego w wodzie wodorofumaranu (1).

Szereg porównawczych badań farmakokinetycznych, przeprowadzonych na antybiotykach z różnych grup, wykazało znaczną rozbieżność w wynikach uzyskanych metodami mikrobiologicznymi i metodami chromatograficznymi. Podstawowym warunkiem, który musi być



Ryc. 1. Wzór strukturalny i sumaryczny tiamuliny

spełniony przy określaniu stężeń antybiotyku w plazmie lub tkankach z zastosowaniem metod mikrobiologicznych jest fakt, że lek lub jego metabolity w organizmie nie mogą tracić swojej aktywności przeciwbakteryjnej. Utrata tej aktywności podczas któregoś z etapów losów leku w ustroju pociąga za sobą brak wrażliwości referencyjnych drobnoustrojów wskaźnikowych, a co za tym idzie brak wiarygodności wyników (7, 21).

Według danych z piśmiennictwa tiamulina ulega szybkiemu metabolizmowi w organizmie do szeregu mało aktywnych lub nieaktywnych mikrobiologicznie metabolitów, które mogą wywierać niekorzystne działanie toksyczne dla organizmu ludzkiego (8-11). Z tego względu Europejska Agencja Oceny Produktów Medycznych (EMA) przy określaniu czasu zanikania tiamuliny z tkanek wskaźnikowych świń zaleca pomiar sumy metabolitów tego antybiotyku, które po ekstrakcji organicznymi rozpuszczalnikami są hydrolizowane do pochodnych  $\alpha$ -hydroksymutyliny i oznaczane jako równoważnik w postaci 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny (4-6).

Tiamulina jest aktualnie zaliczona przez Komitet ds. Leków Weterynaryjnych (CVMP) do Wykazu I z wyznaczonymi wartościami MRL dla królików, indyków, świń i kurcząt rzeźnych. Wyznaczone wartości MRL,

pozostałości 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w tkankach wskaźnikowych u świń wynoszą dla mięśni 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i wątroby – 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (4-6).

Struktura chemiczna cząsteczki tiamuliny przyczynia się do występowania problemów analitycznych, zarówno przy badaniu zawartości tej substancji w paszach, jak również w tkankach zwierzęcych. Zawiodły próby analizy z zastosowaniem kolumn jonowymiennych z różnymi polarnymi fazami stacjonarnymi ze względu na wartość pH tiamuliny, które wynosi ok. 8,0. Dodatkowo tiamulina nie wykazuje aktywności fluorescencyjnej, a słabą oznaczalność – przy badaniu z zastosowaniem detektora UV (20, 22).

Ilościowego określenia tiamuliny w preparatach leczniczych i w paszach można dokonać za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (12) i chromatografii cieczowej (LC) (13-15, 18). Natomiast określanie pozostałości tiamuliny w tkankach zwierzęcych musi być prowadzone za pomocą odpowiednio czulej metody, tzn. chromatografii gazowej (GC) poprzedzonej derywatyzacją metabolitów (16, 17). Obecnie rutynowymi metodami oznaczeń, zalecanymi przez CVMP, stosowanymi do oznaczeń pozostałości tiamuliny w tkankach zwierzęcych jest chromatografia gazowa z detekcją elektrochemiczną lub detekcją wychwytu elektronów (5, 6).

Zastosowana w badaniach maksymalna dawka dobową przez okres 5 dni – 24 mg/kg m.c. tiamuliny, w przeliczeniu na substancję czynną, przy stosowaniu preparatu doustnego Tiamowet 45% – granulat oraz 15 mg/kg, dla preparatu iniekcyjnego Tiamowet 200, została zalecona przez producenta. Stosowanie maksymalnych dawek jednorazowych i dobowych przy badaniach pozostałości leków weterynaryjnych zaleca Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (2, 3).

## Materiał i metody

**Badane leki.** Badania przeprowadzono z preparatem iniekcyjnym Tiamowet 200 zawierającym zasadę tiamuliny – 16,22 g (co odpowiada 20 g wodorofumaranu tiamuliny/100 ml) oraz preparatem do stosowania doustnego Tiamowet 45% – granulat, zawierającym wodorofumaran tiamuliny – 45 g/100 g. Jako standardu markera tiamuliny użyto 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny, firmy Biochemie, Niemcy.

Badania z preparatem Tiamowet 200 przeprowadzono ogółem na 20 warchlakach płci mieszanej, rasy pbz, o wyjściowej masie ciała 14-22 kg. W tej grupie 18 warchlaków stanowiło zwierzęta doświadczalne, które otrzymywały preparat Tiamowet 200 w przeliczeniu na substancję czynną, w dawce 15 mg/kg m.c./24 h, domięśniowo, przez 5 dni. Dwa pozostałe warchlaki stanowiły źródło tkanek kontrolnych. Zwierzęta poddano ubojowi po upływie 3, 6, 10 i 15 dni od zaprzestania podawania preparatu. Podczas kwarantanny i trwania doświadczenia warchlaki były żywione mieszanką ze sruł zbożowych oraz otrzymywały wodę *ad libitum*.

Drugą serię badań, z preparatem doustnym Tiamowet 45% granulat, przeprowadzono na 16 warchlakach doświadczalnych i 2 kontrolnych obojga płci, rasy pbz, o wyjściowej ma-

się ciała 19-24 kg. Preparat Tiamowet 45% – granulat podawano zawieszony w 0,5% roztworze metylocelulozy, indywidualnie *per os* w dawce 24 mg/kg m.c./24 h aktywnej substancji, przez okres 5 dni. Warchlaki poddano ubojowi po 4, 8, 12 i 15 dniach od zaprzestania podawania preparatu. Zwierzęta kontrolne przetrzymywano w odizolowanych boksach, w takich samych warunkach, co grupy zwierząt doświadczalnych. Ubój warchlaków kontrolnych nastąpił w innym terminie. Bezpośrednio po uboju od każdego zwierzęcia pobierano próbki mięśni i wątroby, które poddawano zamrożeniu i przechowywano w temp.  $-30^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analizy chromatograficznej. W analogiczny sposób pobrano próbki tkanek wskaźnikowych od warchlaków kontrolnych.

**Walidacja metody analitycznej.** Metoda chromatograficzna (GC) wg Marcus i Sherma (16) w modyfikacji własnej, została wstępnie poddana procesowi walidacji, który potwierdził jej przydatność do określania poziomu markera pozostałości tiamuliny w tkankach zwierzęcych. W tym celu każdą próbę na odzysk oraz próby ślepe poddano identycznej procedurze jak próby pozyskane od zwierząt doświadczalnych. Określano również trwałość analitu w matrycy biologicznej, zakres liniowy metody, dokładność metody GC na podstawie określenia stopnia odzysku 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny, specyficzność metody oznaczania 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny przy użyciu GC/MS (17), granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) (19).

**Procedura ekstrakcji tiamuliny z tkanek (wątroba i mięśnie) według Marcus i Sherma (16) w modyfikacji własnej.** Każdą próbkę poddawano homogenizacji przez 1-2 min., pobierano 30 g homogenatu i ekstrahowano 300 ml mieszaniną ekstrakcyjną (0,5M HCl + aceton; 1 : 60, v/v). Przesącz poddawano ochłodzeniu przez 20 minut w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$  w celu wytrącenia tłuszczu. Aceton z uzyskanego przesączu odparowywany był w temp.  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  w wyparce rotacyjnej. Pozostałość wodną, zawierającą wszystkie rozpuszczalne metabolity tiamuliny, ochładzano w łaźni lód-woda.

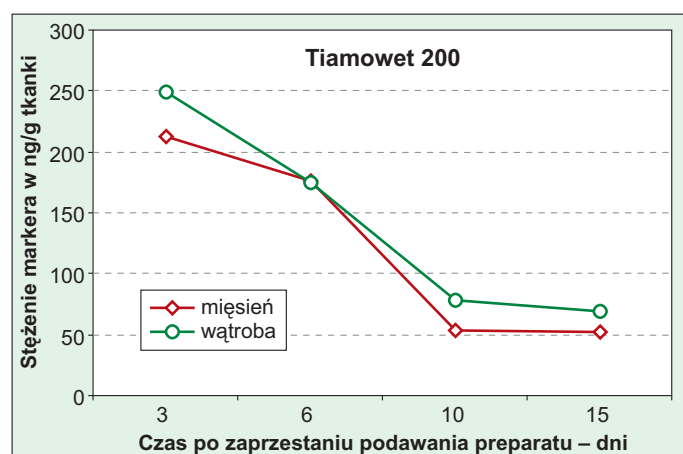
**Etap hydrolizy metabolitów tiamuliny.** Do uzyskanego wyciągu wodnego dodawano 20 ml 0,2 M kwasu solnego, 12 ml 7 N NaOH i inkubowano w łaźni wodnej w temp.  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut, celem hydrolizy metabolitów tiamuliny. Po hydrolizie wyciąg zakwaszano 7 ml stężonego kwasu solnego. Następnie ekstrahowano powstałe pozostałości z 20 ml chloroformu w rozdzielniku. Fazę chloroformową odparowywano do oleistej pozostałości w temp.  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  w odparowywaczu próżniowym, po czym kolbę przedmuchiowano azotem i ochładzano w łaźni lód-woda.

**Sprzęganie metabolitów tiamuliny z PFPA dla formowania fluorowej pochodnej 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny.** W pierwszym etapie dodawano 2,0 ml roztworu sprzęgającego (1% TEA w mieszaninie aceton-benzen, 1 : 2) do kolby z odparowanym wyciągiem z tkanek. W drugim etapie odmierzano 1,0 ml roztworu z pozostałościami (= 20,0 g tkanki), dodawano 0,1 ml bezwodnego pentafluoropropionianu (PFPA) i ogrzewano przez 20 min. w temp.  $60^{\circ}\text{C}$ , przeprowadzając reakcję sprzęgania.

**Oczyszczanie fluorowanej pochodnej.** Oczyszczanie prowadzono przy użyciu kolumny chromatograficznej wypełnionej florisilem i siarczanem sodu. Otrzymany eluat odparowywano w wyparce rotacyjnej w temp.  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Kolbę z odparowanym eluatem przedmuchiowano powietrzem aż do wysuszenia, a pozostałość rozpuszczano w 20 ml benzenu. Rozpuszczony eluat poddawano analizie chromatograficznej (GC).

Tab. 1. Stężenie 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny (ng/g tkanki), markera pozostałości tiamuliny w próbkach wątroby i mięśni warchlaków, otrzymujących domięśniowo preparat Tiamowet 200 w dawce 15 mg/kg m.c./24 h w przeliczeniu na substancję czynną przez 5 kolejnych dni ( $\bar{x} \pm s$ )

Preparat	Dzień po zaprzestaniu podawania	Stężenie markera	
		wątroba	mięśnie
Tiamowet 200	3.	248,9 $\pm$ 34,5	212,7 $\pm$ 45,4
	6.	174,6 $\pm$ 93,7	175,8 $\pm$ 91,6
	10.	77,7 $\pm$ 84,0	53,8 $\pm$ 53,3
	15.	69,2 $\pm$ 53,0	52,3 $\pm$ 25,8



Ryc. 2. Średnie stężenia pozostałości 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w tkankach warchlaków otrzymujących domięśniowo preparat Tiamowet 200

**Analiza chromatograficzna.** Zestaw do GC: chromatograf gazowy – Unicam model 610; GC kolumna kapilarna Supelco SP-2250 – Sigma-Aldrich 30 m  $\times$  0,32 mm, film 0,20  $\mu$ m; dozownik Splitless, 280°C; detektor ECD, 330°C.

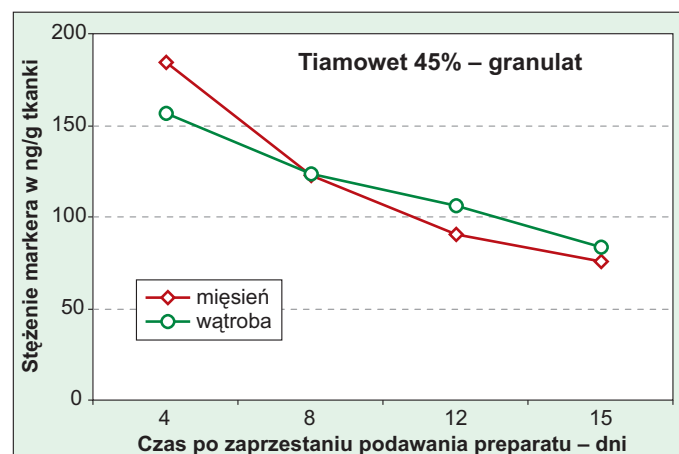
**Procedura analizy chromatograficznej (GC) dla określenia pozostałości markera tiamuliny – 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny jako koniugatu PFPA według Marcus i Sherma (16) w modyfikacji własnej.** Warunki rozdzielania chromatograficznego: 70°C przez 2,0 min., od 70° do 240°C w tempie 4°C/min., 240°C przez 5 min.; gaz nośny – wodór, 30 cm/s. Czas retencji w zakresie 25,2 min. do 27,3 min. W zależności od właściwości aparatury analitycznej, w metodyce wg Marcus i Sherma, poziom pozostałości może być obliczany z wysokości piku lub z pola powierzchni piku. Podczas badań przy użyciu GC Unicam model 610, stwierdzono że w celu wykonania obliczeń bardziej obiektywnym sposobem będzie zastosowanie obliczeń stężeń pozostałości z pola powierzchni piku.

## Wyniki i omówienie

Wprowadzenie metody GC wg Marcus i Sherma (16) w warunkach krajowych, wymagało sprawdzenia dostępności odczynników, dostępności wzorca markera pozostałości tiamuliny oraz uzyskania kolumny kapilarnej o charakterystycznych cechach. W trakcie prowadzonych procedur analitycznych przy wykonywaniu stwierdzono, że przy zachowaniu podstawowych środków ostrożności w pracy laboratoryjnej, użyta metoda

Tab. 2. Stężenie 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny (ng/g tkanki), markera pozostałości tiamuliny w próbkach wątroby i mięśni warchlaków, otrzymujących doustnie preparat Tiamowet 45% granulatu, w dawce 24 mg/kg m.c./24 h w przeliczeniu na substancję czynną przez 5 kolejnych dni ( $\bar{x} \pm s$ )

Preparat	Dzień po zaprzestaniu podawania	Stężenie markera	
		wątroba	mięśnie
Tiamowet 45% granulatu	4.	156,6 $\pm$ 28,8	184,6 $\pm$ 25,2
	8.	123,3 $\pm$ 40,4	123,0 $\pm$ 19,1
	12.	106,2 $\pm$ 25,3	90,4 $\pm$ 19,5
	15.	83,2 $\pm$ 14,6	75,8 $\pm$ 14,7



Ryc. 3. Średnie stężenia pozostałości 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w tkankach warchlaków otrzymujących doustnie preparat Tiamowet 45% – granulatu

jest bezpieczna dla wykonawców i środowiska. Jak się w trakcie wykonywania tej pracy okazało, stosowane procedury analityczne można stosunkowo łatwo dostosować do wykonywania oznaczeń w różnych matrycach (np. mięśniach). Jedyną niedogodnością ocenianych i sprawdzanych procedur analitycznych wg Marcus i Sherma (16) jest ich duża czasochłonność.

Średnie wartości stężeń 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny – markera pozostałości tiamuliny w tkankach wskaźnikowych warchlaków po domięśniowym stosowaniu przez 5 dni preparatu Tiamowet 200 w dawce 15 mg/kg m.c./24 h w przeliczeniu na substancję czynną przedstawiono w tab. 1.

Oznaczenia tego markera w tkankach warchlaków po 3, 6, 10 i 15 dniach techniką GC, wykazały, że pozostałości 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny były wykrywalne w obu badanych tkankach wskaźnikowych (mięśnie, wątroba) przez 15 dni od zaprzestania podawania leku. Krzywe obrazujące przebieg eliminacji markera pozostałości tiamuliny w obu badanych tkankach miały przebieg zstępujący, osiągając już po upływie 10 dni od podania preparatu Tiamowet 200 poziom niższy od wyznaczonych wartości MRL (ryc. 2). Analizując proces eliminacji markera pozostałości tiamuliny z obu tkanek wskaźnikowych, można powiedzieć, że stężenia markera po upływie 3 i 6 dni od odstawienia badanego leku w mięśniach i wątrobie miały zbliżone po-

ziomy. Po 3 dniach wynosiły średnio ( $n = 4$ ): mięśnie –  $212,7 \pm 45,4$  ng/g, wątroba –  $248,9 \pm 34,5$  ng/g, a po 6 dniach wynosiły średnio ( $n = 5$ ): mięsień –  $175,8 \pm 91,6$  ng/g i wątroba –  $174,6 \pm 93,7$  ng/g. Po 10 dniach od zaprzestania podawania leku stężenia pozostałości markera w obu badanych tkankach uległy znacznemu obniżeniu i wartości średnie ( $n = 5$ ) wynosiły: mięśnie –  $53,86 \pm 53,3$  ng/g i wątroba –  $77,7 \pm 84,0$  ng/g (tab. 1).

Po 15 dniach wyczekiwania, stężenia markera pozostałości tiamuliny osiągnęły najniższe wartości średnie ( $n = 4$ ): mięśnie –  $52,3 \pm 25,8$  ng/g i wątroba –  $69,2 \pm 53,0$  ng/g, to jest poziom wielokrotnie niższy niż wartości MRL.

Przedstawione wyniki badań nad pozostałościami markera tiamuliny – 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w tkankach wskaźnikowych (mięśnie, wątroba) po zastosowaniu domięśniowym preparatu Tiamowet 200 u warchlaków, pozwalają na stwierdzenie, że proces eliminacji pozostałości tego antybiotyku przebiega stosunkowo wolno, mniej więcej równolegle z mięśni i wątroby (ryc. 2).

Wyniki określenia pozostałości markera tiamuliny – 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w wątrobie i mięśniach warchlaków, po stosowaniu doustnym przez 5 dni preparatu Tiamowet 45% granulatu (tiamulina w dawce 24 mg/kg m.c. aktywnej substancji), przedstawiono w tab. 2. Przeprowadzone badania wykazały, że 8- $\alpha$ -hydroksymutyliną, marker pozostałości tiamuliny występował na wykrywalnym poziomie w wątrobie i mięśniach jeszcze po upływie 15 dni od zaprzestania podawania leku. Średnie wartości ( $n = 4$ ) stężenia markera po 15 dniach od odstawienia leku wynosiły odpowiednio: w przypadku wątroby –  $83,2 \pm 14,6$  ng/g i mięśni –  $75,8 \pm 14,7$  ng/g tkanki. Świadczy to, że w ciągu 15 dni po odstawieniu podawanego doustnie antybiotyku, tempo zanikania metabolitów tiamuliny z obu tkanek wskaźnikowych było podobne. Potwierdza to również porównanie krzywych zanikania pozostałości markera tiamuliny w wątrobie i mięśniach w ciągu 15 dni od zaprzestania podawania tiamuliny (ryc. 3).

Przy dosyć równomiernym rozmieszczeniu pozostałości markera tiamuliny w obu tkankach wskaźnikowych, główną wykładnią do wyznaczenia okresu karencji dla świń po doustnym stosowaniu tiamuliny, jest poziom pozostałości tego antybiotyku w mięśniach. Na przykład, po 4 dniach od zaprzestania podawania tiamuliny średnie stężenie 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny wynosiło w wątrobie –  $156,6 \pm 28,8$  ng/g i w mięśniach –  $184,6 \pm 25,2$  ng/g. W następnym badanym okresie, to jest po 8 dniach, poziom pozostałości w obu tkankach wskaźnikowych był podobny i wynosił w wątrobie –  $123,3 \pm 40,4$  ng/g i mięśniach –  $123,0 \pm 19,1$  ng/g. Po 12 dniach poziom pozostałości markera tiamuliny uległ po raz pierwszy w mięśniach obniżeniu do wartości poniżej granicy wyznaczonej przez MRL dla tej tkanki i wynosił średnio  $90,4 \pm 19,5$ . W przypadku wątroby przy wartości MRL dla markera tiamuliny wynoszącej 500  $\mu$ g/kg, spadek 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w tej tkance

obserwowano już po 4 dniach od odstawienia preparatu Tiamowet 45% granulatu.

Uzyskane wyniki badań nad stężeniami pozostałości markera tiamuliny – 8- $\alpha$ -hydroksymutyliny w tkankach wskaźnikowych (mięśnie, wątroba), po stosowaniu doustnym preparatu Tiamowet 45% granulatu u warchlaków, wskazują, że proces eliminacji tego antybiotyku przebiega po podaniu *per os* wolniej niż po podaniu domięśniowym preparatu Tiamowet 200. Dłuższy okres eliminacji pozostałości tiamuliny u warchlaków po stosowaniu doustnym preparatu Tiamowet 45% granulatu, może być spowodowany bardziej rozległym procesem dystrybucji tiamuliny w organizmie.

## Piśmiennictwo

1. Anon.: Freedom of Information Office, Center for Veterinary Medicine, Supplement to NADA 139-472, Environmental Assessment, Denagard® (tiamulin) Premixes, July 1988.
2. Anon.: Komisja Rejestracji Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych, Materiały, Warszawa 1997.
3. Anon.: Leki weterynaryjne 2001. Instytut Leków, Wyd. SI-MA Warszawa 2001.
4. Anon.: Tiamulin Summary Report (1). Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/MRL/578/99-Final, August 1999.
5. Anon.: Tiamulin Summary Report (2). Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/MRL/724/00-Final, January 2000.
6. Anon.: Tiamulin Summary Report (3). Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/MRL/747/00-Final, July 2000.
7. Atef M., El-Gendi A. Y., Amer A. M. M., Abdi El-Aty A. M.: Disposition kinetics of florfenicol in goats by using two analytical methods. J. Vet. Med. A 2001, 48, 129-136.
8. Brooks G., Burgess W., Colthurst D., Hinks J. D., Hunt E., Pearson M. J., Shea B., Takle A. K., Wilson J. M., Woodnutt G.: Pleuromutilins. Part 1: The identification of novel mutilin 14-carbamates. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 9, 1221-1231.
9. Dreyfuss J., Singhvi M., Shaw J. M., Egli P., Ross J. J., Czok R., Nefzger-Biessels M., Bating F., Shuster L., Schmook F.: Metabolism of tritium- and carbon- 14- labeled tiamulin in dogs, rats, and pigs. J. Antibiot. 1979, 32, 496-503.
10. Hanson R. L., Matson J. A., Brzozowski D. B., LaPorte T. L., Springer D. M., Patel R. N.: Hydroxylation of mutilin by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella echinulata*. Org. Process Res. Dev. 2002, 6, 482-487.
11. Hunt E.: Pleuromutilin antibiotics. Drugs Fut. 2000, 25, 1163-1168.
12. Krzek J., Kwiecień A., Starek M., Kierszniewska A., Rzeszutko W.: Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin, and spectinomycin in veterinary preparations by thin-layer chromatography/densitometry. J. AOAC Int. 2000, 83, 1502-1506.
13. Marcus J., Sherma J.: Method I. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in feed premixes. J. AOAC Int. 1993, 76, 444-446.
14. Marcus J., Sherma J.: Method II. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in tiamulin-poly(vinyl chloride) formulations. J. AOAC Int. 1993, 76, 447-448.
15. Marcus J., Sherma J.: Method III. Liquid chromatographic determination of tiamulin hydrogen fumarate in complete swine meal feeds. J. AOAC Int. 1993, 76, 449-450.
16. Marcus J., Sherma J.: Method IV. Gas chromatographic determination of tiamulin residues in swine liver. J. AOAC Int. 1993, 76, 451-458.
17. Marcus J., Sherma J.: Method V. Gas chromatographic/mass spectro metric confirmation of 8-hydroxymutilin, a tiamulin metabolite, in swine liver extracts. J. AOAC Int. 1993, 76, 459-460.
18. Moore D., Britton N., Smallidge R., Riter K.: Determination of tiamulin in type C medicated swine feeds using high throughput extraction with liquid chromatography. J. AOAC Int. 2002, 85, 533-540.
19. Piskorska-Pliszczynska J.: Walidacja metod badawczych – wymagania, zalecenia i praktyka. Medycyna Wet. 2002, 58, 827-831.
20. Rodriguez-Comesaña M., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J.: Screening method for detecting cross-contamination residues of tiamulin in swine feeds. J. AOAC Int. 2003, 86, 449-452.
21. Szeszy S.: Analysis of tetracyclines in environmental and food samples using a selective extraction procedure and sensitive detection system by coupling HPLC with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. Praca dokt. Tierärztliche Hochschule, Hannover 2001.
22. Springer D. M., Goodrich J. T., Huang S.: A novel ring expansion of the pleuromutilin skeleton. Tetrahedron Lett. 2002, 43, 4857-4860.

Adres autora: dr Rafał Zań, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: rafal.zan@ar.lublin.pl