

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVIII
2008
SUPPLEMENT 4**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Piotr Kowalski

**ILOŚCIOWE OZNACZANIE CHEMIOTERAPEUTYKÓW
W MATERIALE BIOLOGICZNYM POCHODZENIA
ZWIERZĘCEGO ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY
KAPILARNEJ Z UWZGLĘNIENIEM NAJWYŻSZEJ
DOPUSZCZALNEJ POZOSTAŁOŚCI**

*The quantification of chemotherapeutics in biological
samples of animal origin by capillary electrophoresis with
the allowance of maximum residual limit*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Akademii Medycznej w Gdańsku
p.o. Kierownika: Dr Danuta Rajzer

Gdańsk 2008

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE.....	11
1.1. Pojęcia antybiotyko- i chemioterapii	11
1.2. Historia rozwoju lecznictwa weterynaryjnego. Chemioterapeutyki u zwierząt	11
1.3. Pozostałości chemioterapeutyków w żywności pochodzenia zwierzęcego.....	12
1.3.1. Przyczyny stosowania leków przeciwbakteryjnych w hodowli zwierząt.....	12
1.3.2. Substytuty ASW.....	14
1.3.3. Przyczyny pojawiania się pozostałości chemioterapeutyków	14
1.3.4. Skutki obecności pozostałości leków w żywności	15
1.3.5. Kontrola pozostałości środków leczniczych	16
1.4. Nowe techniki separacyjne	19
1.5. Techniki analityczne stosowane w analizie leków w materiale biologicznym.....	21
1.6. Analiza pozostałości leków (testy przesiewowe i potwierdzające).....	23
2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	25
3. MATERIAŁ I METODY OZNACZEŃ	27
3.1. Materiał badawczy	27
3.2. Substancje wzorcowe.....	28
3.3. Schemat badania substancji leczniczych w materiale biologicznym	28
3.4. Strategia opracowania procedury analitycznej do badań elektroforetycznych.....	29
4. PRZEBIEG BADAŃ	31
4.1. Procedura przygotowania prób do analizy elektroforetycznej	31
4.1.1. Pobieranie prób	31
4.1.2. Izolacja analitów z prób biologicznych.....	31
4.1.3. Optymalizacja procedury oczyszczania ekstraktów	36
4.2. Warunki separacji elektroforetycznej	43
4.2.1. Analityczna długość fali.....	43
4.2.2. Kondycjonowanie systemu	43
4.2.3. Ustalanie parametrów separacji elektroforetycznej.....	44
4.2.4. Czynniki wpływające na optymalizację oznaczania elektroforetycznego	45
4.2.5. Dobór wzorca wewnętrznego.....	50
4.3. Ocena procedury przygotowania prób do analizy pozostałości leków i badań farmakokinetycznych.....	50

4.3.1. Przydatność do oznaczeń w różnym materiale, pochodzącym od różnych gatunków zwierząt hodowlanych	51
4.3.2. Analiza ilościowa. Ocena statystyczna metody w aspekcie oznaczania śladowych ilości leków	51
5. WYNIKI ANALIZ ELEKTROFORETYCZNYCH.....	59
5.1. Wyniki testów przeprowadzonych na zwierzętach, którym podawano leki.....	59
5.2. Wyniki prób tkanek jadalnych pochodzących z marketów	62
5.3. Badania farmakokinetyczne	63
5.4. Okresy karencji	65
6. Dyskusja	67
6.1. Trudności napotykane przy analizie chemioterapeutyków w materiale biologicznym	67
6.2. Optymalizacja metody w aspekcie właściwości fizykochemicznych analitów	67
6.3. Optymalizacja warunków izolacji analitów z materiału biologicznego	70
6.4. Optymalizacja warunków oczyszczania ekstraktu	71
6.5. Detekcja i separacja elektroforetyczna.....	72
6.6. Wpływ pH i stężenia buforu na separację analitów	73
6.7. Rola MEKC i związków powierzchniowo-czynnych	74
6.8. Rozwiązania analityczne zastosowane w pracy	75
6.9. Detektory w analizie pozostałości.....	77
7. Podsumowanie i wniosek	78
8. Streszczenie.....	80
9. Summary.....	83
10. Piśmiennictwo.....	86

ROZPRAWA HABILITACYJNA JEST PODSUMOWANIEM BADAŃ ZAWARTYCH W NASTĘPUJĄCYCH PUBLIKACJACH:

1. **Kowalski P.**, Olędzka I., Okoniewski P, Świłała M., Lamparczyk H.: Determination of streptomycin in eggs yolk by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 1999, 50 (1/2), 101.
2. **Kowalski P.**, Olędzka I., Lamparczyk H.: Capillary electrophoresis in analysis of veterinary drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 937.
3. **Kowalski P.**, Olędzka I.: Pozostałości leków przeciwbakteryjnych w tkankach jadalnych zwierząt. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2003, 36, 417.
4. **Kowalski P.**, Bieniecki M., Olędzka I., Lamparczyk H.: Validated capillary electrophoretic method for the analysis of ivermectin in plasma after intragastric administration in pigs and horses. *Biomed. Chromatogr.* 2004, 18, 302.
5. Olędzka I., **Kowalski P.**: Opracowanie metody oznaczania iwermektyny w jadalnych tkankach zwierząt rzeźnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2005, 38, 387.
6. **Kowalski P.**, Olędzka I.: Pozostałości kokcydiostatyków w tkankach jadalnych drobiu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2005, 38, 391.
7. **Kowalski P.**, Konieczna L, Chmielewska A., Olędzka I., Plenis A., Bieniecki M., Lamparczyk H.: Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 39, 983.
8. **Kowalski P.**: Wykrywanie i oznaczanie streptomycyny w tkankach jadalnych świń za pomocą elektroforezy kapilarnej. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2006, 39, 309.
9. **Kowalski P.**: Advantages and disadvantages of the capillary electrophoresis in drug analysis. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sectio DDD* 2006, XIX, N 2, 5, 35.
10. **Kowalski P.**: Capillary electrophoretic determination of thiamphenicol in turkeys serum and its pharmacokinetic application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 222.

11. **Kowalski P.**, Konieczna L.: Determination of penicillins antibiotics in poultry muscle by capillary electrophoresis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2007, 51, 595.
12. **Kowalski P.**, Plenis A.: Simultaneous determination of six quinolone antibiotics in poultry and porcine samples by capillary electrophoresis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2008, 52, 81.
13. **Kowalski P.**, Plenis A., Ołędzka I.: Optimization and validation of capillary electrophoretic method for the analysis of amphenicols in poultry tissues. *Acta Pol. Pharm. – Drug Research* 2008, 65, 45.
14. **Kowalski P.**: Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 47, 487.

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY

- ACN – acetonitryl (*Acetonitrile*)
ASW – antybiotykowe stymulatory wzrostu (*Antibiotic Growth Promoters*)
BIAS – błąd systematyczny (*Systematic Distortion of Statistic*)
BSE – gąbczaste zwyrodnienie mózgu (*Bovine Spongiform Encephalopathy*)
CC α – decyzyjna wartość graniczna (*Decision Limit*)
CC β – zdolność wykrywania analitów (*Detection Capability*)
CE – elektroforeza kapilarna (*Capillary Electrophoresis*)
CJD – choroba Creutzfeldta-Jakoba (*Creutzfeldt - Jakob Disease*)
CMC – graniczne stężenie micelarne (*Critical Micelle Concentration*)
CMR – certyfikowany materiał odniesienia (*Certified Reference Material*)
CVMP – Komitet ds. Leków Weterynaryjnych (*Committee for Veterinary Medicinal Products*)
CZE – strefowa elektroforeza kapilarna (*Capillary Zone Electrophoresis*)
DAD – detektor spektrofotometryczny z matrycą fotodiodową (*Diode Array Detector*)
EC – Komisja Europejska (*European Commission*)
ECD – detektor wychwytu elektronów (*Electron Capture Detection*)
EDTA-Na₂ – sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (*Ethylendiamine Tetraacetic Acid Disodium Salt*)
ELP – kapilara z rozszerzoną średnicą celki detekcyjnej (*Extended Light Path Capillary*)
EOF – przepływ elektroosmotyczny (*Electroosmotic Flow*)
GC – chromatografia gazowa (*Gas Chromatography*)
JECFA – Komitet Ekspertów ds. Dodatków do Żywności
HPCE – wysokosprawna elektroforeza kapilarna (*High Performance Capillary Electrophoresis*)
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*High Performance Liquid Chromatography*)
LC – chromatografia cieczowa (*Liquid Chromatography*)
LIF – detektor fluorescencyjny ze wzbudzeniem laserowym (*Laser Induced Fluorescence*)
LOD – granica wykrywalności (*Limit of Detection*)
LOQ – granica oznaczalności ilościowej (*Limit of Quantification*)
LLE – ekstrakcja do fazy ciekłej (*Liquid - Liquid Extraction*)
MAC – minimalne stężenie antybiotyczne (*Minimum Antibiotic Concentration*)
MIC – minimalne stężenie hamujące (*Minimum Inhibitory Concentration*)
MEKC – micelarno elektrokinetyczna chromatografia kapilarna, micelarna elektroforeza kapilarna (*Micellar Electrokinetic Chromatography*)
MS – spektrometria mas (*mass spectrometry*)
MRL – najwyższa dopuszczalna pozostałość (*Maximum Residue Limit*)

MRPL – najmniejsze stężenie pozostałości substancji niedozwolonej (*Minimum Required Performance Limit*)

Ph. Eur. – Farmakopea Europejska (*European Pharmacopoeia*)

QC – kontrola jakości (*Quality Control*)

RSD – względne odchylenie standardowe (*Relative Standard Deviation*)

SD – odchylenie standardowe (*Standard Deviation*)

SDB1 – wypełnienie styrenowo-diwinylbenzylowe

SDS – dodecyłowy siarczan sodowy (*Sodium Dodecylsulfate*)

SPE – ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction*)

TCA – kwas trichlorooctowy (*Trichloroacetic Acid*)

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (*Thin Layer Chromatography*)

Tris – Tris-(hydroksymetylo)aminoetan (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*)

USP – Farmakopea Amerykańska (*United States Pharmacopoeia*)

WE/EU – Wspólnota Europejska (*European Union*)

WPL – weterynaryjny produkt leczniczy (*Veterinary Medicinal Product*).

1. WPROWADZENIE

1.1. Pojęcia antybiotyko- i chemioterapii

W literaturze spotykane są dwa pojęcia dotyczące leczenia chorób wywołanych przez drobnoustroje: antybiotykoterapia i chemioterapia. Antybiotykoterapią przyjęto nazywać stosowanie naturalnych i półsyntetycznych leków przeciwbakteryjnych, swoście działających na drobnoustroje będące przyczyną infekcji. Termin chemioterapia obejmuje zwykle stosowanie u ludzi i zwierząt syntetycznych związków chemicznych, które hamują rozmnażanie lub niszczą wybiórczo czynniki zakaźne. Pojęcie to używane jest również do określenia metod systemowego leczenia nowotworów złośliwych przy udziale cytostatyków. Jednakże, niezależnie od sposobu wytwarzania tych leków, obecnie nazwa – chemioterapia – używana jest w aspekcie stosowania zarówno leków przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwwirusowych, jak i przeciw pasożytniczych [35, 68]. W opracowaniach anglojęzycznych przyjęto nazwę chemoterapia (*chemotherapy*), jednak obecnie w terminologii medycznej oba pojęcia (chemioterapia oraz chemoterapia) stosowane są często wymiennie.

1.2. Historia rozwoju lecznictwa weterynaryjnego. Chemioterapeutyki u zwierząt

Sztuka leczenia zwierząt sięga kilku wieków p.n.e. Wówczas istniały pierwsze szpitale dla zwierząt przy organizacjach militarnych, co potwierdziły prace archeologiczne przeprowadzone w Indiach. Powstanie i prowadzenie lecznictwa weterynaryjnego zwierząt hodowlanych datuje się od czasu wybuchu pomoru bydła, które nawiedziło Europę w XVIII wieku [68]. Pierwsze środki chemioterapeutyczne do leczenia chorób zakaźnych użyte zostały w końcu XIX wieku (Paul Ehrlich, 1891). Rozwój epoki antybiotyko- i chemioterapii nastąpił od czasu wykrycia penicyliny (Fleming 1929) i sulfonamidów (Domagk, 1935). Substancje o budowie sulfonamidów zapoczątkowały erę stosowania środków przeciwbakteryjnych w leczeniu klinicznym. Jednak dopiero produkcja antybiotyków na skalę przemysłową spowodowała lawinowy wzrost ich obecności w różnych dziedzinach życia. Początkowo, z uwagi na wysokie koszty produkcji, do paszy zwierząt dodawane były jedynie substancje o charakterze antybiotyków, powstałe, jako produkty uboczne w trakcie wytwarzania antybiotyków dla ludzi [11]. Badania wykonane w połowie lat 50. XX wieku potwierdziły naukowo zarówno cel, jak i sens stosowania antybiotyków, jako dodatków do pasz zwierzęcych. Przeprowadzone testy dowiodły także, że substancje te wykazują działanie stymulujące wzrost zwierząt hodowlanych i powodują zwiększe-

nie masy tkankowej żywego inwentarza. Zapoczątkowało to zjawisko powszechnego ich stosowania w hodowli, zwłaszcza od czasu syntezy większego spektrum związków o działaniu przeciwbakteryjnym i pojawienia się ASW. Lata 70. XX wieku przyniosły oddzielenie antybiotyków paszowych (stosowanych w profilaktyce) od leczniczych (stosowanych w terapii weterynaryjnej). Z badań przeprowadzonych w placówkach kontrolujących żywność w końcu lat 90. XX w. wynikało, że ponad 80% populacji zwierząt w trakcie chowu otrzymuje przynajmniej jeden związek leczniczy z wodą pitną lub jako dodatek do paszy, a pozamedyczne zużycie samych antybiotyków przekraczało połowę ich produkcji (30 mln. kg). Dane z rynku krajowego wykazują, że produkcja żywca drobiowego w 2007 r. wynosiła 1 560 tys. kg, co w porównaniu z danymi z 1997 r. stanowi wzrost o 129%. Średnia masa brojlerów kurzych w tym okresie wzrosła z 1,96 kg do 2,28 kg, przy czym okres tuczu drobiu został skrócony z 48 do 43 dni. W minionym stuleciu, dzięki wprowadzeniu nowych osiągnięć z dziedziny genetyki do hodowli zwierząt, otrzymano nowe, bardziej produktywne rasy. Jednakże poprawa wspomnianych parametrów produkcyjnych nie jest jedynie wynikiem wprowadzania bardziej produktywnych ras, lecz przede wszystkim powszechnego stosowania środków chemioterapeutycznych.

1.3. Pozostałości chemioterapeutyków w żywności pochodzenia zwierzęcego

1.3.1. Przyczyny stosowania leków przeciwbakteryjnych w hodowli zwierząt

Stosowanie leków weterynaryjnych (zwłaszcza chemioterapeutyków i substancji o charakterze anabolicznym) stało się obecnie nieodzowną praktyką w nowoczesnej, zwłaszcza wielkostadnej produkcji zwierzęcej. Środki te nie tylko znacząco zmniejszają pojawianie się chorób zakaźnych, ale również w niewielkim stopniu pobudzają procesy anaboliczne [65] i tym samym prowadzą do zwiększenia rentowności „produkcji żywca”. W przewodzie pokarmowym zwierząt, podczas nadmiernego procesu fermentacji bakteryjnej, dochodzić może do namnażania się drobnoustrojów chorobotwórczych oraz wyzwalać toksyn, będących produktami ich przemiany. Konsekwencją tego jest zaburzenie równowagi mikrobiologicznej przewodu pokarmowego, pogorszenie stanu zdrowia oraz spadek ich możliwości produkcyjnych.

Fermowy system hodowli oraz wprowadzanie nowoczesnych ras hodowlanych mają na celu uzyskanie stosunkowo wysokiej wydajności produkcji i przyrostu masy ciała, przy jednocześnie niewielkich nakładach finansowych. Efektem wzrostu intensywności żywienia zwierząt hodowlanych było powszechne wprowadzanie do pasz różnych dodatków, stanowiących suplementy diety, takich jak: witaminy, sole mineralne oraz substancje lecznicze (głównie chemiote-

rapeutyki, kokcydiostatyki, anaboliki). Leki przeciwbakteryjne okazały się szczególnie przydatne w eliminacji przewlekłych infekcji przewodu pokarmowego zwierząt, powodując jednocześnie wzrost efektywności produkcji. Chemioterapeutyki podawane w paszach w niewielkich ilościach powodują stabilizację flory bakteryjnej przewodu pokarmowego oraz służą optymalizacji procesów trawienia i wchłaniania składników odżywczych w kosmkach jelitowych (związków azotowych, witamin, cukrów i minerałów). Wpływając na procesy biochemiczne zachodzące w komórkach somatycznych oraz gruczołach dokrewnych, leki przeciwbakteryjne (podawane w dawkach subterapeutycznych) poprawiają trawienie tłuszczu, zwiększają apetyt oraz powodują wzrost syntezy składników zwiększających masę zwierząt [35, 69]. Ich działanie w znaczący sposób wpływa nie tylko na intensyfikację przyrostu wagi zwierząt, lecz również powoduje zmniejszenie ich śmiertelności.

Jeszcze do niedawna oprócz substancji przeciwbakteryjnych, aplikowanych jedynie leczniczo w hodowlach wielkostatnych, szeroko rozpowszechnione były antybiotyki paszowe, mające na celu zapobieganie rozwojowi wielu chorób infekcyjnych. Od 1 stycznia 2006 r. Rada Wspólnot Europejskich (WE/EU) wprowadziła decyzję o zakazie stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu innych niż kokcydiostatyki i histomonostatyki (art. 11, ust. 1 Rozporządzenia WE Nr 1831/2003 [20]). Jedną z możliwości stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt, na terenie krajów należących do EU, jest obecnie podawanie ich w paszach leczniczych (*medicated feedingstuffs*). Wcześniej przeprowadzone badania w Szwecji (1986 r.) oraz w Danii (2000 r.) wykazały, że rezygnacja ze stosowania antybiotyków paszowych nie przyniosła drastycznego zmniejszenia ich zużycia w hodowli zwierząt. Wraz z zakazem stosowania ASW zaobserwowano wzrost wykorzystania antybiotyków leczniczych, które charakteryzują się lepszym wchłanianiem z przewodu pokarmowego od antybiotyków paszowych, doskonale przenikają do krwioobiegu i penetrują do narządów wewnętrznych oraz potencjalnych tkanek jadalnych. Zakaz stosowania antybiotyków, jako stymulatorów wzrostu może, więc skutkować zwiększeniem nielegalnego ich użycia w celach profilaktycznych. Hodowcy podają je z reguły całym stadom zwierząt, choć jedynie jedno lub kilka sztuk zachorowało. Terapia oraz działania profilaktyczne, wykorzystujące pasze lecznicze są tańsze w porównaniu z innymi sposobami zapobiegania infekcjom zwierząt hodowlanych [7]. Wprawdzie, niektóre z firm wyspecjalizowały się już w produkcji pasz z dodatkiem „biokomponentów”, jednak pasze te są droższe o ok. 20% w porównaniu z prefiksami, zawierającymi antybiotyki paszowe.

Problemy związane z utrzymaniem rentowności produkcji mięsnej nabrały charakteru globalnego, znacznie przekraczając granice państw członkowskich EU. Wycofanie ASW miało na celu nie tylko sprostanie wymaganiom „wybrednych” konsumentów, lecz również miało ograniczyć import produktów pochodzenia zwierzęcego z krajów, którym trudno sprostać jest nowym wymaganiom. Nieoficjalne dane z roku 2007 podają, że około 70% substancji leczniczych

przeznaczonych do produkcji leków weterynaryjnych pochodzi z Chin, kolejne 20% z Indii, jedynie 10% przypada na pozostałą część świata.

1.3.2. Substytuty ASW

Konieczność eliminacji ASW z pasz przeznaczonych dla zwierząt hodowlanych spowodowała w ciągu ostatnich dwóch lat wzrost zainteresowania alternatywnymi sposobami prewencji weterynaryjnej. Kluczowym zagadnieniem była zmiana programu żywieniowego, umożliwiająca wzmocnienie naturalnej odporności zwierząt. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na wyselekcjonowanie stosunkowo bezpiecznych i efektywnych w swym działaniu produktów przez modyfikowanie składu i ilości pewnych składników pokarmowych. Badania wykazały, że stosowanie kwasów organicznych (mrówkowego, mlekowego, propionowego) w znaczący sposób poprawia strawność wielu składników pokarmowych (zwłaszcza białek). Dzieje się to dzięki zwiększeniu aktywności enzymów, głównie proteaz, które w pośredni sposób powodują przyrost masy ciała zwierząt nawet o kilkanaście procent. Ponadto, obniżenie wartości pH przewodu pokarmowego utrudnia lub nawet zapobiega namnażaniu się patogennych mikroorganizmów. Wśród dodatków paszowych, stymulujących odporność znalazły miejsce także probiotyki (żywe kultury bakterii), prebiotyki (oligosacharydy), ekstrakty ziołowe, immunostymulatory i enzymy paszowe, które w istotny sposób wpływają na poprawę wykorzystania paszy oraz umięśnienie tuszy. Wszystkie te zabiegi mają na celu stworzenie substytutu naturalnych warunków hodowli zwierząt, które w czasach przed „erą wielkostadnego chowu fermowego” pożywiały się m.in. mikroorganizmami, kwasami organicznymi, ziołami naturalnie występującymi w środowisku. Doskonalenie tego typu dodatków paszowych, poprawa ich skuteczności oraz poszukiwanie nowych substytutów ASW stanowiąc będą w najbliższej przyszłości jeden z głównych przedmiotów badań.

1.3.3. Przyczyny pojawiania się pozostałości chemioterapeutyków

Pojawienie się pozostałości leków w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego wynika głównie z nieprzestrzegania przepisów prawa, które reguluje postępowanie zarówno z produktami leczniczymi, jak i paszami zawierającymi środki lecznicze. Niewłaściwe ich stosowanie w celach terapeutycznych (dotyczy chorych zwierząt) lub nadmierne ich używanie, jako środków profilaktycznych, aby zapobiec infekcjom bakteryjnym, jak również nieprzestrzeganie okresów karencji są najczęstszymi przyczynami pojawiania się niedopuszczalnych stężeń pozostałości leków w żywności pochodzenia zwierzęcego. Z rutynowych kontroli Głównego Inspektora Weterynarii wynika, że naj-

częstszym uchybieniem jest zastosowanie substancji farmakologicznie czynnych, niezarejestrowanych, jako weterynaryjny produkt leczniczy (WPL). W charakterze dodatków paszowych często pojawiają się nowe substancje biologicznie czynne (głównie leki przeciwbakteryjne i substancje anaboliczne), które używane są niekiedy w niedozwolonych ilościach. Stąd celowym jest rozszerzenie badań na substancje farmakologicznie czynne spoza listy leków stosowanych wyłącznie w weterynarii.

Bezpośrednim źródłem pozostałości chemioterapeutyków w tkankach jadalnych zwierząt są dodatki paszowe i premiksy przeznaczone dla zwierząt hodowlanych. W skład paszy leczniczej wchodzi prefiks leczniczy, zmieszany według przepisu z odpowiednim nośnikiem paszowym. W ostatnich latach poddano weryfikacji poglądy dotyczące nie tyle wartości odżywczej, co bezpieczeństwa pasz, jak i dodatków paszowych. Jeszcze do niedawna dość wysoko cenione mączki mięsno-kostne, stały się potencjalnym zagrożeniem dla zwierząt hodowlanych (głównie z powodu BSE, „choroby szalonych krów”) oraz dla ludzi poprzez spożywanie produktów mięsnych, zawierających priony, mogące wywoływać chorobę Creutzfeldta-Jakoba (CJD).

Do przyczyn występowania pozostałości zaliczane są także błędy człowieka: tj. złe wymieszanie składników, omyłkowe wprowadzenie innej substancji leczniczej, świadome lub przypadkowe przekroczenie dawki. Mniejszy wpływ na pojawianie się pozostałości leków w tkankach jadalnych mają uwarunkowania biologiczne, które dotyczą głównie indywidualnych różnic w biodostępności lub eliminacji substancji, zależnych od wieku, płci i gatunku zwierzęcia. Interakcje z innymi, równoległe podawanymi lekami występują dość rzadko, jednakże ich efektem może być spowolnienie metabolizmu lub gromadzenie się w tkankach pozostałości, które nie uległy metabolizmowi.

1.3.4. Skutki obecności pozostałości leków w żywności

Stosowanie leków weterynaryjnych w trakcie hodowli zwierząt niesie ze sobą szereg niebezpieczeństw. Pozostałości leków przeciwbakteryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego (występujących, jako związki macierzyste oraz ich metabolity) mogą powodować rozwój zjawiska lekooporności bakterii chorobotwórczych (uodparnianie się patogennych dla człowieka bakterii), a także reakcje alergiczne u osób wrażliwych lub odczyny toksyczne. W związku ze stale obniżającą się naturalną odpornością populacji ludzkiej, coraz więcej uwagi przywiązuje się do źródeł tego zjawiska. Zbyt krótki czas aplikacji lub zbyt małe dawki chemioterapeutyków powodują przeżywanie szczepów chorobotwórczych, które stają się z czasem nośnikami warunkującymi oporność mutacji. Już w latach 80. XX wieku wzrost oporności na antybiotyki dotyczył szczepów: salmonelli, gronkowców i pałeczek okrężnicy. Reakcje alergiczne (bezpośrednie lub odległe w czasie, ujawniające się przy okazji ponownego zetknięcia z le-

kiem) występują w ostatnich latach znacznie częściej i bywają bardziej niebezpieczne. Mogą objawiać się wysypkami skórnymi, stanami astmatycznymi lub u osób wrażliwych mogą pojawić się objawy wstrząsu anafilaktycznego. Najbardziej alergotwórcze bywają penicyliny, (na które wrażliwe jest 3 – 10% populacji), mniej (do 3%) wywołują pozostałości sulfonamidów. Toksyczne skutki obecności pozostałości leków w żywności są stosunkowo niewielkie, jednak znacznie bardziej niepokojąca jest możliwość toksyczności przewlekłej, która w odniesieniu do niektórych chemioterapeutyków może ujawnić się w działaniu mutagennym czy teratogennym. Nie bez znaczenia jest fakt, iż niektóre z chemioterapeutyków stosowanych w weterynarii mogą wykazywać działanie kancerogenne [30, 39]. Wprawdzie obowiązuje zakaz stosowania leków o ewidentnym działaniu toksycznym, jednakże nauka nie dysponuje wiedzą o efektach długotrwałego ich przyjmowania, szczególnie o skutkach oddalonych w czasie oraz o wpływie na potomstwo.

Ponadto istotnym problemem, wynikającym z dość długiej trwałości niektórych chemioterapeutyków (tj. sulfonamidy, fluorochinolony), jest zdolność zalegania tych leków i ich metabolitów w środowisku (wody, gleby, ścieki, nawozy naturalne). Odchody zwierzęce pochodzące z wielkostadnych hodowli stosowane są, jako nawozy i właśnie tą drogą substancje lecznicze najczęściej dostają się do biosfery [37], zaburzając biologiczną równowagę flory i fauny glebowej. Ponadto, poprzez częściowe hamowanie proces rozkładu materii organicznej stanowią jedną z przyczyn eutrofizacji wód (ucieczkę soli pokarmowych do wód gruntowych) [53].

1.3.5. Kontrola pozostałości środków leczniczych

Chemioterapeutyki podawane zwierzętom hodowlanym w dawkach terapeutycznych i subterapeutycznych przez krwioobieg docierają do narządów wewnętrznych, które w większości po uboju stają się tkankami jadalnymi. Kluczowymi elementami kontroli pozostałości leków są przede wszystkim dawka leku i czas, jaki upłynął od ich ostatniego podania do chwili pozyskania tkanek. Systematyczne narażenie zwierząt na długotrwałą ekspozycję nawet niewielkich dawek chemioterapeutyków prowadzić może do kumulacji tych związków w tkankach i w produktach żywnościowych z nich otrzymany. Wielkości stężeń pozostałości leków w tkankach zależą nie tylko od wielkości dawek, częstotliwości stosowania, drogi podania, ale także od oddziaływania na organizm zwierzęcia czy charakteru samej substancji leczniczej. Ze względu na niekiedy wysokie dawki i aplikację przez stosunkowo długi okres czasu, eliminacja leków z organizmu może trwać do kilku lub kilkunastu dni. Szczególnie niebezpieczne są związki farmakologicznie czynne, które posiadają predyspozycje do kumulacji w organizmie. Długotrwałe utrzymywanie się substancji leczniczej umożliwia wielokrotne badanie jej stężenia w płynach ustrojowych oraz pozwala na

bieżącą ocenę stopnia retencji w tkankach zwierząt. W przypadku związków wolno ulegającym metabolizmowi i wydalaniu, zaobserwować można wzrost ich stężenia w płynach ustrojowych w miarę upływu czasu i stopniową ich eliminację, występującą dopiero po paru tygodniach od czasu ostatniego podania. Stąd okresy karencji ustalane przez Światową Organizację Zdrowia (FAO/WHO) dla większości związków różnią się wielkościami i wynoszą od kilku do kilkudziesięciu dni.

Mając na uwadze szereg zagrożeń (mikrobiologicznych, immunologicznych, toksycznych oraz środowiskowych), jakie niesie ze sobą zjawisko pozostałości leków weterynaryjnych, ustalono system regulacji prawnych mówiący, iż artykuły spożywcze pochodzące od zwierząt, leczonych środkami weterynaryjnymi nie mogą zawierać pozostałości substancji leczniczych ani ich metabolitów na poziomie, które mogłyby stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Podstawowe zasady regulujące wprowadzenie na rynek produktów weterynaryjnych w krajach EU zawarte są w Dyrektywie 2001/82/EC i Rozporządzeniu EC (European Commission – EC) No 2377/90 (uaktualnianym i obejmującym obecnie ok. 130 wznowień) [17]. W krajach EU analizą ryzyka pozostałości leków stosowanych w weterynarii zajmują się: Europejska Agencja Oceny Leków (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – EMEA) i Komitet ds. Leków Weterynaryjnych (Committee for Veterinary Medicinal Products – CVMP). Organem doradczym, działającym przy FAO/WHO jest niezależny Komitet Ekspertów do Spraw Dodatków do Żywności (JECFA). Strategia działań EU opiera się na ograniczeniu stosowania chemioterapeutyków w celach profilaktycznych, zakazie używania antybiotykowych stymulatorów wzrostu oraz na podjęciu na szeroką skalę badań monitoringowych pasz, tkanek jadalnych zwierząt rzeźnych oraz samej żywności. Komitet Naukowy EU ds. Żywności (Scientific Committee on Food – SCF) oceniając ryzyko narażenia konsumentów na pozostałości tych leków doradza, by uwzględniać także addytywny charakter toksyczności dotyczący zarówno związków macierzystych, jak również ich metabolitów. Większość chemioterapeutyków jest stosunkowo szybko eliminowana z organizmu, ale niektóre produkty ich przemian posiadają zdolność kumulacji. Stąd kontrolą objęte są także ich metabolity (enro- i cyprofloksacyna, siarczany strepto- i dihydrostreptomycyny, wybrane leki z grupy tetracyklin i ich epimery).

Stosowanie chemioterapeutyków wymaga nie tylko szczegółowych aktów legislacyjnych, ale również wiarygodnych badań laboratoryjnych w ramach nadzoru farmaceutycznego oraz inspekcji weterynaryjnej. Od czasu wstąpienia do EU, Polska klasyfikowana jest, jako szósty, co do wielkości producent żywności w Europie (po Niemczech, Anglii, Francji, Hiszpanii, Włoszech) i podlega wszystkim regulacjom prawnym, które obowiązują na obszarze krajów członkowskich.

Jednym z podstawowych kryteriów, określających stosowanie substancji leczniczych w hodowli zwierząt, których tkanki przeznaczono do spożycia, są

wielkości MRL. Wartość ta stanowi najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości leczniczych produktów weterynaryjnych (wyrażony w mg/kg lub µg/g świeżej masy), który może być zaakceptowany przez EU jako legalnie dozwolony lub jako dopuszczalny w żywności.

Wśród pojęć i terminologii, dotyczącej oznaczania pozostałości w tkankach często spotykane są następujące:

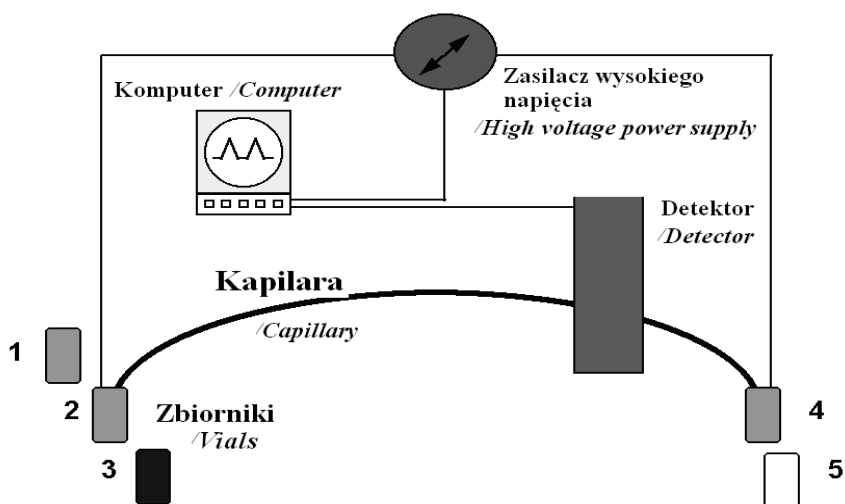
- **Okres karencji** (*Withdrawal period*) określa czas, jak musi upłynąć od podania leku do eliminacji jego pozostałości z organizmu, do poziomu bezpiecznego dla konsumentów (nieprzekraczającego wartości MRL).
- **MRPL** – najmniejsze stężenie pozostałości substancji niedozwolonej w próbie, które powinno być wykryte, zidentyfikowane i potwierdzone daną metodą analityczną (dotyczy substancji niedozwolonych do stosowania w lecznictwie weterynaryjnym).
- **Dopuszczalne dzienne pobranie leku** (*Acceptable Daily Intake – ADI*) – to ilość substancji leczniczej, która może być spożywana przez człowieka (o masie ciała 60 – 70 kg), codziennie z żywnością i wodą, bez negatywnych skutków dla życia i zdrowia.

Pojęcia te umożliwiają ocenę wyników analizy porównawczej, jak również pozwalają na ocenę ryzyka pozostałości leków pod względem ilościowym. Rozporządzenie Rady Europy (Council Regulation 2377/90) [18] klasyfikuje wszystkie aktywne farmakologiczne substancje stosowane w weterynarii na cztery grupy. Pierwszą grupę (Aneks I, liczący 120 pozycji) stanowią leki weterynaryjne o ustalonej wartości MRL, drugą (Aneks II, ok. 500 pozycji) – całkowicie bezpieczne substancje, dla których nie jest konieczne wyznaczanie wartości MRL. Aneks trzeci dotyczy tylko kilku substancji, dla których przyjęto tymczasowe (do 5 lat) wartości MRL, z uwagi na konieczność weryfikacji lub uzupełnienia badań nad bezpieczeństwem leku. Lista ostatniego aneksu (IV) obejmuje 11 związków, których nie dopuszczono do stosowania u zwierząt hodowlanych.

Pomimo ustalonych dyrektyw i rozporządzeń, niektóre ze środków niedopuszczonych do leczenia zwierząt hodowlanych mogą być wykorzystywane nielegalnie. Stąd celowym wydaje się rozszerzenie badań monitoringowych o substancje, które nie są zarejestrowane, jako WPL. Monitorowanie leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierząt rzeźnych należy do obowiązków służb sanitarno-weterynaryjnych i agencji zdrowia publicznego. Metody analityczne temu służące powinny być proste, szybkie, dokładne i ekonomiczne zarówno pod względem czasu i kosztów. Warunkiem koniecznym jest opracowanie procedur i zastosowanie technik analitycznych, gwarantujących oznaczanie tych leków na poziomach, które nie tylko umożliwiają badanie ich biodostępności, ale również pozwalają na wykrywanie ich pozostałości na poziomach znacznie niższych niż ustalone przez EU wartości MRL.

1.4. Nowe techniki separacyjne

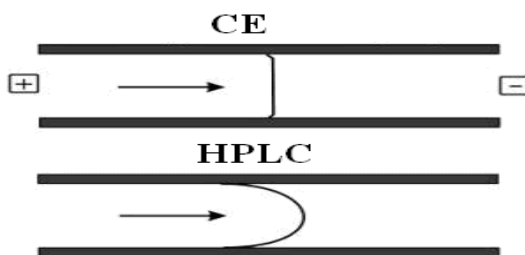
Ostatnie dwudziestolecie charakteryzuje się dynamicznym rozwojem nowoczesnych, w pełni zautomatyzowanych, instrumentalnych metod separacyjnych, efektywnych zarówno pod względem czasu, jak i kosztów ich wykonania. Niemal, co roku pojawiają się nowsze i doskonalsze urządzenia spełniające szereg zróżnicowanych potrzeb analitycznych. Rozwój technik detekcji ma na celu sprostanie rosnącym wymaganiom stawianym analizie farmaceutycznej. Zwiększający się asortyment leków, jak również poszerzające się wymagania dotyczące oceny produktów żywnościowych warunkują poszukiwanie precyzyjnych i dokładnych metod badawczych. Każde laboratorium analityczne winno dysponować takimi technikami separacyjnymi, które umożliwiłyby otrzymywanie wiarygodnych analiz, w stosunkowo krótkim czasie, przy niewielkich nakładach finansowych. Jednocześnie koniecznym staje się opracowanie nowych, bardziej efektywnych i czułych sposobów oznaczania leków w materiale biologicznym. Wśród licznych metod znajdujących zastosowanie w analizie leków, oprócz technik chromatograficznych, coraz częściej wybieraną metodą do oznaczania substancji leczniczych w próbach biologicznych jest elektroforeza kapilarna (CE). W ciągu ostatnich lat technika ta stała się popularna zwłaszcza w tych obszarach badań, w których stosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) sprawia szereg trudności natury aparaturowej bądź analitycznej.



Ryc. 1. Elektroforeza kapilarna – schemat aparatury. Zbiorniki: 1 – próbka, 2, 4 – bufor separacyjny, 3 – płyn regeneracyjny / woda / metanol, 5 – do zbierania rozdzielonych składników.

Fig. 1. Diagram of the capillary electrophoresis system. Vials: 1 – sample vial, 2, 4 – separation buffer solution, 3 – regeneration solution / water / methanol, 5 – vial to collect separation components.

CE stanowi grupę technik analitycznych, wykorzystującą zjawisko elektroforezy do rozdzielania cząstek zarówno obojętnych, jak i tych obdarzonych ładunkiem. Separacja analitów zachodzi wewnątrz wąskiej kapilary (o średnicy wewnętrznej 50 – 100 μm i długości 30 do 100 cm), zbudowanej najczęściej z krzemionki i wypełnionej jedynie buforem elektrolitycznym. Niepodważalnym atutem tej techniki jest jej wysoka rozdzielczość, niespotykana w technikach chromatograficznych. Wynika ona z wysokiego stopnia sprawności układu elektroforetycznego, pozwalającego uzyskać nawet do 500 000 póltek teoretycznych. Wąskie pasma sygnałów pojawiające się w zapisie elektroforetycznym umożliwiają całkowitą separację znacznie większej ilości związków niż przy rozdzielaniu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Występujący w większości technik elektromigracyjnych przepływ elektroosmotyczny jest przyczyną powstania (w poprzek wnętrza kapilary) płaskiego profilu przepływu w odróżnieniu od HPLC, gdzie występuje przepływ laminarny. W trakcie separacji, EOF warunkuje utrzymanie stałej prędkości prawie w całym przekroju kapilary i otrzymanie ostrych pików w zapisie elektroforetycznym. Wyjątkową użyteczność technika CE wykazuje zwłaszcza wtedy, kiedy analitami są substancje, charakteryzujące się nieznacznymi różnicami w ruchliwości elektroforetycznej. Niewielkie objętości prób wymaganych do analizy (rzędu mikrolitrów), możliwość zastosowania różnego rodzaju detektorów, które pozwalają na oznaczanie związków w zakresie poziomie nano- i pikomoli oraz niezwykła sprawność układu sprawiają, że CE jest obecnie jedną z ważniejszych technik analitycznych. Pomimo tych zalet, CE nie jest jeszcze zaliczana, ani do metod przesiewowych, ani do potwierdzających obecność zanieczyszczeń w żywności pochodzenia zwierzęcego, jak również nie znajduje się wśród metod spełniających kryteria Dyrektywy Rady nr 96/23/WE [19]. Z uwagi na wyjątkowe możliwości separacyjne, podjęto badania mające na celu opracowanie metody ilościowego oznaczenia pozostałości chemioterapeutyków właśnie tą techniką. Prezentowana praca jest jedną z pierwszych, opisujących tak szeroki zakres aplikacyjny techniki elektroforetycznej w temacie oznaczania leków w materiale biologicznym.



Ryc. 2. Porównanie przepływu elektroosmotycznego (CE) i laminarnego (HPLC).

Fig. 2. Flow profiles of electroosmotic(CE) and laminar flow (HPLC).

Dzięki optymalizacji warunków separacji elektroforetycznej (składu, stężenia i pH buforu, długości i średnicy kapilary, napięcia, temperatury analizy oraz wielkości nastrzykiwanych prób), jak również doborowi odpowiedniej techniki elektromigracyjnej, możliwe było uzyskanie jednoczesnego oznaczania szeregu leków przeciwbakteryjnych, charakteryzujących się niewielkimi różnicami w strukturze chemicznej. Do oznaczeń wybranych grup chemioterapeutyków wykorzystano dwie, najczęściej stosowane w analizie farmaceutycznej, techniki elektromigracyjne: kapilarną elektroforezę strefową (CZE) oraz kapilarną elektroforezę micelną, nazywaną także micelną chromatografią kapilarną (MEKC). Konieczność użycia obu technik spowodowana była tym, iż procesowi elektroforezy w CZE ulegają jedynie jony oraz substancje posiadające ładunek elektryczny, podczas gdy cząsteczki obojętne nie są rozdzielane. Jednakże, dla substancji nieposiadających ładunku elektrycznego można z powodzeniem zastosować technikę MEKC, w której wykorzystuje się związki powierzchniowo-czynne (*surfactants*), posiadające zdolność tworzenia miceli. Substancje o ładunku zerowym, cechujące się większym powinowactwem do hydrofobowego wnętrza miceli niż do roztworu elektrolitu, ulegają podziałowi między fazę wodną buforu a pseudostacjonarną fazę micelną. Odmienne wartości stopni podziału analitów pomiędzy te dwie fazy powodują zróżnicowanie ich prędkości elektroforetycznych, umożliwiając jednocześnie ich separację.

1.5. Techniki analityczne stosowane w analizie leków w materiale biologicznym

Przez wiele lat jedynymi testami stosowanymi w celu oceny ryzyka pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności były testy mikrobiologiczne. Pozwalały one w prosty i tani sposób na wykrycie substancji hamujących wzrost bakterii, lecz bez specyficznej ich identyfikacji. W przypadku występowania naturalnych inhibitorów, testy te mogły prowadzić do błędnej interpretacji wyników. Większą specyficznością i czułością cechują się techniki immunochemiczne i immunologiczne typu ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [43], oparte na reakcji antygen – przeciwciało oraz radio-enzymatyczne, które w rezultacie mogą dostarczać fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne wyniki analiz [52]. Szersze możliwości analityczne w badaniu leków w materiale biologicznym umożliwiły techniki chromatograficzne, oparte na separacji składników próby pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) z powodzeniem jest używana do izolacji leków czy oczyszczania ekstraktów prób biologicznych. Znalazła ona również praktyczne zastosowanie m.in. do wykrywania pozostałości sulfonamidów [2, 77], jednak obecnie wykorzystywana jest głównie do oczyszczania ekstraktów, bowiem w połączeniu z detekcją spektrofotometryczną nie pozwala na oznaczanie analitów na poziomach niż-

szych od wartości MRL. Potrzeba identyfikacji pozostałości substancji leczniczych i precyzyjnego oznaczenia ich poziomu sprawiła, że coraz większe zastosowanie w tego typu badaniach znajdują techniki instrumentalne. Techniki chromatograficzne i elektroforetyczne pozwalają obecnie na ilościowe oznaczenie niejednokrotnie wielu substancji występujących w materiale biologicznym.

Techniki chromatograficzne i elektroforetyczne w aspekcie oznaczeń chemioterapeutyków

Zastosowanie chromatografii gazowej (GC) do oznaczeń leków przeciwbakteryjnych ogranicza się do lotnych związków (trwałych w podwyższonej temperaturze) lub posiadających zdolność tworzenia lotnych pochodnych. Jednak większość chemioterapeutyków cechuje zarówno brak stabilności termicznej, jak również brak zdolności tworzenia lotnych pochodnych. Dlatego zastosowanie GC do badań leków przeciwbakteryjnych jest ograniczone jedynie do związków, których nie można oznaczyć innymi technikami z zadowalającą dokładnością i precyzją. Wśród technik instrumentalnych, HPLC znalazła najszersze uznanie w monitorowaniu związków nielotnych, wrażliwych na podwyższoną temperaturę i wykazujących charakter polarny lub średnio-polarny [36, 74]. Wprawdzie technika HPLC jest dominująca w większości laboratoriów analitycznych i powszechnie jest wykorzystywana do oznaczeń pozostałości leków w produktach żywnościowych (zarówno do badań przesiewowych, jak i potwierdzających), to całkowite rozdzielenie kilku- lub kilkunastu składników nie jest zazwyczaj osiągalne, ze względu na ograniczone zdolności separacyjne tradycyjnych wypełnień kolumn chromatograficznych. Wprawdzie, przy zastosowaniu odpowiednio modyfikowanych wypełnień i faz ruchomych można uzyskać bardzo dobrą rozdzielczość, jednak koszt takich analiz nie spełnia wymagań dla rutynowych badań kontrolnych, powszechnie stosowanych w laboratoriach. Ponadto, próbki tkankowe przed analizą chromatograficzną wymagają z reguły wieloetapowych procesów oczyszczania, a czasochłonne kilkukrotne ekstrakcje [6, 27, 33] powodują, że wynikiem stosowanych procedur jest otrzymanie stosunkowo niskich odzysków, z wielkościami odchyień, które nie mieszczą się w granicach błędu. Jednak pracochłonny tok postępowania analitycznego z próbkami biologicznymi nie jest przypisywany jedynie metodom opartym na HPLC. Spotykane w literaturze elektroforetyczne metody oznaczania chemioterapeutyków również wymagają niejednokrotnie kilkuetapowej procedury oczyszczania prób [8, 23, 34].

Jednym z ograniczeń stosowania techniki HPLC przy użyciu detektora UV jest fakt stosowania stosunkowo dużych ilości rozpuszczalników organicznych, wchodzących w skład chromatograficznych faz ruchomych. Większość tych rozpuszczalników wykazuje zdolności absorbowania światła nadfioletowego przy krótkich długościach fal, co w przypadku oznaczania związków, posiadają-

cych chromofory absorbujące promieniowanie UV w zakresie krótkofalowym, jest wyzwaniem trudnym do osiągnięcia. Stąd chromatograficzne oznaczanie niektórych substancji leczniczych w zakresie 190 – 210 nm staje się skomplikowane lub niekiedy wręcz niemożliwe. Rezygnacja lub znaczne ograniczenie użycia rozpuszczalników organicznych do analiz elektroforetycznych oprócz aspektu natury ekonomicznej, posiada także walor ekologiczny. Stosunkowo duże ilości rozpuszczalników, wchodzących w skład chromatograficznych faz ruchomych (dziennie ok. 1000 ml) mogą być ograniczone lub całkowicie wyeliminowane w przypadku zastosowania techniki CE (5 – 10 ml dziennego zużycia buforu). Kolejnym argumentem, przemawiającym za elektroforetycznym oznaczaniem związków absorbujących światło UV w zakresie krótkofalowym, jest możliwość stosowania jedynie wodnych roztworów buforów elektrolytycznych. Wodne bufora separacyjne wykazują nieznaczną absorpcję w zakresie 190 – 210 nm, co ułatwia oznaczanie wielu związków leczniczych przy użyciu prostego detektora UV.

1.6. Analiza pozostałości leków (testy przesiewowe i potwierdzające)

Typowa analiza pozostałości obejmuje badania przesiewowe (*screening test*) i potwierdzające (*confirmatory test*). W ramach analizy przesiewowej wykorzystywane są zwykle proste i szybkie metody, pozwalające na oznaczenie dużej liczby prób w stosunkowo krótkim czasie. Aby zapobiec pojawianiu się fałszywie-ujemnych wyników analiz, jako pozytywne wykrycie pozostałości w próbce, przyjmowana jest ilość substancji farmakologicznie czynnej na poziomie wartości MRL lub 50% jej wartości [25, 40, 41]. Badania potwierdzające dotyczą metod, umożliwiających potwierdzenie lub wykluczenie wcześniej uzyskanych pozytywnych wyników. Do tej grupy należą również metody zdolne do oznaczeń ilościowych. Zgodnie z Decyzją Komisji z dnia 14/08/2002, wprowadzającą Dyrektywę Rady 96/23/WE [19] i rekomendującą sposoby wykonywania metod analitycznych oraz interpretację uzyskanych wyników, technika CE nie należy do metod spełniających warunki badań potwierdzających. Najbardziej popularne detektory UV, zgodnie z zaleceniami Komisji, mogą być przeznaczone jedynie do badań przesiewowych. Natomiast do analiz potwierdzających obecność zanieczyszczeń lub pozostałości leków zalecane są detektory, dostarczające informacji na temat struktury chemicznej analitów. Wymogi te spełniają detektory oparte na spektrometrii mas (MS), z uwagi na fakt, iż są najbardziej wiarygodnym i czułym sposobem identyfikacji pozostałości w próbach biologicznych. Ponadto, pozwalają one zarówno na wykrywanie, jak i wykonanie oznaczeń ilościowych znacznie poniżej limitów wartości MRL. Jednakże, do oznaczeń rutynowych, mających na celu monitorowanie pozostałości leków,

detektory te nie znalazły szerokiego zastosowania ze względu na konieczność używania do analiz ekstraktów o wysokiej czystości. Co więcej, przy doborze warunków separacji elektroforetycznej może pojawiać się szereg ograniczeń w praktycznym stosowaniu detektorów MS. Dotyczą one wielkości przepływu (minimalny 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) i stężenia buforu elektrolitycznego, które powinno przekraczać wartość 10 mM [88].

Z uwagi na fakt, iż technika CE należy do akceptowanych metod farmakopealnych, istnieje duże prawdopodobieństwo, że szeroki zakres aplikacyjny prezentowanej pracy oraz możliwości jej praktycznego wykorzystania przyczynią się do włączenia technik elektromigracyjnych do metod, które spełniają wymogi analiz potwierdzających obecność pozostałości leków w materiale biologicznym.

2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Wymagania stawiane metodom analitycznym, stosowanym w badaniach farmakokinetycznych oraz w kontroli żywności pochodzenia zwierzęcego wymagają wprowadzenie takich procedur i technik analitycznych, które umożliwiłyby otrzymanie dokładnych i niezawodnych wyników. Rozporządzenia EU (zawarte w Dyrektywie 2002/657/WE), dotyczące metod oznaczania pozostałości leków ograniczają zakres metod instrumentalnych do technik chromatograficznych (GC-ECD, LC-DAD, GC-MS, LC-MS). Jednakże zasięg poszukiwań nowych metod, które mogłyby posłużyć do oznaczeń leków w materiale biologicznym ulega ciąglemu rozszerzaniu. Uwarunkowane jest to koniecznością opracowania nowych procedur badawczych przy użyciu bardziej sprawnych technik separacyjnych.

Prezentowana praca dotyczy badań, mających na celu zaprojektowanie oryginalnych metodyk przygotowania prób biologicznych do analiz oraz opracowanie parametrów elektroforetycznego oznaczania chemioterapeutyków, najczęściej stosowanych w weterynarii. Nowością tej pracy jest wykorzystanie na tak szeroką skalę techniki CE do ilościowych oznaczeń leków przeciwbakteryjnych w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego oraz zastosowanie rozwiązań, poprawiających zdolności detekcji przy użyciu tradycyjnego detektora UV. Jedną z innowacji, było praktyczne wykorzystanie kapilary o rozszerzonej drodze optycznej (ELP), która pozwoliła na pięciokrotną poprawę zdolności detekcyjnych układu. Opracowując metodykę oznaczania kierowano się koniecznością ilościowego oznaczenia leków znacznie poniżej wartości najwyższej dopuszczalnej pozostałości (MRL).

Badania dotyczące opracowania procedur analitycznych oznaczania leków w próbach biologicznych pochodzenia zwierzęcego (tj. osocze i surowica krwi, tkanki jadalne) miały na celu określenie optymalnych warunków, które umożliwiłyby oznaczanie nawet kilku leków z jednej grupy chemicznej, w ilościach na poziomie nano- i mikrogramów. Do realizacji tego celu wybrano chemioterapeutyki z dziewięciu grup najczęściej stosowanych w lecznictwie weterynaryjnym: penicylin, tetracyklin, amfenikoli, linkozamidów, sulfonamidów, chinolonów, aminoglikozydów, awermektyn i nitrofuranów.

Badania przeprowadzono w kilku etapach:

- Opracowanie efektywnego systemu izolacji poszczególnych grup leków z matrycy biologicznej i oczyszczania otrzymanych ekstraktów.
- Optymalizacja separacji elektroforetycznej (dobranie parametrów detekcji i warunków separacji analitów).

- Weryfikacja metodyki przez przeprowadzenie oznaczeń w próbach materiału pobranego od zwierząt, którym podawano wybrane leki w dawkach terapeutycznych.
- Dokonanie praktycznej oceny przydatności opracowanej procedury w badaniach farmakokinetycznych oraz w rutynowych badaniach monitorujących występowanie pozostałości leków.

3. MATERIAŁ I METODY OZNACZEŃ

3.1. Materiał badawczy

Do badań wykorzystano płyny ustrojowe (osocze krwi świń i koni, surowicę indyków), jaja kurze, tkanki jadalne drobiu (indyków i kur), świń oraz mięśnie ryb. Analizowany materiał biologiczny podzielono na trzy grupy: materiał odniesienia (wolny od jakichkolwiek leków), materiał pochodzący od zwierząt, które otrzymywały chemioterapeutyki, ostatnią grupę stanowiły tkanki jadalne zwierząt pochodzące z lokalnych marketów.

Materiał odniesienia (kontrolny), służący do sporządzenia krzywych kalibracji i oceny statystycznej metody, został pozyskany z gospodarstw rolnych (w przypadku ryb ze stawów hodowlanych), w których zwierzęta otrzymywały tradycyjną karmę, niezawierającą żadnych dodatków. Zwierzęta wybrane do hodowli eksperymentalnej miały zapewniony dostęp do wody, wolnej od jakichkolwiek stymulatorów wzrostu i substancji przeciwbakteryjnych. W przypadku ryb, zbiorniki wodne, w których przeprowadzano hodowlę były kontrolowane w zakresie temperatury i wpływu czynników zewnętrznych. Ponadto, przed przystąpieniem do eksperymentu, przeprowadzono badania opracowanymi metodami, umożliwiające uznanie materiału kontrolnego za wolny od badanych leków.

Kolejną grupę stanowił materiał biologiczny, pochodzący od zwierząt, którym podawano wybrane leki przeciwbakteryjne w dawkach leczniczych. Zwierzęta te, przed podaniem leków były ważone i oznaczone numerami, a w trakcie terapii znajdowały się pod nadzorem lekarza weterynarii. Wybrane chemioterapeutyki otrzymywały w dawkach leczniczych w wodzie pitnej, jako dodatki do paszy lub w postaci iniekcji. Szczegółową specyfikację gatunków zwierząt, dawkowych dawek aplikowanych leków oraz pobieranych tkanek zebrano w tabelach 1 i 9, (tabela 9 prezentuje także wyniki przeprowadzonych oznaczeń). W przypadku badań farmakokinetycznych, krew pobierano w ustalonych odstępach czasowych od momentu podania leku. Do badań pozostałości leków, tkanki jadalne (wątrobę, mięśnie, nerki, skórę z tłuszczem oraz w niektórych przypadkach także płuca, serca, żołądki) pozyskiwano po ubiciu, licząc od czasu ostatniego podania leku. W przypadku oznaczeń pozostałości streptomycyny pobierano także jaja od kur, leczonych tym antybiotykiem. Stężenia substancji leczniczych w próbach oznaczano przy pomocy opracowanych i zweryfikowanych metod elektroforetycznych. Badania farmakokinetyczne przeprowadzono na indykach (tiamfenikol) oraz świniami i koniami (iwermektyna), natomiast badania pozostałości substancji leczniczych (amoksycyliny, tetracykliny, streptomycyny, tiamfenikolu, florfenikolu, enrofloksacyny, norfloksacyny i nifursolu) przeprowadzono na tkankach zwierząt, którym podawano leki w trakcie chowu.

Tabela 1. Materiał badawczy oraz leki wybrane do badań metodą elektroforetyczną.
Table 1. The animals, tissues and analyzed drugs selected for electrophoretic tests.

Gatunek zwierząt <i>Animal species</i>	Wybrane chemioterapeutyki <i>The selected chemioterapeutic drugs</i>	Badany materiał <i>Analyzed matrix</i>
Drób: indyki, kury <i>Poultry: turkeys, hens</i>	Penicyliny, amfenikole, linkozamidy, sulfonamidy, chinoliny, siarczan streptomycyny, chlorowodorek doksykyliny, nifursol	Tkanki jadalne (mięśnie uda, piersi, wątroba, nerki, skóra z tłuszczem)
Kury / Hens Indyki / Turkeys	Siarczan streptomycyny Tiamfenikol	Jaja kurze Surowica krwi
Świnie / Swine	Penicyliny, amfenikole, linkozamidy, sulfonamidy, chinoliny, siarczan streptomycyny, chlorowodorek doksykyliny Iwermektyna	Tkanki jadalne (mięśnie, wątroba, nerki, tłuszcz) Osocze krwi
Konie / Horses	Iwermektyna	Osocze krwi
Ryby / Fish	Tetracykliny	Mięśnie ryb

3.2. Substancje wzorcowe

W planie badań uwzględniono substancje farmakologicznie czynne z grup chemioterapeutyków, najczęściej stosowanych w hodowli zwierząt, zarówno te zarejestrowane jako WPL, jak i te nielegalnie używane podczas chowu zwierząt. Dla każdej badanej substancji leczniczej sporządzano roztwory standardowe o stężeniu 1 mg/ml w 10 mM roztworze tetraboranu sodowego. W przypadku związków nie rozpuszczalnych w wodzie, stosowano mieszaninę 1 M roztworu wodorotlenku sodowego i 10 mM tetraboran sodowego w stosunku objętościowym (v/v) 1: 9 lub mieszaniny metanolowo-wodne (v/v) 1: 1. Z roztworów podstawowych sporządzano roztwory robocze zawierające pojedyncze substancje lecznicze oraz ich mieszaniny (w obrębie jednej grupy chemicznej) o stężeniach 10,0 oraz 1,0 µg/ml.

3.3. Schemat badania substancji leczniczych w materiale biologicznym

Pojęcie metody analitycznej obejmuje wszystkie czynności związane z jej wykonaniem, od pobrania i przygotowania próby, poprzez pomiar sygnału analitycznego, stanowiącego podstawę oznaczenia, aż do opracowania wyników. Tok postępowania analitycznego obejmował opracowanie metody i optymalizację warunków oznaczania leków w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego. W ramach metodyki oznaczania wyodrębniono kilka etapów:

1. Pobieranie, przechowywanie i przetwarzanie materiału biologicznego (fizyczne i chemiczne).
2. Izolacja substancji leczniczych z matrycy pierwotnej oraz przeniesienie ich do wtórnej matrycy połączone ze wzbogacaniem analitów.
3. Oczyszczanie ekstraktów prób biologicznych.
4. Rozdzielanie oraz ilościowe oznaczanie analitów.
5. Walidacja procedur analitycznych.

3.4. Strategia opracowania procedury analitycznej do badań elektroforetycznych

Badania dotyczące opracowania procedury analitycznej oznaczania leków w wybranych płynach ustrojowych oraz tkankach jadalnych zwierząt miały na celu ustalenie optymalnych warunków, zapewniających jednoczesne ilościowe oznaczanie kilku związków z jednej grupy chemicznej, na poziomie nano- i mikrogramów. Wobec braku wszystkich dostępnych CRM, analizy dla niektórych grup leków prowadzono przy użyciu prób tkankowych wzbogaconych w znane, ściśle określone ilości oznaczanych substancji leczniczych, analizując je równoległe z próbami badanymi. W testach, w których opracowywano poszczególne etapy metody oraz dokonywano oceny statystycznej, do analiz wykorzystane zostały próbki mięśni, wątroby, nerki, skóry i tłuszczu pochodzące od zwierząt z hodowli eksperymentalnej. Próby te, obciążane były mieszaniną substancji leczniczych w obrębie danej grupy, w trzech wybranych stężeniach, odpowiadającym próbom kontrolnym (QC). Materiał analityczny (próby kontrolne, próby obciążone lekami oraz próby pochodzące od zwierząt, którym aplikowano leki) poddawano jednolitemu postępowaniu, według ustalonej procedury, umożliwiającej uzyskanie powtarzalnych wyników. Próby przygotowywano, poprzez dodanie do homogenizowanego materiału określonej objętości standardowych roztworów substancji wzorcowych. Celem umożliwienia przeniknięcia do materiału, próby po dodaniu roztworów wzorcowych przechowywano 15 minut w ciemnym miejscu, w temperaturze pokojowej.

Z uwagi na dość skomplikowany charakter matrycy bezpośrednie oznaczenie leków zarówno we krwi, jak i w tkankach jadalnych zwierząt było praktycznie niemożliwe. Dlatego pojawiła się konieczność przeprowadzenia analitów z tkanek do roztworu i usunięcia możliwie jak największej ilości wielkocząsteczkowych substancji balastowych. Poziomy leków weterynaryjnych w tkankach i płynach ustrojowych zwierząt są z reguły niskie, dlatego do ich ilościowego oznaczenia konieczne były odpowiednie procedury przygotowujące materiał do analizy. Oczyszczanie takich prób wymagało nie tylko wyizolowania analitu, lecz również skutecznego usunięcia białek, tłuszczów oraz innych potencjalnie interferujących, endogennych składników. W trakcie optymalizacji

procedury postępowania analitycznego uwzględniono fakt, iż badane próby obejmowały wyjątkowo szeroki asortyment materiału biologicznego, zróżnicowanego zarówno pod kątem jakości składników, jak również zakresów stężeń analitów. Tok postępowania miał na celu ujednoczenie procedury dla wszystkich badanych grup leków przeciwbakteryjnych. Jednakże początkowo przeprowadzone testy wykazały, iż każda z analizowanych grup chemioterapeutyków charakteryzuje się na tyle odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi, stopniem jonizacji oraz stopniem wiązania z białkami, że uzyskanie jednolitej procedury dla wszystkich analizowanych grup leków okazało się stosunkowo trudne, a niekiedy niemożliwe do osiągnięcia.

W praktyce laboratoryjnej wykorzystywanych jest szereg procedur, służących do ilościowego oznaczania zarówno pojedynczych związków, jak i całych grup leków. Literatura dotycząca badań pozostałości leków w tkankach jadalnych zwierząt, najczęściej ogranicza się do jednej z grup chemicznych: sulfonamidów [55, 63, 70, 71, 75, 83], chinolonów [5, 12, 26, 16, 42, 84, 86, 89, 90], tetracyklin [3, 10, 13, 14, 51, 56, 57, 61, 62, 64, 72, 79], penicylin [9, 22, 48, 49, 80, 85], linkozamidów [78], amfenikoli [50, 59, 67], nitrofuranów [87]. Opiswane metodyki oparte są głównie na technikach chromatograficznych, a tylko nieliczne wykorzystują w tym celu wysokosprawną elektroforezę kapilarną (HPCE) [8, 23, 28, 32, 81, 82]. W piśmiennictwie naukowym opisano także procedury, umożliwiające jednoczesne oznaczanie kilku grup leków przy użyciu HPLC, jednak metodyka przygotowania prób jest dość skomplikowana i wymaga wieloetapowej procedury oczyszczania [15, 44, 45]. Nieliczne, proponowane metody oczyszczania prób z substancji balastowych [60], opisujące jednolitą procedurę przygotowawczą dla szerokiej gamy leków stosowanych w weterynarii, wymagają często prac- i czasochłonnych operacji. Ponadto, niektóre z oznaczanych leków wymagają procedury upochadniania, co w znacznym stopniu podnosi koszt takich badań oraz znacznie wydłuża całkowity czas analizy.

4. PRZEBIEG BADAŃ

4.1. Procedura przygotowania prób do analizy elektroforetycznej

4.1.1. Pobieranie prób

Pobieranie prób biologicznych od zwierząt, którym podawano leki przeprowadzano pod nadzorem lekarza weterynarii oraz za zgodą lokalnych komisji etycznych. O ile badania farmakokinetyczne pozwalały na wielokrotne pobranie materiału, to próby tkankowe do badań pozostałości leków, pozyskiwano dopiero po uboju zwierząt. Poszczególne próby biologiczne (krew / tkanki jadalne) umieszczano w oddzielnych próbkach / pojemnikach, zamrażano i do czasu rozpoczęcia procedury ich przygotowania (maksymalnie 2 – 3 dni od pobrania) przechowywane były w temperaturze -20°C . Przed przystąpieniem do procedury izolacji analitów próby rozmrażano w temperaturze pokojowej.

Wstępne badania pozwoliły na ustalenie optymalnej wielkości prób, które poddawano analizie: w badaniach farmakokinetycznych użyto prób osocza lub surowicy krwi objętości 0,5 ml, natomiast do badań pozostałości leków w tkankach – prób o masie 3,0 g. Zwiększenie masy / objętości próby powodowało wzrost ilości izolowanych zanieczyszczeń w stosunku do analitów.

4.1.2. Izolacja analitów z prób biologicznych

Pierwszym zasadniczym elementem przygotowania materiału przed docelową analizą elektroforetyczną (w przypadku prób tkankowych) była homogenizacja i eliminacja wielkocząsteczkowych substancji balastowych za pomocą, odpowiednio dobranych (dla każdej grupy związków) czynników deproteinizujących. Proces izolacji miał na celu ilościowe ich przeniesienie z matrycy oryginalnej do wtórnej, czyli przekształcenie prób tkankowych do postaci roztworu. Zastosowanie odpowiedniego czynnika odbiałczającego, wytrąsarki punktowej i łaźni ultradźwiękowej okazało się bardzo przydatne w toku postępowania analitycznego. Podczas tego procesu usunięta została większość endogennych substancji pochodzących z matrycy biologicznej. Przeprowadzenie analitów do wodnego elektrolitu przed podaniem do układu separacyjnego umożliwiło jednocześnie usunięcie nierozpuszczalnych w wodzie substancji balastowych, których wcześniejsza eliminacja z próby okazała się nieskuteczna. Ewentualne związki balastowe, po rozpuszczeniu pozostałości w roztworze boraksu, w toku postępowania analitycznego, poddane dalszemu wirowaniu, ulegały oddzieleniu od wodnego roztworu analitu.

Optymalizacja warunków izolacji analitów

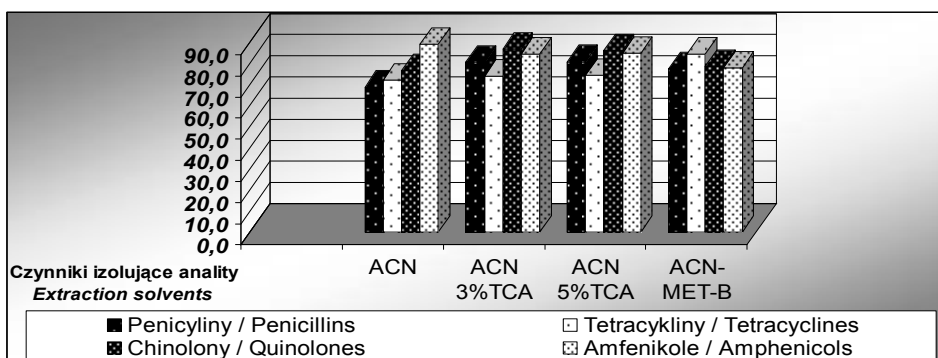
W ramach opracowywania procedury analitycznej przebadano różne układy ekstrakcyjne, określając wpływ poszczególnych czynników na wydajność i skuteczność izolacji poszczególnych grup chemioterapeutyków. Stopień efektywności izolacji analitów z matrycy oraz oczyszczenia ekstraktów oceniono porównując wielkości sygnałów pochodzących z prób badanych (kontrolnych) oraz prób obciążonych substancjami wzorcowymi. Wielkości odzysków analitów wyznaczono jako procentowy stopień zgodności między wartością rzeczywistą (nominalną), a wynikiem analizy, z zastosowaniem określonych rozpuszczalników. Dla każdej z grup chemioterapeutyków wykonano po 6 równoległych oznaczeń i po wyliczeniu wartości średnich obliczano wielkości odzysków. O wyborze odpowiedniego rozpuszczalnika decydowała jego efektywność w procesie odbiałczania oraz skuteczność izolacji substancji leczniczych z materiału biologicznego. Na ryc. 3 i 4 przedstawiono wyniki badań wpływu rodzaju czynnika ekstrakcyjnego na wydajność procesu izolacji różnych grup chemioterapeutyków z matrycy biologicznej.

Wpływ acetonitrylu i TCA

W badaniach nad optymalizacją procedury przygotowania prób do analizy porównywano skuteczność najczęściej stosowanych do ekstrakcji rozpuszczalników organicznych takich jak: acetonitryl, metanol, octan etylu, dichlorometan, acetonitrylowy roztwór kwasu trichlorooctowego, aceton, chloroform lub ich mieszaniny. Najbardziej efektywnym okazało się postępowanie analityczne wykorzystujące acetonitryl lub 3% acetonitrylowy roztwór TCA. Analizy potwierdziły, iż dzięki zastosowaniu czynników odbiałczających, opartych na acetonitrylu uzyskano wyższe wartości odzysków analitów oraz otrzymano bardziej przejrzyste zapisy elektroforetyczne. Na elektroforegramach zarejestrowano mniej sygnałów pochodzących od wielkocząsteczkowych substancji balastowych. Wielkości odzysków przy użyciu wybranych acetonitrylowych mieszanin ekstrakcyjnych wynosiły ponad 80%, a wartości ich względnego odchylenia standardowego wahały się w granicach 2 – 6%. Jednym z najskuteczniejszych czynników deproteinizujących okazał się 3% acetonitrylowy roztwór TCA. Zwiększanie zawartości TCA w acetonitrylu nie poprawiało jednak efektywności procesu izolacji analitów, lecz przeciwnie powodowało pojawienie się dodatkowych pików w obrazie elektroforetycznym.

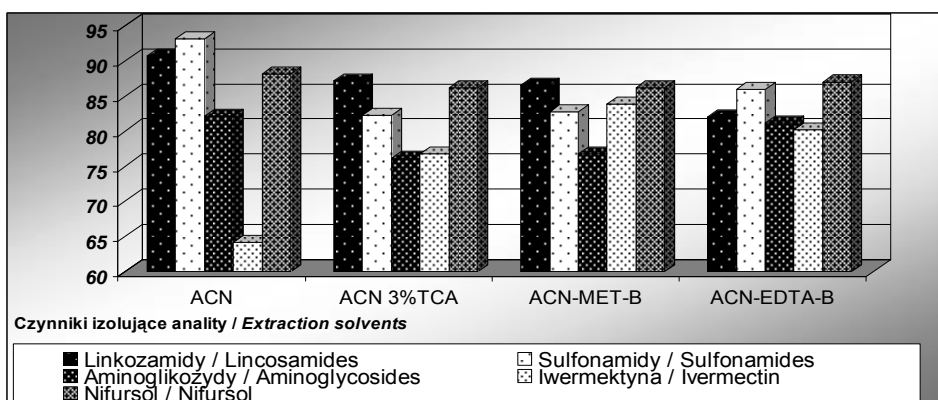
Wpływ metanolu

Przy oznaczaniu substancji leczniczych trudno rozpuszczalnych w roztworach wodnych, metanol pełnił rolę dodatkowego solubilizatora oraz czynnika współstrącającego białka. Mieszanki acetonitrylu z metanolem okazały się szczególnie użyteczne w procesie odbiałczania prób biologicznych, zawierających anality o charakterze niepolarnym lub średnio-polarnym.



Ryc. 3. Wpływ czynnika izolującego na odzyski leków (%) z tkanek zwierzęcych (cz. I). ACN 3% TCA – 3% kwas trichlorooctowy w acetonitrylu, MET – metanol, B – bufor McIlvaine'a (pH = 4,0) EDTA – 0,1 M roztwór EDTA- Na_2

Fig. 3. Effect of different type of reagents on extraction recovery (%) of drugs from animal tissues (part I). ACN 3% TCA – 3% Trichloroacetic acid in acetonitrile, MET – methanol, B – McIlvaine buffer solution (pH = 4.0) EDTA – 0.1 M EDTA- Na_2



Ryc. 4. Wpływ czynnika izolującego na odzyski leków (%) z tkanek zwierzęcych (cz. II); objaśnienia jak przy ryc. 3.

Fig. 4. Effect of different type of reagents on extraction recovery of drugs from animal tissues (part II); explanations as in fig. 3.

Wpływ n-heksanu

Użycie n-heksanu w toku procedury oczyszczania, miało na celu usunięcie tłuszczu z prób tkankowych. Badania te skierowane były głównie na oznaczanie prób komercyjnych, gdyż właśnie tkanki jadalne pochodzące z marketów, w porównaniu z próbami tkanek pochodzących z hodowli eksperymentalnej, zawierały większe ilości substancji o charakterze tłuszczów. Jednakże, pomimo niezaprzeczalnej skuteczności n-heksanu w eliminacji tłuszczu z prób biologicznych, jego wprowadzenie do procedury nie wpłynęło na zmniejszenie ilości substancji balastowych. Ponadto, rezygnacja z dodatkowego rozpuszczalnika organicznego miała aspekt zarówno ekonomiczny jak i ekologiczny.

Wpływ wartości pH, obecności buforu McIlvaine'a oraz EDTA-Na₂

Dobór rozpuszczalników do etapu przygotowania prób uwzględniał zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne oznaczanych grup substancji leczniczych. Zależnie od wartości pH roztworów, niektóre grupy związków występować mogą jako kationy, aniony lub jony obojętne (amfoteryczne), inne natomiast mogą tworzyć tylko formę anionową lub obojętną (jak w przypadku chinolonów). Obecność grup karboksylowych, aminowych, ketonowych lub szeregu innych podstawników wpływa na ich właściwości kwasowo-zasadowe. Zróżnicowana rozpuszczalność, stopień jonizacji i odmienne wartości pKa (np. dla sulfonamidów zakres pKa wynosi od 2 do 11 [38]) sprawiają analitikom szereg trudności zarówno w trakcie procesu izolacji analitów z matrycy biologicznej, jak i podczas analizy elektroforetycznej. Celem uzyskania wyższych wartości odzysków, dla niektórych grup leków, niezbędnym było przeprowadzenie homogenizacji i odbiałczania prób w środowisku kwaśnym. Stwierdzono, że dodanie buforu McIlvaine'a (roztwór 0,1 M kwas cytrynowego i 0,2 M fosforanu disodowego 61,45: 38,55 (v/v), pH = 4,0) znacznie poprawia skuteczność procesu izolacji dla tetracyklin oraz penicylin. W trakcie procedury przygotowania prób zawierających penicyliny, sulfonamidy oraz tetracykliny celem było także dodanie 0,1 M roztworu EDTA-Na₂, który dzięki swoim właściwościom kompleksującym umożliwił wydajniejszą izolację analitów z matrycy, wiążąc jony metali wielowartościowych. Jednakże w przypadku oznaczeń innych grup chemioterapeutyków dodanie czynnika chelatującego oraz obecność środowiska kwaśnego nie miała istotnego wpływu na podniesienie efektywności procesu izolacji analitów z materiału biologicznego.

Łaźnia ultradźwiękowa

W procesie ekstrakcji substancji leczniczych z tkanek zastosowanie łaźni ultradźwiękowej umożliwiło efektywną izolację wszystkich grup analitów z matrycy biologicznej. Wprawdzie efektem jej zastosowania było rejestrowanie większej ilości zanieczyszczeń, jednak wysoka zdolność rozdzielcza użytej techniki elektroforetycznej sprawiła, iż piki dodatkowo pojawiających związków nie interferowały z pikami analitów i tym samym nie przeszkadzały w prawidłowej interpretacji i ocenie wyników analiz. Stwierdzono również, że podwyższenie temperatury łaźni do 45°C zwiększyło zdolność rozpuszczania analitów i poprawiło efektywność ekstrakcji. Podwyższenie temperatury powyżej 50°C powodowało stopniową utratę analitów, będącą wynikiem rozkładu (dotyczyło związków termolabilnych). Zastosowanie łaźni ultradźwiękowej okazało się pomocne przy rozpuszczaniu analitów zarówno po odparowaniu warstwy acetonitrylowej, jak również przy końcowym etapie rozpuszczaniu pozostałości, przed podaniem próby do układu separacyjnego.

Odparowanie warstwy acetonitrylowej

Wstępnie przeprowadzone analizy i dane literaturowe [60] potwierdziły, że obecność acetonitrylu niekorzystnie wpływa na zdolność adsorbowania leków przez kolumnki oktadecylowe wybrane do kolejnego etapu oczyszczania ekstraktów. Odparowanie warstwy acetonitrylowej po odwirowaniu i zlanie osadu okazało się niezbędne w dalszym postępowaniu analitycznym z kilku powodów. Po pierwsze, roztwory aplikacyjne analitów w acetonitrylu, nanoszone na kolumny ekstrakcyjne (SPE), nie powodowały zatrzymania średniopolarnych i amfoterycznych analitów na kolumnkach oktadecylowych (C-18). Podejmowane próby rozcieńczania wodą tych ekstraktów nie zwiększały wydajności procesu. Po drugie, obawy niektórych autorów przed znaczną utratą analitów podczas odparowania na łaźni wodnej okazały się nieuzasadnione, gdyż wyciągi acetonitrylowe stosunkowo łatwo ulegały odparowaniu, a zaobserwowane straty analitów podczas tego procesu wynosiły od 2 do 6%.

Analiza osocza i surowicy krwi

Płyny ustrojowe (tj. surowica i osocze krwi) po odpowiednim przygotowaniu nie wymagały etapu homogenizacji, lecz jedynie wyodrębnienia analitu, usunięcia białek i ewentualnego wzbogacenia. Do badań farmakokinetycznych wybrano dwa leki stosowane w weterynarii: tiamfenikol oraz iwermektynę. Najskuteczniejszym czynnikiem usuwającym większość substancji balastowych w procedurze oznaczania prób zawierających tiamfenikol okazał się acetonitryl,

natomiast w przypadku iwermektyny najbardziej efektywną okazała się mieszanina acetonitryl – metanol, w stosunku (v/v) 1: 1. Oddzielenie części stałych pochodzących z matrycy od roztworu następowało podczas wirowania. Po zlaniu roztworu z nad osadu, usunięcie warstwy organicznej przeprowadzano podobnie jak w przy analizie prób tkankowych przez odparowanie na łaźni wodnej. Z uwagi na możliwość rozkładu obecnych w próbach leków temperatura łaźni wodnej nie przekraczała 45°C.

Wstępnie planowany tok procedury analitycznej miał na celu otrzymanie ekstraktów, w miarę możliwości, pozbawionych substancji balastowych. Jednak całkowite ich usunięcie w trakcie procedury przygotowania prób powodowało rozbudowanie metodyki o dodatkowe (niekiedy niepotrzebne) etapy ekstrakcji. Wartości odzysków otrzymane po kilkietapowych ekstrakcjach były najczęściej niezadowolające. Przeprowadzona analiza specyficzności zapisów elektroforetycznych dla tetracyklin, streptomycyny, iwermektyny, nifursolu i tiamfenikolu zdecydowała o zakończeniu procedury oczyszczania na etapie ich izolacji z materiału biologicznego. W przypadku oznaczania w/w grup leków skuteczność mieszanin ekstrakcyjnych, wykorzystanych w procesie izolacji analitów i odbiałczaniu prób sprawiła, że dodatkowe etapy oczyszczania stały się zbędne. Natomiast oznaczanie pozostałych grup wymagało podjęcia dalszych czynności analitycznych, mających na celu oczyszczanie ekstraktów w stopniu umożliwiającym selektywne oznaczenie jednocześnie kilku substancji.

4.1.3. Optymalizacja procedury oczyszczania ekstraktów

Podobnie jak przy izolacji analitów, dobranie odpowiedniego sposobu oczyszczania ekstraktu przeprowadzano w oparciu o kryteria, uwzględniające zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne oznaczanych związków leczniczych oraz szeroki asortyment badanych materiałów. Wysokosprawne techniki separacyjne wymagają z reguły całkowitego usunięcia substancji balastowych przed analizą. Stąd procedury opisujące przygotowania prób do analiz chromatograficznych zawierają często ultrafiltracje, dializy, kilkukrotne ekstrakcje LLE bądź połączenia LLE i SPE.

Ekstrakcja typu LLE

Optymalizację warunków dalszego oczyszczania ekstraktów rozpoczęto od porównania efektywności dwóch sposobów oczyszczania: LLE oraz SPE. W zależności od grupy chemicznej oraz rodzaju badanych materiałów, przeprowadzono testy, wykorzystujące kilka najczęściej stosowanych w tym celu rozpuszczalników, takich jak: chloroform, dichlorometan, octan etylu. Ekstrakcje przeprowadzano przy zróżnicowanych wartościach pH. Pomimo, że ekstrakcja

w do fazy ciekłej wydawała się jedną z prostszych metod oczyszczania prób, to jej główną wadą było znaczne zużycie rozpuszczalników organicznych, (co w przypadku oznaczeń seryjnych okazuje się dość istotne). Celem minimalizacji strat analitów, które mogłyby powstać w trakcie odparowania rozpuszczalnika oraz zmniejszenia ilości potencjalnych zanieczyszczeń, ekstrakcję prowadzono w środowisku zasadowym, przeprowadzając anality w związki łatwo rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Następnie, po odparowaniu warstwy organicznej, pozostałość rozpuszczano w wodnym 2 mM roztworze tetraboranu sodowego, wirowano i poddawano analizie elektroforetycznej. Otrzymane wielkości odzysków oznaczanych substancji leczniczych były dość zróżnicowane i nie we wszystkich przypadkach spełniały wymogi stawiane oznaczeniom ilościowym.

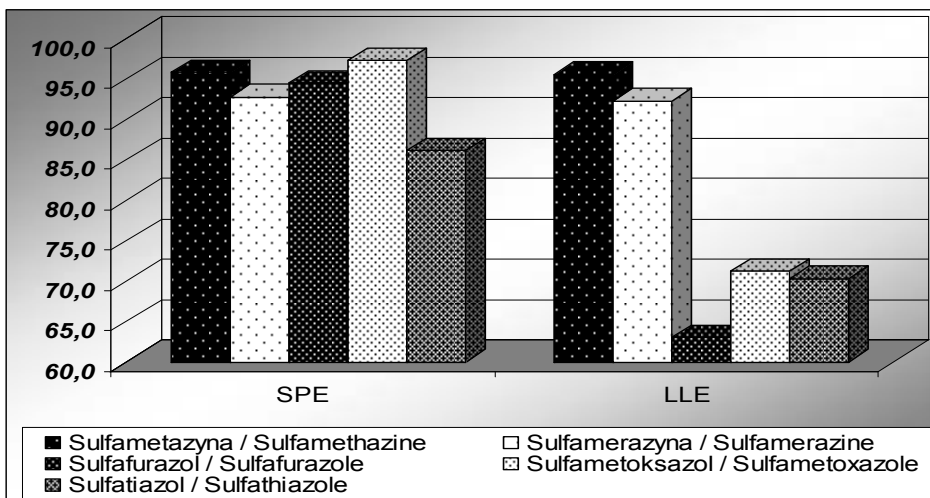
Ekstrakcja typu SPE

Równoległe przeprowadzono analizy z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej, opartej na zastosowaniu krzemionkowych lub polimerycznych materiałów, powierzchniowo-zmodyfikowanych, stanowiących wypełnienia kolumniek polipropylenowych. Wzrost czułości i selektywności metody uzyskano dzięki adsorbowaniu analitów na stałym wypełnieniu, a następnie ich wymywaniu (elucji) niewielką ilością odpowiedniego rozpuszczalnika. Jednym z etapów optymalizacji metody było porównanie wypełnień kolumniek ekstrakcyjnych, na których anality były zatrzymywane. W badaniach wykorzystano kolumniki z wypełnieniami: niepolarnymi (oktadecylowymi – krzemionka modyfikowana grupami alkilowymi, C-18), polarnymi (cyjanowymi) oraz polimerycznymi (styrenowo-diwinylbenzylowymi, SDB1). Przeprowadzane analizy miały na celu dobór takich wypełnień, których oddziaływanie z analitami będzie większe niż pomiędzy matrycą i oznaczanymi substancjami leczniczymi. Procedurę selektywnego oczyszczania techniką SPE rozpoczęto od kondycjonowania sorbentów metanolem oraz przemywania wodą. Po naniesieniu wodnych roztworów ekstraktów, przesączano je przez wypełnienia. Następnie kolumniki przemywano właściwymi dla danego złoża roztworami, wymywając składniki, które nie stanowiły przedmiotu badań. Przed przystąpieniem do elucji kolumniki osuszano, a osadzone na złożu anality wymywano odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem (najczęściej wybieranym był metanol). Tak zebrane ekstrakty odparowano do sucha (w temp. 45°C), a następnie rozpuszczono w roztworze 2 mM tetraboranu sodu. W trakcie całej procedury nie dopuszczano do wysuszenia wypełnień kolumniek, jedynie przy zmianie roztworów o różnej polarności oraz przed elucją analitów złoża były suszone. W trakcie ustalania warunków pracy układu SPE, kolumniki podłączone były poprzez komorę ciśnieniową do membranowej pompy próżniowej. Umożliwiło to regulację wysokości podciśnienia i usta-

lenie powtarzalnych przepływów kolejnych roztworów przez wypełnienia kolumniek.

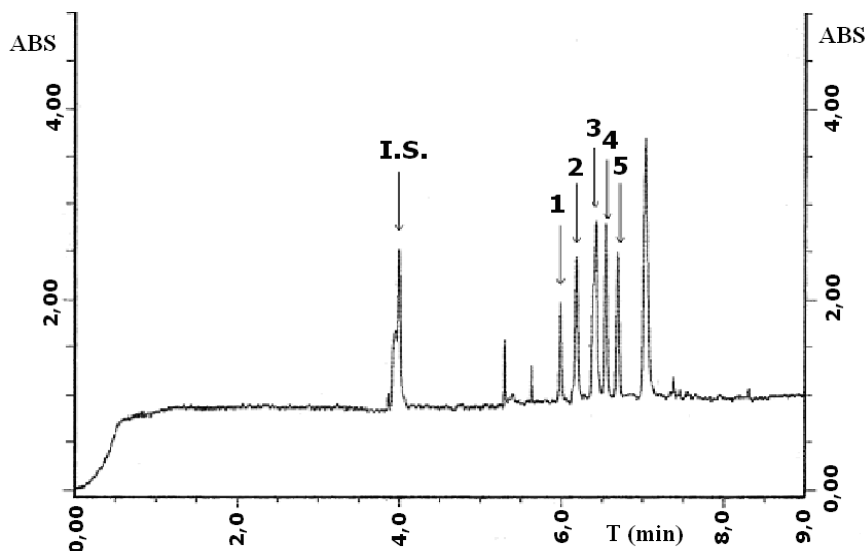
Analizy wykazały, że przy zastosowaniu kolumniek oktadecylowych do analiz wybranych grup leków odzyski wahały się w granicach 82 – 96% dla kolumniek oktadecylowych, 58 – 86% dla cyjanowych, 67 – 96% dla SDB1. Do dalszej optymalizacji procedury oczyszczania prób wybrano kolumniki oktadecylowe ze względu na najmniejsze odchylenia standardowe (5 – 6%) otrzymanych wielkości.

Celem zobrazowania wyników przeprowadzonych analiz na ryc. 5 przedstawiono wartości odzysków dla wybranych sulfonamidów uzyskane za pomocą dwóch typów ekstrakcji. Zapis elektroforetyczny ekstraktu prób tkanki mięśniowej, zawierającej sulfonamidy zaprezentowano na ryc. 6.



Ryc. 5. Porównanie odzysków wybranych sulfonamidów po zastosowaniu dwóch typów ekstrakcji.

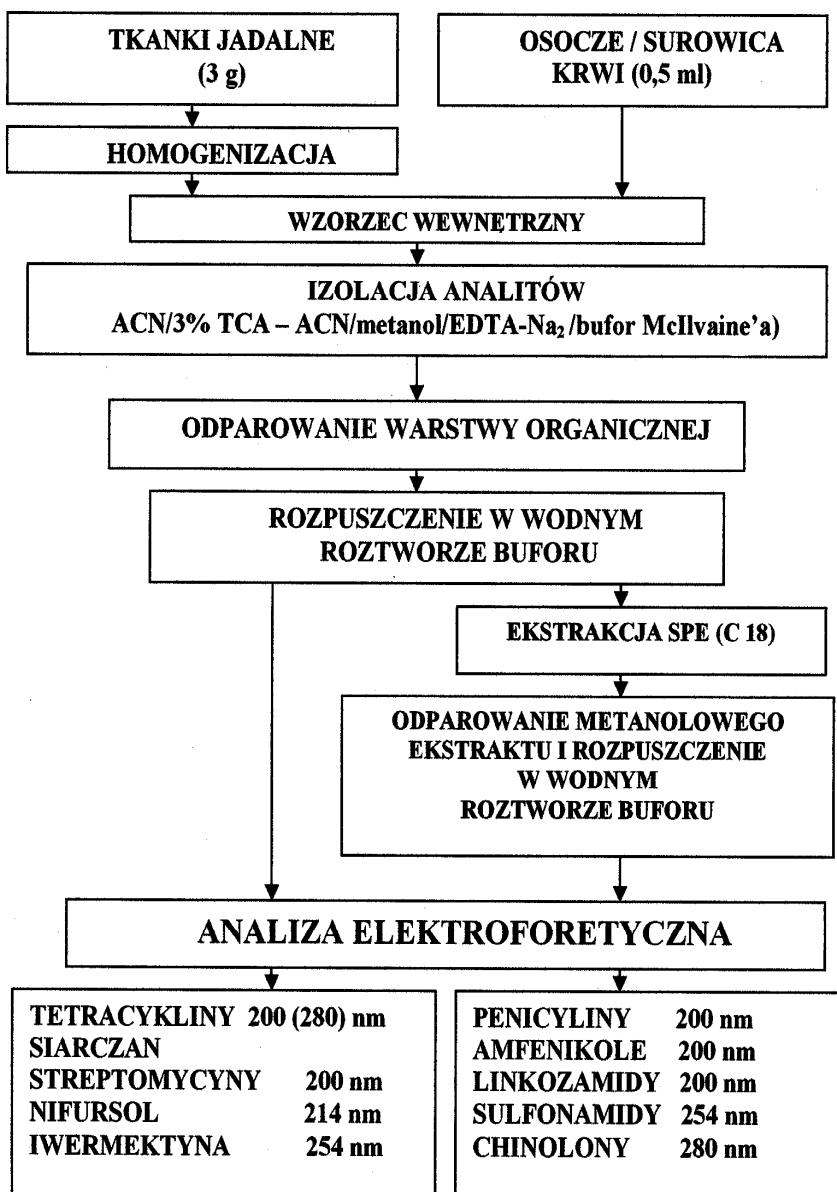
Fig. 5. Comparison of recovery of chosen sulfonamide drugs after extraction by LLE and SPE.



Ryc. 6. Elektroferogram próbki drobiowej tkanki mięśniowej, zawierającej wzorec wewnętrzny (I.S.), o stęż. 1 $\mu\text{g/g}$ oraz oznaczane sulfonamidy, o stęż. 0,2 $\mu\text{g/g}$ próby tkankowej; I.S. – sulfanilamid, 1 – sulfametazyna, 2 – sulfamerazyna, 3 – sulfafurazol, 4 – sulfametoksazol, 5 – sulfatiazol, T – czas, ABS – absorbancja (10^{-3}).

Fig. 6. Electropherogram of poultry muscle sample containing internal standard (I.S.) at conc. 1 $\mu\text{g/g}$ and analyzed sulfonamides at concentration 0.2 $\mu\text{g/g}$ of sample; I.S. – sulfanilamide, 1 – sulfamethazine, 2 – sulfamerazine, 3 – sulfafurazole, 4 – sulfametoxazol, 5 – sulfatiazole, T – time, ABS – Absorbance (10^{-3}).

Wyniki badań przeprowadzone dla różnych grup chemioterapeutyków wykazały, iż technika SPE stanowi najbardziej efektywny proces przygotowania prób, gdyż oprócz usunięcia większości substancji balastowych może stanowić etap wzbogacający próby w anality. Analiza wielkości odzysków i selektywności oznaczeń analitów zadecydowała o przyjęciu techniki SPE w dalszych badaniach optymalizacji procedury.



Ryc. 7. Schemat postępowania analitycznego przy elektroforetycznym oznaczaniu leków w materiale biologicznym.

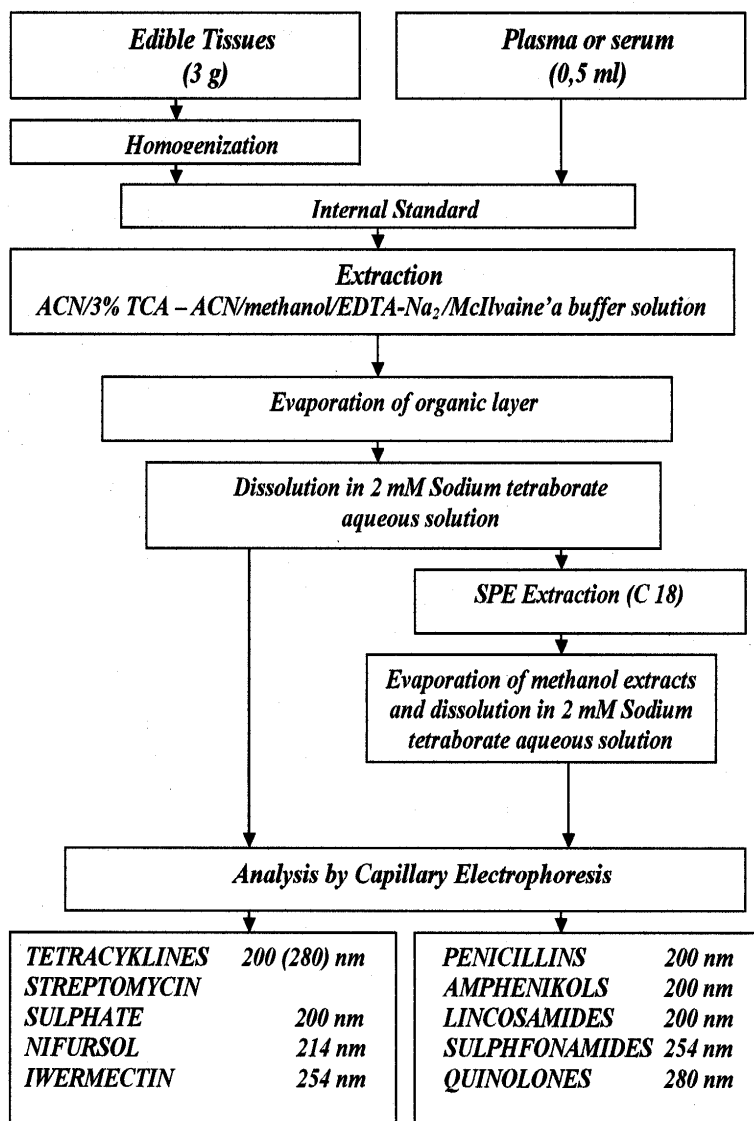


Fig. 7. Analytical procedure of electrophoretic drug determination in biological material – scheme.

Tabela 2. Materiał badawczy, grupy leków oraz wybrane elementy optymalizacji procedury przygotowania prób do analizy.

Table 2. Investigative material, groups of medicines and some of parameters of procedure optimization of samples for analysis.

Material badawczy Analyzed material	Zwierzęta Animals	Anality Analytes	Czynnik odbiałczający Deproteinizing agent	Oczyszczanie ekstraktu Clean-up of extract
Tkanki jadalne (mięśnie, wątroba, nerki, skóra / tłuszcz) <i>The edible tissues (muscle, kidney, liver, skin with fat)</i>	Indyki, kury, świnię	Siarczan streptomycyny	ACN (6 ml)	–
	Kury	Amfenikole	ACN (6 ml)	SPE (C-18)
	Indyki, kury	Linkozamidy	ACN (6 ml)	SPE (C-18)
	Indyki, kury	Sulfonamidy	ACN (6 ml)	SPE (C-18)
	Indyki, kury, świnię	Chinolony	3% TCA / ACN (6 ml)	SPE (C-18)
	Indyki, kury, świnię	Penicyliny	3%TCA/ACN (2 ml) metanol (2 ml) EDTA-Na ₂ (1 ml)	SPE (C-18)
	Indyki	Nifursol	ACN (6 ml)	–
Mięśnie / <i>Muscle</i>	Ryby (karasie, pstrągi, karpie)	Tetracykliny	ACN (2 ml) bufor McIlvaine'a (2 ml) EDTA-Na ₂ (1 ml)	–
Osocze krwi <i>Plasma</i>	Konie, świnię	Iwermektyna	ACN (2 ml) metanol (1 ml)	–
Surowica krwi <i>Serum</i>	Indyki	Tiamfenikol	ACN (3 ml)	–

W kolejnym etapie procedury przygotowania prób, metanolowe ekstrakty odparowano na łaźni wodnej, a suchą pozostałość rozpuszczono w 2 mM roztworze tetraboranu sodowego, odwirowano i poddawano analizie elektroforetycznej. nierozpuszczalne pozostałości substancji balastowych zostały oddzielone od wodnego roztworu analitów podczas wirowania prób.

Efektom przeprowadzonych badań było opracowanie procedury postępowania analitycznego, umożliwiającego ilościowe oznaczanie dziewięciu grup chemioterapeutyków.

4.2. Warunki separacji elektroforetycznej

4.2.1. Analityczna długość fali

Analityczną długość fali dla poszczególnych chemioterapeutyków wyznaczono na podstawie ich widm spektrofotometrycznych. Większość wybranych do analizy leków charakteryzowała się zdolnością absorbowania światła nadfioletowego (UV) przy krótkich długościach fal ($\lambda = 190 - 205$ nm). Dla penicylin, tetracyklin, amfenikoli, linkozamidów $\lambda = 200$ nm stanowiła analityczną długość fali z wyboru, gdyż chromofory wymienionych związków najlepiej absorbowwały wiązkę promieniowania UV w krótkim zakresie fal. Dokonane zapisy widm wykazały ponadto, iż tetracykliny i sulfonamidy, oprócz możliwości oznaczania przy charakterystycznych dla siebie długościach fal: przy 280 nm i 254 nm, absorbują także światło UV w zakresie krótkich fal. W przypadku tetracyklin zostało to wykorzystane przy opracowaniu metodyki ich elektroforetycznego oznaczania. Przy stosowaniu metod chromatograficznych, które jako fazy ruchomej używają rozpuszczalników organicznych, oznaczanie leków przy krótkich długościach fal UV stanowi często istotny problem. Rozpuszczalniki, wchodzące w skład faz chromatograficznych równie dobrze jak oznaczane związki, absorbują światło UV w krótkim zakresie fal, stąd stosunkowo wysokie ich tła nie sprzyjają oznaczaniu tych związków. Natomiast bufor separacyjny stosowane w CE są złożone głównie z roztworów wodnych, dzięki czemu pojawiające się tło jest minimalne lub praktycznie zerowe. Dlatego do oznaczeń chemioterapeutyków posiadających chromofory, absorbujące przy krótkich długościach fal preferowane były wodne roztwory buforów bez dodatków modyfikatorów organicznych.

4.2.2. Kondycjonowanie systemu

Uzyskanie powtarzalnych wyników analiz oraz stabilnej linii absorbancji w zapisie elektroforetycznym wymagało przeprowadzenia szeregu czynności przygotowawczych przed rozpoczęciem analiz. Dotyczyły one głównie kapilary i układu detekcji. W ramach kondycjonowania systemu elektroforetycznego przepłukiwano kapilary kolejno: płynem regeneracyjnym (2 min), wodą trzykrotnie destylowaną (2 min) oraz buforem elektrolitycznym (1 min). Cykl taki miał za zadanie usunięcie ewentualnych drobnych zanieczyszczeń wewnątrz kapilary i stworzenie warunków, umożliwiających wytworzenie przepływu elektroosmotycznego. Podobne czynności płukania dokonywano po zakończeniu cyklu analiz, pozostawiając kapilarę wolną od jakichkolwiek roztworów. Po każdej separacji elektroforetycznej stosowano dodatkowe, 10-sekundowe płukanie metanolem.

W ramach kondycjonowania koniecznym było także odpowiednie nagrzanie lampy UV i ustabilizowanie temperatury płynu chłodzącego (*coolant*) otaczającego kapilarę. Dokonywano tego za pomocą sterowanej komputerem funkcji włączającej i nagrzewającej lampę oraz termostatu stabilizującego temperaturę płynu chłodzącego z dokładnością do $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Wszystkie procedury związane z kondycjonowaniem układu (cykle płukania kapilary, nagrzania lampy oraz stabilizacji temperatury) przeprowadzano jednocześnie w ciągu 20 – 25 min.

4.2.3. Ustalanie parametrów separacji elektroforetycznej

Badania przeprowadzane były na aparacie do elektroforezy kapilarnej P/ACE 2100 firmy Beckman (Fullerton, USA) wyposażonym w detektor UV ze zmienną długością fali oraz system akwizycji danych (Gold). Do analiz stosowano niemodyfikowane kapilary krzemionkowe o całkowitej długości 47 – 77 cm i średnicy 50 – 75 μm . W przypadku oznaczeń tetracyklin do badań zastosowano kapilarę „banieczkową” (*bubble cell capillary*) o rozszerzonej średnicy (150 μm) celki detekcyjnej (ELP). Analizy przeprowadzono stosując typowe ustawienie polaryzacji elektrod, kiedy katoda (elektroda naładowana ujemnie) lokalizowana była od strony detektora, anoda natomiast znajdowała się od strony podawania próby do układu separacyjnego. Wprowadzanie prób do układu dokonywano sposobem hydrodynamicznym przez umieszczenie jednego z końców kapilary w szczelnym zbiorniku z ekstraktem i zastosowanie wysokiego ciśnienia (3,45 kPa). Zmianę wielkości nastrzyku i kolejności analizowanych prób przeprowadzano przy użyciu specjalnego oprogramowania oraz automatycznego podajnika próbek.

Optymalizacja metodyki oznaczania elektroforetycznego miała na celu uzyskanie satysfakcjonującej rozdzielczości ($R > 1,0$) analitów w stosunkowo krótkim czasie. Opracowując parametry separacji elektroforetycznej wzięto pod uwagę kilka czynników, charakteryzujących bufor elektrolityczny (jego skład i pH) oraz parametry związane z aparaturą (średnica i długość kapilary, czas nastrzyku, wielkość przykładanego napięcia, temperatura analizy oraz warunki detekcji). Wszystkie te parametry w różnym stopniu wpływały zarówno na wydajność, powtarzalność, selektywność, jak i precyzję oznaczania.

Tabela 3. Parametry separacji elektroforetycznej stosowane przy oznaczaniu chemioterapeutyków.
 Table 3. The electrophoretic conditions of analyzed drugs separation.

Aparatura / Equipment	P/ACE 2100, detektor UV ze zmienną długością fali A selectable fixed-wavelength UV detector
Kapilara / Capillary	Krzemionkowa, niemodyfikowana / Silica, unmodified o.d.: 375 μm , i.d.: 50 – 75 μm , długość / length 47 – 77 cm do oznaczeń tetracyklin zastosowano kapilarę „banieczkowa” o wewnętrznej średnicy celki detekcyjnej 150 μm for tetracyclines determination was used ELP capillary with bubble cell i.d. 150 μm
Przykładane napięcie Applied voltage	16 – 22 kV
Polaryzacja elektrod Mode of polarization	Katoda umieszczona od strony detektora, anoda od strony wprowadzania próby do układu (miejsca nastrzyku) / Detector was set on the cathode end, analytes were introduced into the capillary at anode
Nastrzyk Injection time	Pneumatyczny (hydrodynamiczny) / Hydrodynamic 2 – 5 s
Temperatura analizy Temperature	22,0 ($\pm 0,1$)°C
Czas analizy Analysis time	4 – 12 min

o.d. – średnica zewnętrzna (outside diameter); i.d. – średnica wewnętrzna (internal diameter)

4.2.4. Czynniki wpływające na optymalizację oznaczania elektroforetycznego

Bufor elektrolityczny

Dobierając skład i pH buforu separacyjnego dla danej grupy chemicznej związków kierowano się jego: niewielkim współczynnikiem absorpcji przy wybranej długości fali (dla detektora UV), odpowiednią pojemnością buforową w wyselekcjonowanym zakresie pH oraz ruchliwością elektroforetyczną zbliżoną do ruchliwości analitów. Wybór odpowiedniego stężenia składników próby miał na celu zoptymalizować wysokość i ostrość otrzymywanych pików w zapisie elektroforetycznym (zbyt niskie stężenie powodowało otrzymanie mniej ostrych pików, zbyt wysokie natomiast zmniejszało szybkość przepływu elektroosmotycznego). Najbardziej ostre piki uzyskiwano w warunkach, kiedy ruchliwości elektrolitu i oznaczanych substancji były zbliżone. Przy dobieraniu buforu elektrolitycznego, podobnie jak przy opracowaniu procedury przygotowania prób, uwzględniano nie tylko zróżnicowaną strukturę chemiczną analitów, ich zdolność do rozpuszczania w rozpuszczalnikach polarnych bądź niepolarnych, ale przede wszystkim ich różne wartości pKa. Przykładowo: chinolony posiadają przeważnie dwie wartości pKa (około 6 i 9), stąd w buforach kwaśnych występują w formie kationowej, natomiast w zasadowych – w formie

anionów. W buforach obojętnych (pH około 7) najczęściej przybierają formę jonów obojnaczych, trudno rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach polarnych. Tetracykliny charakteryzują się trzema wartościami pKa (3,3/7,7/9,3), natomiast sulfonamidy dwoma zakresami pKa (3 – 3,5/5 – 11) [38]. Obniżenie wartości pH buforu poniżej stałej dysocjacji kwasowej (pKa) analitów powoduje wzrost ilości formy zdysocjowanej, podobnie jak podniesienie wartości pH powyżej stałej dysocjacji zasadowej (pKb). Z uwagi na zróżnicowanie strukturalne oznaczanych grup chemioterapeutyków oraz szeroki zakres wartości pKa wszystkich analitów dobranie jednego roztworu elektrolitycznego było niemożliwe. Dla każdej z badanych grup opracowano optymalny skład i dobrano stężenia poszczególnych składników buforu (tab. 4), pozwalające na rozdzielenie wszystkich analitów z danej grupy.

Wpływ modyfikatorów organicznych

Celem zwiększenia rozpuszczalności analitów oraz efektywności separacji elektroforetycznej do buforu wprowadzano dodatki różnych modyfikatorów organicznych (takich jak: metanol, acetonitryl, aceton). Najbardziej użytecznym okazał się metanol. Jego obecność w buforze separacyjnym w istotny sposób zmieniała polarność i lepkość elektrolitu [21], przy okazji powodując zmiany wielkości EOF i mobilności elektroforetycznej analitów. Wpływając nieznacznie na zmianę ładunku rozdzielanych komponentów próby oraz na stopień jonizacji wewnętrznej ściany kapilary, metanol spowalniał EOF oraz wydłużał czasy migracji analitów. W celu uzyskania efektywnego rozdzielenia najbardziej optymalnym okazało się zastosowanie 20% (v/v) metanolu przy oznaczaniu sulfonamidów, a w przypadku oznaczeń iwermektyny 25% (v/v).

Wpływ związków powierzchniowo-czynnych

Do jednoczesnego oznaczania analitów zjonizowanych i obojętnych wykorzystano zdolność tworzenia miceli przez związki powierzchniowo-czynne (surfaktanty), które dodawano w odpowiednim stężeniu do buforu elektrolitycznego. Do tworzenia miceli użyty został SDS, anionowy związek powierzchniowo-czynny o charakterystycznym niepolarnym wnętrzu. Cząsteczki obojętne (niepolarne) dostając się do wnętrza miceli, migrowały wewnątrz kapilary wolniej od szybkości EOF, w efekcie umożliwiając separację analitów. Oznaczane związki lecznicze charakteryzowały się często amfoterycznym charakterem lub zbliżoną strukturą chemiczną, a posiadając niekiedy identyczny stopień ładunku przemieszczały się wzdłuż kapilary z jednakową prędkością. Dopiero obecność fazy micelarnej pozwalała na zróżnicowanie ich prędkości elektroforetycznych. Prze-

testowano różne stężenia SDS w zakresie 10 – 50 mM, jednak najefektywniejsze separacje otrzymano przy zastosowaniu 25 mM SDS.

Kapilara

Parametry kapilary, takie jak długość i średnica, miały wpływ nie tylko na sprawność układu i czas analizy, lecz także na objętość nastrzykiwanej próby. Wstępne analizy przeprowadzano przy użyciu krótkich kapilar o stosunkowo dużej średnicy. Zmniejszenie przekroju kapilary powodowało zmniejszenie efektu rozmycia pasm (poprzez obniżenie ilości wydzielanego ciepła Joule'a, ponadto nieznacznie wydłużało czas migracji analitów. Efektem użycia kapilar o wąskiej średnicy było ograniczenie zdolności detekcji poprzez skrócenie optycznej drogi światła (dotyczy detekcji typu on-line dla detektorów UV-Vis i fluorescencyjnych). Natomiast wydłużanie kapilary (przy określonym napięciu i zastosowaniu tego samego elektrolitu) powodowało zwiększenie czasu rozdzielania analitów. Optymalne parametry kapilar użytych do rozdzielania chemioterapeutyków zebrano w tab. 5.

Napięcie i temperatura

Wzrost przykładanego napięcia powodował skrócenie czasu analizy i pogorszenie rozdzielczości z powodu poszerzania się pasm. Było to bezpośrednim skutkiem wydzielania większych ilości ciepła, które bez efektywnego systemu chłodzenia (jak wykazały analizy) trudniej ulegało rozproszeniu. Efektem przegrzewania się elektrolitu była zmiana jego lepkości i przewodnictwa, co wpływało na zmianę szybkości migracji poszczególnych analitów i powodowało nieznaczny wzrost rejestrowanego natężenia prądu (o kilka μA). Wahania temperatury w trakcie separacji elektroforetycznej również powodowały zmianę lepkości buforu (oraz granicznego stężenia micelnego – dotyczy MEKC), co przy oznaczeniach ilościowych skutkowało brakiem wymaganej powtarzalności sygnałów pochodzących od analitów. Na podstawie przeprowadzonych badań uwzględniających utrzymanie stałych wielkości przykładanego napięcia i temperatury analizy stwierdzono, że bez skutecznego systemu chłodzenia nie było możliwe uzyskanie powtarzalnych wyników analiz ilościowych (tzn. współczynnika korelacji $r \geq 0,999$).

Czas nastrzyku

Wstępne analizy elektroforetyczne oznaczanych substancji leczniczych przeprowadzono stosując nastrzyk hydrodynamiczny przez 1, 2, 5, 7 oraz 10

sekund. Badania określające wpływ wielkości nastrzyku na intensywność sygnału i efektywność separacji wykazały, iż dłuższy czas nastrzyku generował silniejszy sygnał (wielkości te dotyczyły zarówno wysokości jak i pola powierzchni pod pikiem), jednakże w miarę wzrostu objętości nastrzykiwanej próby malała efektywność separacji. Ponadto dłuższy czas nastrzyku powodował nieznaczne skrócenie czasu migracji analitów. Najbardziej optymalnym okazały się czasy nastrzyku w granicach 2 do 5 s, co odpowiadało określonej objętości wprowadzanej do układu próby od 8 do 20 nl.

Dobór parametrów przeprowadzony w ramach optymalizacji metody oznaczania wybranych grup chemioterapeutyków z praktycznego punktu widzenia stanowił kompromis pomiędzy selektywnością, wydajnością i efektywnością separacji, a czasem analizy elektroforetycznej. Zoptymalizowane parametry analizy elektroforetycznej zebrano w tabelach 4 i 5.

Tabela 4. Zebrane parametry analizy elektroforetycznej dla oznaczanych związków (cz. II).
Table 4. Summary electrophoretic parameters for analytes (part II).

Grupa leków <i>Group of drugs</i>	Długość fali <i>UV wavelength</i> (nm)	Napięcia <i>Voltage</i> (kV)	Temp. <i>Temp.</i> (°C)	Czas <i>nastrzyku</i> <i>Injection</i> <i>time (s)</i>	Czas <i>analizy</i> <i>Analysis</i> <i>time (min)</i>
Penicyliny	200	16	22	2	6,0
Tetracykliny	200	20	22	5	7,0
Aminoglikozydy	200	20	25	2	5,0
Amfenikole	200	20	22	2	4,0
Linkozamidy	200	16	22	2	9,0
Sulfonamidy	254	20	22	2	6,0
Chinolony	280	16	22	2	8,0
Awermektyny	254	22	25	7	6,0
Nitrofurany	214	20	25	5	12,0

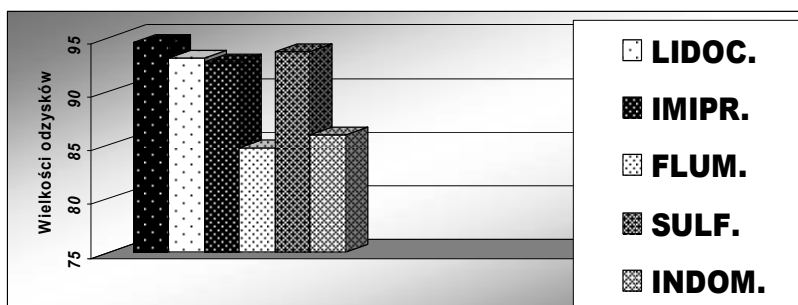
Tabela 5. Zebrane parametry analizy elektroforetycznej dla oznaczanych związków (cz. I).
 Table 5. Summary electrophoretic parameters for analytes (part I).

Grupa leków <i>Group of drugs</i>	Anality i ich czasy migracji <i>Analytes and their migration times (min)</i>	I.S. <i>(czas migracji migration time) (min)</i>	Bufor separacyjny <i>The separation buffer</i>	Kapila- ra <i>Capilla- ry</i>
Penicyliny <i>Penicillins</i>	Amoksylicyna (4,6) Ampicylina (4,7) Penicylina G (4,8)	Chlorowodo- rek efedryny (3,6)	40 mM H ₃ BO ₃ 2,5 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 2 mM Na ₃ PO ₄ pH = 7,35	67 cm / 75 μm
Tetracykliny <i>Tetracyclines</i>	Chlorowodorki: tetracykliny (5,0) oksyntetracykliny (5,2) doksycykliny (5,3)	Chlorowodo- rek efedryny (3,4)	20 mM H ₃ BO ₃ 2 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 20 mM NaH ₂ PO ₄ H ₃ PO ₄ pH = 2,7	57 cm / 75 μm, ELP: (150 μm)
Aminogliko- zydy <i>Aminoglyco- sides</i>	Siarczan streptomycyny (3,4)	Chlorowodo- rek lidokainy (2,6)	2,5 mM H ₃ BO ₃ 2,5 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 15 mM NaH ₂ PO ₄ H ₃ PO ₄ pH = 2,5	57 cm / 75 μm
Amfenikole <i>Amphenicols</i>	Florfenicol (2,7) Tiamfenikol (2,8) Chloramfenikol (3,2)	Flumechina (4,1)	10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM SDS pH = 9,3	57 cm / 75 μm
Linkozamidy <i>Lincosamides</i>	Chlorowodorki: linkomycyny (7,1) klindamycyny (7,9)	Chlorowodo- rek efedryny (6,9)	10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM SDS pH = 9,3	57 cm / 75 μm
Sulfonamidy <i>Sulfonamides</i>	Sulfametazyna (4,2) Sulfatiazol (4,3) Sulfamerazyna (4,4) Sulfametoksazol (5,5) Sulfachloropirazyjna (6,0) Sulfafurazol (6,3)	Sulfanilamid (4,1)	20 % (v/v) metanol 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM SDS pH = 9,3	67 cm / 75 μm
Chinolony <i>Quinolones</i>	Lomefloksacylna (4,8) Norfloksacylna (4,9) Cyprofloksacylna (5,1) Ofloksacylna (5,3) Enrofloksacylna (5,6) Cinoksacylna (6,7)	Indometacylna (6,2)	40 mM H ₃ BO ₃ 2,5 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 2 mM Na ₃ PO ₄ 25 mM TRIS pH = 7,5	57 cm / 75 μm
Awermektyny <i>Avermectins</i>	Iwermektyna (4,2)	Chlorowodo- rek imiprami- ny (3,2)	25: % (v/v) metanol 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM H ₃ BO ₃ pH = 8,3	47 cm / 50 μm
Nitrofurany <i>Nitrofuranes</i>	Nifursol (11,1)	Chlorowodo- rek efedryny (5,2)	25 mM H ₃ BO ₃ 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM NaH ₂ PO ₄ pH = 8,3	77 cm / 75 μm

I.S. – wzorzec wewnętrzny (*Internal Standard*), Parametry kapilar: długość / średnica wewnętrzna
 (*Capillary parameters: Length / Internal Diameter*)

4.2.5. Dobór wzorca wewnętrznego

Dla każdej z oznaczanych grup wybrano związek, pełniący rolę wzorca wewnętrznego. Jego obecność w próbach poddawanych procedurze oczyszczania umożliwiła wzrost powtarzalności wyników oraz uzyskanie wysokich współczynników korelacji. Dobierając wzorzec wewnętrzny uwzględniano jego czas migracji, niekolidujący z czasami migracji analitów i substancji balastowych, charakter chemiczny oraz zdolności absorpcyjne (analogiczne jak oznaczanych substancji leczniczych). Wysokie wartości odzysków (przekraczające 84%), potwierdziły ich przydatność w toku opracowanego postępowania analitycznego. Wybrane do analiz substancje, pełniące rolę wzorców wewnętrznych oraz ich czasy migracji zebrano w tab. 5. Wielkości wyznaczonych dla nich odzysków przedstawiono na ryc. 8.



Ryc. 8. Wielkości odzysków (%) dla wybranych substancji pełniących rolę wzorców wewnętrznych: LIDOC. – lidokainy chlorowodorek, IMIPR. – imipraminy chlorowodorek, FLUM. – flumecyna, SULF. – sulfanilamid, INDOM. – indometacyna.

Fig. 8. The recovery values (%) for internal standard substances: LIDOC. – lidocaine hydrochloride, IMIPR. – imipramine hydrochloride, FLUM. – flumquine, SULF. – sulfanilamide, INDOM. – indomethacin.

4.3. Ocena procedury przygotowania prób do analizy pozostałości leków i badań farmakokinetycznych

Opracowaną metodykę poddano badaniom weryfikującym jej przydatność do założonych celów. Przeprowadzono ocenę statystyczną otrzymanych wyników, jak również wykazano możliwości zastosowania opracowanej metodyki do rutynowych badań kontrolujących występowanie pozostałości chemioterapeutyków w próbach tkankowych. W przypadku niektórych leków (iwermektyny, tiamfenikolu) potwierdzono także przydatność metody elektroforetycznej do badań farmakokinetycznych i oceny biodostępności.

4.3.1. Przydatność do oznaczeń w różnym materiale, pochodzącym od różnych gatunków zwierząt hodowlanych

Możliwości zastosowania elektroforetycznych metod do oznaczeń leków w materiale biologicznym sprawdzono analizując różne próby tkankowe: krew, mięśnie, wątrobę, nerki, skórę z tłuszczem, płucka, serca, żołądki oraz jaja. Tkanki te pochodziły od różnych gatunków zwierząt: drobiu (indyki i kury), świń, a także koni (osocze krwi). Przeprowadzone analizy prób kontrolnych (wolnych od analitów) wykazały, iż w zależności od analizowanej tkanki, przy określonej długości fali, w obrazie elektroforetycznym pojawiały się piki pochodzące od endogennych składników prób. Odpowiednio dobrane parametry analizy elektroforetycznej umożliwiły całkowite rozdzielenie wszystkich substancji, a tym samym swobodną interpretację elektroferogramów każdej z analizowanych grup leków. W kolejnej serii doświadczeń przeprowadzono testy, mające na celu określenie wpływu rodzaju materiału tkankowego na odzyski leków. W tym celu każdą z kontrolnych prób tkankowych, obciążono trzema stężeniami związku (QC), wybranymi do badań walidacyjnych oraz poddano postępowaniu analitycznemu według opracowanej procedury, właściwej dla danej grupy chemioterapeutyków. Wyniki tych oznaczeń posłużyły do określenia odzysków leków, dla poszczególnych tkanek jadalnych. Zestawiono je w tab. 8.

Następnie przeprowadzono badania mające na celu określenie wpływu gatunku zwierząt, od których pochodzi materiał do analiz na odzyski leków. Testy wykonano w analogiczny sposób jak dla różnego rodzaju tkanek. Stwierdzono, iż gatunek zwierząt praktycznie nie miał istotnego wpływu na wartości odzysków leków, a opracowana procedura może być zastosowana do badań pozostałości bez względu na gatunek zwierząt. Największe wartości odzysków otrzymano dla tkanek indyków (87 – 96%), nieco niższe dla kur (84 – 94%), najniższe natomiast dla świń (82 – 91%).

4.3.2. Analiza ilościowa. Ocena statystyczna metody w aspekcie oznaczania śladowych ilości leków

Prawie każda z metod analitycznych obarczona jest pewnym błędem, a otrzymywane wyniki niekiedy różnią się pomiędzy sobą. W celu udowodnienia, że metodyki użyte do badań, zarówno farmakokinetycznych, jak i pozostałości leków, przeprowadzone zostały precyzyjnie, koniecznym było wykonanie walidacji. Przeprowadzona ocena statystyczna miała na celu również wykazanie, iż wybrane postępowanie analityczne było prawidłowe i można było je zastosować w danych warunkach analitycznych. Z uwagi na różnice w podejściu do tematu walidacji w różnych krajach, wynikające z wytycznych ustalonych przez Międzynarodową Konferencję Harmonizacji (ICH), Międzynarodową Organizację Normalizacyjną (ISO), Farmakopeę Europejską (Ph. Eur.) czy Amerykańską

(USP) ustalanie wszystkich parametrów walidacyjnych następuje różnymi sposobami, a nieścisłości dotyczące definiowania niektórych pojęć mają charakter semantyczny [73]. Ocena statystyczna metod elektroforetycznych praktycznie nie różni się od oceny powszechnie stosowanych metod chromatograficznych. Konieczność jej przeprowadzenia wynika z wymogów, stawianych metodom analitycznym przez EU. Do typowych parametrów walidacyjnych zaliczana jest: specyficzność/selektywność, liniowość, dokładność, precyzja, granice wykrywalności i oznaczalności, jak również elastyczność, trwałość, stabilność metody oraz jej odporność. Wyniki oceny statystycznej przedstawiono w tabelach 6 – 8

Tabela 6. Parametry (charakterystyka kalibracji) wyznaczone dla badanych substancji leczniczych w materiale biologicznym – zakres liniowości i współczynniki regresji liniowej.

Table 6. Quantitative parameters (calibration characteristic) obtained for the analysis of selected drugs in biological samples – linearity range and regression coefficients.

Chemioterapeutyki <i>Chemoterapeutics</i>	Zakres liniowości <i>Linearity range</i> ($\mu\text{g/g}$)	Nachylenie <i>Slope</i> a ($\pm \Delta a$)	Przecięcie <i>Intercept</i> b ($\pm \Delta b$)
Ampicylina	0,025 – 1	2,460 ($\pm 0,013$)	0,038 ($\pm 0,007$)
Amoksycyliny		2,338 ($\pm 0,013$)	0,035 ($\pm 0,006$)
Penicylina G		2,601 ($\pm 0,014$)	0,040 ($\pm 0,006$)
Chlorowodorki: tetracykliny	0,005 – 0,2	13,849 ($\pm 0,085$)	0,100 ($\pm 0,008$)
oksytetracykliny		13,526 ($\pm 0,085$)	0,104 ($\pm 0,008$)
doksycykliny		16,479 ($\pm 0,075$)	0,088 ($\pm 0,007$)
Siarczan streptomycyny	0,16 – 8,0	0,060 ($\pm 0,0003$)	0,0348 ($\pm 0,001$)
Chloramfenikol	0,005 – 1,0	2,430 ($\pm 0,0028$)	0,0023 ($\pm 0,001$)
Tiamfenikol	0,010 – 1,0	2,049 ($\pm 0,0051$)	-0,025 ($\pm 0,002$)
Florfenikol	0,025 – 5,0	1,695 ($\pm 0,0021$)	0,007 ($\pm 0,004$)
Chlorowodorki: linkomycyny	0,05 – 5,0	0,770 ($\pm 0,0016$)	0,016 ($\pm 0,003$)
klindamycyny		0,572 ($\pm 0,0016$)	0,020 ($\pm 0,003$)
Sulfametazyna	0,025 – 1,0	1,726 ($\pm 0,009$)	-0,0065 ($\pm 0,004$)
Sulfamerazyna		1,948 ($\pm 0,01$)	-0,0005 ($\pm 0,005$)
Sulfafurazol		2,422 ($\pm 0,011$)	-0,0015 ($\pm 0,005$)
Sulfametoksazol		2,495 ($\pm 0,012$)	-0,0046 ($\pm 0,006$)
Sulfatiazol		2,460 ($\pm 0,012$)	0,0047 ($\pm 0,006$)
Lomeflokscyna	0,01 – 1,0	2,155 ($\pm 0,0042$)	0,0080 ($\pm 0,021$)
Norflokscyny		2,364 ($\pm 0,0048$)	0,0002 ($\pm 0,002$)
Cyproflokscyna		2,298 ($\pm 0,0043$)	0,012 ($\pm 0,002$)
Oflokscyna		1,712 ($\pm 0,0036$)	0,012 ($\pm 0,002$)
Enroflokscyny		2,351 ($\pm 0,0042$)	0,033 ($\pm 0,002$)
Cinoksacyna		2,395 ($\pm 0,0046$)	0,027 ($\pm 0,002$)
Nifursol	0,02 – 2,0	0,318 ($\pm 0,0008$)	0,020 ($\pm 0,003$)
Iwermektyna	0,001 – 0,03	0,023 ($\pm 0,0003$)	0,017 ($\pm 0,002$)

Selektywność/specyficzność (*Selectivity / specificity*) oceniano wizualnie poprzez porównanie elektroferogramów prób ekstraktu materiału biologicznego wolnego od analitów z ekstraktami tkankowymi zawierającymi oznaczane związki z danej grupy. Sygnały rejestrowane w zapisie elektroforetycznym, pochodzące od analitów, substancji dodatkowych i składników matrycy biologicznej nie wykazywały interferencji. Współczynniki rozdzielczości wyznaczone dla dwóch najbliższych pików oznaczanych związków były większe od wartości $R > 1,0$. Specyficzność odnoszono do metody pozwalającej na oznaczenie jednego analitu w określonej matrycy, natomiast selektywność dotyczyła metody, umożliwiającej analizę kilku leków w obecności innych składników próby.

Liniowość (*Linearity*) metody badano na 6 – 8 poziomach stężeń każdego z analitów, w zakresie 50 – 150% wartości spodziewanych stężeń [54] (dla badań farmakokinetycznych maksymalne stężenie we krwi lub osoczu stanowiło 100% a dla badań pozostałości leków oceniano wartości 0,5 x MRL, 1 x MRL, 2 x MRL). Dla każdego z badanych leków stwierdzono doświadczalnie liniową zależność wielkości sygnału od stężenia oznaczanego związku. Wyznaczono krzywe kalibracji w zakresach właściwych dla poszczególnych leków na podstawie sześciu serii prób pomiarowych. Następnie przystąpiono do oznaczeń stężeń substancji leczniczych w poszczególnych tkankach, osoczu lub surowicy krwi, przy użyciu opracowanych metod. Stężenia związków leczniczych w analizowanych próbach obliczono z równań regresji, przy współczynniku korelacji $r \geq 0,999$. Celem uzyskania wymaganej powtarzalności stosowano metodę wzorca wewnętrznego, dobieranego indywidualnie dla każdej z oznaczanych grup leków. Otrzymane równania regresji ($y = ax + b$), wartości: nachylenia ($a \pm \Delta a$) oraz przecięcia ($b \pm \Delta b$) (Δa , Δb – błędy wyznaczenia wartości a oraz b) posłużyły do wyznaczenia kolejnych parametrów walidacji. Próby kontrolne dla trzech stężeń (niskiego, średniego i wysokiego) przygotowywane były na początku analiz i oznaczane w trakcie kolejnych dni pracy.

Zakres metody stanowił przedział, w którego obrębie (poza wartościami skrajnymi) dana metoda charakteryzuje się odpowiednią liniowością, dokładnością i precyzją. Przedział ten związany był z planowanym zastosowaniem metody dla oznaczeń pozostałości w materiale biologicznym i mieścił się w granicach 10 – 120% wartości MRL.

Ocena dokładności (*Accuracy*) przeprowadzana jest z reguły na podstawie analizy próby o znanej wartości stężenia analitu przy użyciu CRM i porównanie wyników otrzymanych badaną metodą z dokładnie znaną wartością. Dla większości analitów CRM prób tkankowych nie był dostępny, dlatego do badanych tkanek dodawano znane ilości analitów, a następnie oznaczano je opracowywaną

metodą. Ocena dokładności metod przeprowadzono na podstawie wydajności procedury ekstrakcyjnej. Dokładność serii jednoczesnej (*Intra-day*) wyznaczono dla wszystkich punktów kalibracji metody, natomiast dokładność pomiędzy dniami (*Inter-day*) oznaczeń została określona na 3 poziomach stężeń (QC), analizując minimum 9 prób. Parametry te zostały określone zarówno, jako stosunek oznaczonego stężenia analitu do wartości nominalnej oraz jako niedokładność (*Inaccuracy*) wyrażone błędem systematycznym (BIAS), poprzez określenie zależności pomiędzy wielkością obliczoną ($C_{obl.}$) a teoretyczną ($C_{teor.}$): $BIAS (\%) = [(C_{teor.} - C_{obl.}) / C_{obl.}] \times 100\%$. Suma bezwzględnych wartości błędów systematycznych wyznaczona dla wszystkich punktów kalibracji nie przekraczała 20%.

Odzyski całkowite (*Absolute Recovery*) wyznaczono poprzez porównanie wielkości sygnałów prób z dodatkiem analitów, które poddano procedurze oczyszczania do sygnałów pochodzących ze standardowych roztworów leków.

Precyzję (charakteryzującą rozrzut wyników, otrzymanych podczas wielokrotnego oznaczania związków tą samą metodą analityczną) wyrażano jako względne odchylenie standardowe, $RSD = (SD / \text{wartość średnia}) \times 100\%$. Pojęciami charakteryzującymi precyzję oznaczenia są: powtarzalność (*Repeatability*), precyzja pośrednia (*Intermediate Precision*) oraz odtwarzalność (*Reproducibility*). W ramach prezentowanej pracy, ze względu na nowatorski charakter badań, nie były wykonywane analizy międzylaboratoryjne, dotyczące odtwarzalności metody CE. Przeprowadzono natomiast badania **powtarzalności** (precyzję oznaczeń serii jednoczesnej), wykonując analizy w tych samych warunkach, w stosunkowo krótkim okresie czasu przez tego samego operatora, z użyciem tego samego aparatu. Otrzymane wartości (RSD) z reguły nie przekraczały 10%, jedynie dla najniższych stężeń sulfonamidów osiągały maksymalnie 12%. Badania **precyzji pośredniej**, dotyczące zmienności wewnątrz-laboratoryjnej, wykonywane były w różnych dniach z użyciem nowo przygotowanych odczynników. Umożliwiły one określenie rozrzutu wyników wyznaczonych doświadczalnie dla trzech stężeń (niskiego, średniego i wysokiego), a wyznaczone wartości RSD nie przekraczały 15%. Badanie liniowości, dokładności i precyzji możliwe było w trakcie analiz tych samych prób tkankowych.

Granica wykrywalności (LOD) może być wyznaczona w oparciu o ocenę szumów linii podstawowej i pomiaru próby zawierającej niewielką ilość analitu. Stosunek sygnału analitu do wielkości szumów 3: 1 (niekiedy 2: 1) przyjmowany jest jako granica wykrywalności. W prezentowanej pracy, wielkość ta obliczona została z równania regresji, na podstawie odchylenia standardowego (S_y) ślepej próby oraz nachylenia krzywej kalibracji (a); $LOD = 3,3 \times S_y/a$. **Granica oznaczalności** (LOQ) definiowana jest jako najmniejsza wartość stężenia anali-

tu, która może być oznaczona ilościowo z precyzją i dokładnością nieprzekraczającą 15%. Stosunek sygnału analitu do szumów 10:1 przyjmowany jest jako granica oznaczalności lub maksymalna dopuszczalna niepewność. Podobnie jak w przypadku LOD, w opracowanej metodyce posłużono się wartościami z wyznaczonego równania regresji; $LOQ = 10 \times S_y / a$.

W Dyrektywie 2002/657/WE (z dnia 14-08-2002) [19], dotyczącej oznaczeń pozostałości wprowadzono nowe parametry, wymagane dla metod potwierdzających. Do określenia wielkości, w których mierzona wartość jest większa od niepewności z nią związanej stosowane są pojęcia: **decyzyjnej wartości granicznej**, ($CC\alpha$) oraz **zdolności wykrywania** ($CC\beta$). Wartości te wyznaczano dla związków niedozwolonych (zawartych w Aneksie IV Rozporządzenia Rady Europy (Council Regulation 2377/90)) lub objętych badaniami, jednakże coraz częściej spotyka się wyznaczanie tych parametrów dla wszystkich substancji farmakologicznie czynnych, dopuszczonych do leczenia weterynaryjnego. Wartością $CC\alpha$ określany jest taki poziom analitu i wielkości powyżej tego poziomu, na którym można oszacować/wnioskować (z prawdopodobieństwem błędu α), że próba jest niezgodna. Błąd α oznacza prawdopodobieństwo uznania próby za fałszywie dodatnią, tzn. że próba jest zgodna, mimo tego, że otrzymano niezgodny pomiar (wynik analizy mylnie niezgodny). Wartość $CC\beta$ oznacza najmniejsze stężenie związku, które można zidentyfikować i oznaczyć ilościowo w próbce z prawdopodobieństwem błędu β . Błąd β natomiast oznacza prawdopodobieństwo, iż analizowana próba jest niezgodna rzeczywiście, pomimo że otrzymano pomiar zgodny (mylnie zgodny wynik). Parametry te mają na celu jednoznaczną interpretację wyników badań pozostałości w żywności, rozstrzygając czy próba zawiera dany związek i czy jego stężenie przekracza limit decyzyjny (wartość graniczną). Można je wyznaczyć na podstawie krzywych kalibracji zgodnie z PN-ISO 11843-2 [31]. W pracy posłużono się następującymi wzorami: $CC\alpha = 2,33 \sigma / b$; $CC\beta = CC\alpha + (1,64 \sigma)$, gdzie: „ σ ” błąd wyznaczenia wartości przecięcia, „ b ” – wartość przecięcia krzywej.

Elastyczność metody (*robustness*) określono poprzez wpływ niewielkich, lecz zaplanowanych celowo zmian parametrów separacji elektroforetycznych na wyniki pomiarów. Czynniki, które mogły wywierać wpływ na elastyczność metody elektroforetycznej były rodzaje kapilar pochodzących od różnych producentów, skład i pH buforów elektrolitycznych oraz efektywność chłodzenia układu (utrzymanie stałej temperatury analizy). Badanie elastyczności metody miało na celu potwierdzenie niezawodności przeprowadzonych analiz elektroforetycznych przy wystąpieniu niewielkich zmian wspomnianych czynników. Testy dotyczące elastyczności wykonywane były w trakcie opracowania postępowania analitycznego. Zmiany pH o wartość 0,1, przykładanego napięcia o 0,5kV, stężenia buforu o 0,001 M, temperatury analizy o 0,2°C oraz zastosowanie do separacji nowych kapilar nie powodowały istotnych zmian w zakresie

względnych czasu migracji analitów i wielkości sygnałów. Względne odchylenie standardowe dla czasów migracji analitów było mniejsze niż $RSD < 0,9\%$, a dla wielkości sygnału nie większe niż 2% . *Parametr ten używany jest tylko w zaleceniach USP oraz ICH.*

Tabela 7. Wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), decyzyjnej wartości granicznej (CC α) i zdolności wykrywania analitów (CC β).

Table 7. The values of limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), decision limit (CC α) and detection capability (CC β) for analytes.

Grupa leków <i>Group of drugs</i>	Leki <i>Drugs</i>	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	CCα (ng/g)	CCβ (ng/g)
Penicyliny <i>Penicillins</i>	Ampicylina	8,3	27,6	53,8	65,0
	Amoksycylina	8,1	26,9	49,2	59,2
	Penicylina G	7,4	24,6	54,9	65,4
Tetracykliny <i>Tetracyclines</i>	Chlorowodorki: tetracykliny	1,7	5,8	119	132
	oksytetracykliny	1,8	5,9	123	136
	doksycykliny	1,3	4,3	104	116
Aminoglikozydy <i>Aminoglycosides</i>	Siarczan streptomycyny	48,7	162,4	37,3	38,9
Amfenikole <i>Amphenicols</i>	Chloramfenikol	1,5	4,9	5,1	7,1
	Tiamfenikol	3,2	10,7	2,6	6,2
	Florfenikol	7,4	24,8	15,8	22,7
Linkozamidy <i>Lincosamides</i>	Chlorowodorki: linkomycyny	13,2	44,2	23,9	29,5
	klindamycyny	18,5	61,5	28,2	33,9
Sulfonamidy <i>Sulfonamides</i>	Sulfametazyna	7,3	24,2	3,3	10,1
	Sulfamerazyna	7,1	23,6	10,2	17,8
	Sulfafurazol	6,5	21,9	10,8	19,5
	Sulfametoksazol	7,0	23,2	8,9	18,4
	Sulfatiazol	7,0	23,6	18,2	27,7
Chinolony <i>Quinolones</i>	Lomefloksacyna	2,9	9,8	12,9	16,3
	Norfloksacyna	2,9	9,7	5,6	9,3
	Cyprofloksacyna	2,7	9,1	16,9	20,3
	Ofloksacyna	3,0	9,9	16,0	18,7
	Enrofloksacyna	2,5	8,5	3,8	4,1
	Cinoksacyna	2,8	9,2	3,2	3,5
Awermekтины <i>Avermectins</i>	Nifursol	9,4	21,4	2,5	3,6
Nitrofurany <i>Nitrofurans</i>	Iwermektyna	0,3	1,0	0,021	0,026

Odporność/szorstkowość metody (*Ruggedness*) szacowana jest w podobny sposób jak elastyczność metody, jednakże analizy przeprowadzane są przez dwóch różnych analityków, przy tych samych zoptymalizowanych warunkach, w różnych dniach oznaczeń.

Trwałość metody (*Stability*). Ocena trwałości analitów oceniono zarówno w roztworach standardowych, jak również w próbach biologicznych w określonych odstępach czasu. Istniało prawdopodobieństwo rozkładu oznaczanych chemioterapeutyków w trakcie przygotowania prób do analizy lub przechowywania. Wielkość sygnału pochodzącego od analitów ze świeżo przygotowanych prób i prób przechowywanych (w temp. 4°C) przez 48 godzin nie różniły się więcej niż 2%. *Konieczność badania tego parametru nie wynika z zaleceń USP i ICH.* W celu określenia stabilności analitów (test zamrażania i rozmrażania) w materiale biologicznym sporządzano trzy serie po trzy próby każda o rosnącym stężeniu analitu. Próby zamrożono (w temp. -20°C), a po upływie 1. oraz 3. miesięcy rozmrażano i oznaczano w nich zawartość substancji leczniczych. Stabilność obliczono na podstawie stosunku ilości analitów oznaczonych w próbach po kolejnych rozmrożeniach do ilości dodanej na początku badań. Po 1 miesiącu przechowywania minimalna zawartość chemioterapeutyków nie była niższa niż 95,4%, a po 3 miesiącach nie niższa niż 92,1% w stosunku do początkowo oznaczonych wartości. Największą trwałość z badanych grup leków wykazywały sulfonamidy i chinolony, najmniejszą leki z grupy penicylin.

Przeprowadzone testy oceny statystycznej i uzyskane wyniki potwierdziły, iż zaproponowane metody odpowiadają wymogom stawianym oznaczeniom ilościowym.

Tabela 8. Zakresy dokładności i precyzji elektroforetycznej metody oznaczania chemioterapeutyków oraz wartości odzysków całkowitych (\pm SD) ($n = 6$).Table 8. Accuracy, precision and absolute recovery values for chemotherapeutics (\pm SD) for repeated injection ($n = 6$).

Chemioterapeutyki <i>Chemotherapeutic drugs</i>	Dokładność / Accuracy (%)		Precyzja / Precision RSD (%)		Całkowite odzyski <i>Absolute recovery</i>
	Serii jednoczesnej <i>Intra-day</i>	Pomiędzy dniami <i>Inter-day</i>	Serii jednoczesnej <i>Intra-day</i>	Pomiędzy dniami <i>Intra-day</i>	
Ampicylina	97,7-103,0	97,0-103,3	3,8-8,3	3,9-12,7	77,4 \pm 3,9
Amoksycylina	99,4-103,2	96,8-104,1	3,5-8,5	3,6-10,9	79,3 \pm 3,0
Penicylina G	99,4-103,5	98,6-104,8	2,3-7,9	2,3-10,4	80,1 \pm 2,8
Chlorowodorki: tetracykliny	99,8-102,6	99,3-105,9	1,4-5,5	1,9-6,2	84,0 \pm 4,9
oksytetracykliny	99,6-102,0	99,3-103,0	2,0-4,8	2,3-6,2	80,6 \pm 5,5
doksycykliny	98,4-103,6	98,9-103,7	1,1-4,7	2,2-4,8	89,2 \pm 3,5
Siarczan streptomycyny	96,0-103,6	93,9-105,6	1,9-8,2	2,5-9,8	80,4 \pm 4,2
Chloramfenikol	95,3-108,0	98-104	2,1-8,5	4,3-14,9	85,4 \pm 6,4
Tiamfenikol	97,1-108,4	100-100,6	1,8-8,2	6,2-14,9	82,2 \pm 5,3
Florfenikol	97,8-105,6	97,8-102,8	0,9-10,7	3,0-12,7	86,5 \pm 5,7
Chlorowodorki: linkomycyny	98,4-107,2	97,5-108,0	2,3-10,4	6,1-11,7	91,2 \pm 2,2
klindamycyny	97,9-106,6	97,9-109,5	1,6-9,3	6,5-11,4	87,7 \pm 2,7
Sulfametazyna	97,5-108,5	97,1-109,0	2,2-11,8	2,8-12,0	94,5 \pm 3,5
Sulfamerazyna	93,4-101,5	92,9-103,1	2,3-12,0	2,9-12,8	92,8 \pm 3,9
Sulfafurazol	98,0-101,7	97,8-102,8	2,6-10,4	2,9-11,0	94,5 \pm 3,4
Sulfametoksazol	97,1-106,2	96,7-106,8	1,2-10,3	3,9-12,1	97,3 \pm 4,0
Sulfatiazol	95,3-101,5	95,0-104,2	1,8-10,3	3,8-12,8	86,2 \pm 4,6
Lomefloksacyna	98,6-104,2	95,6-103,4	2,5-8,1	1,6-10,3	86,4 \pm 4,5
Norfloksacyna	98,1-101,5	97,2-104,8	2,7-7,5	1,3-14,7	81,6 \pm 6,6
Cyprofloksacyna	99,1-102,6	97,9-103,6	2,9-7,6	1,5-11,8	84,5 \pm 6,6
Ofloksacyna	97,3-103,0	97,4-107,4	3,8-8,8	1,3-10,8	82,4 \pm 5,7
Enrofloksacyna	99,6-101,6	99,3-101,8	2,1-6,3	1,6-10,6	83,5 \pm 5,0
Cinoksacyna	97,4-100,9	99,2-101,3	1,7-7,0	1,0-10,7	86,6 \pm 6,4
Nifursol	96,0-103,0	94,0-104,0	2,8-9,7	3,9-11,5	82,3 \pm 4,8
Iwermektyna	99,9-106,5	99,0-106,5	1,6-9,3	2,9-9,7	83,9 \pm 1,7

5. WYNIKI ANALIZ ELEKTROFORETYCZNYCH

5.1. Wyniki testów przeprowadzonych na zwierzętach, którym podawano leki

Przydatność opracowanych metod wykorzystano do badań chemioterapeutyków w materiale biologicznym pochodzącym od zwierząt, którym aplikowano wybrane leki w dawkach terapeutycznych. Zwierzęta (drób i świnie), biorące udział w testach, otrzymywały w wodzie pitnej chemioterapeutyki w określonych dawkach na kg masy ciała (m.c.) przez okres 5 dni, ryby przez 7 dni. Następnie w odstępach kilku- i kilkunastodniowych ubijano je, pobierając stosowne tkanki. Dla każdego z badanych związków leczniczych oraz dla każdej z tkanek (wątroba, nerki, mięśnie, skóra/tłuszcz) wykonano po trzy odważki. W każdej z badanych serii analizowano dodatkowo próby kontrolne (niezawierające analitów). Tkanki jadalne poddawano procedurze oczyszczania w zależności od właściwej dla danej grupy procedury, a następnie oznaczono poziom zawartości analitów w testowanym materiale metodą CE. Wyniki analiz zebrano, jako wartości uśrednione, pochodzące od wszystkich przebadanych tkanek (tab. 9). Z uwagi na dużą liczbę wyników, tabela zawiera jedynie ich najbardziej reprezentatywną część.

Przeprowadzone testy wykazały, iż większość analizowanych tkanek pochodzących od zwierząt, którym podawano leki, zawierała pozostałości chemioterapeutyków. Zakres i odstęp czasu od chwili ostatniego podania leku były dość zróżnicowane i wynosiły od 24 godzin dla streptomycyny do 30 dni dla tiamfenikolu. Najwyższe poziomy pozostałości leku stwierdzono w tkankach świń po 24 godzinach od ostatniego jego podania. Rejestrowany poziom streptomycyny w przypadku tkanki wątrobowej dwukrotnie przekraczał wartość MRL. Niższe wartości zaobserwowano 48 godzin po ostatnim podaniu leku, jednak ilości tego antybiotyku, znalezione w tkance wątrobowej również przekraczały maksymalne dopuszczalne wartości. Natomiast w żadnej z badanych tkanek kurzych siarczan streptomycyny nie został wykryty po 5 dniach od czasu zakończenia podawania preparatu zawierającego ten lek. Innymi wolnymi od pozostałości chemioterapeutyków były tkanki cielaków i świń, którym podawano norfloksacynę oraz tkanki jadalne kur, leczonych amoksycyliną. Zaobserwowano, że poziomy badanych chemioterapeutyków sukcesywnie ulegały zmniejszeniu w miarę wydłużania czasu od ostatniego podania leku do chwili pozyskania tkanek. Chemioterapeutyki eliminowane były najszybciej z tkanki mięśniowej, natomiast najwolniej z wątroby i nerek. Najwyższe poziomy leków rejestrowano z reguły w tkankach wątrobowych. Były to stężenia często przekraczające ustalone dopuszczalne wartości MRL (np., doksycyklina w wątrobach kurzych wykryta 3 dni po zakończeniu podawania leku, tiamfenikol – we wszystkich tkankach świńskich, kurzych oraz indyczych wykryty po 10 dniach, amoksycylina – w wątrobach świń 7 dni od czasu ostatniego podania). Porównując

eliminację amoksycyliny z tkanek świń i drobiu zaobserwowano, iż proces ten zachodził o wiele szybciej u kur niż u świń.

Tabela 9. Wyniki badań pozostałości w tkankach jadalnych zwierząt, którym podawano chemioterapeutyki, okresy karencji oraz ustalone przez EU wartości MRL.

Table 9. Results of research of antimicrobial agent residues in edible animal tissues, the withdrawal periods and established MRL values in the EU.

Leki ¹ Drugs	DD ²	Zwierzęta ³ Animals	Tkanki Target tissues	MRLs (µg/kg)	Wyniki badań ⁴ Results of research (µg/kg)		
AMX	12	Kury (5 dni)	Wszystkie badane tkanki ⁵	50	5 dni p.o.		
		Świnie (10 dni)	Wątroba Pozostałe tkanki	50 50	7 dni 131 ± 12 p.o.	10 dni p.o. ⁶ p.o.	
TC, OXT, DX	35	Ryby (karasie) (21 dni)	Mięśnie	100	14 dni 105 ± 6 122 ± 6 165 ± 5	21 dni 27 ± 2 32 ± 3 49 ± 3	
DX	10	Kury (7 dni)	Mięśnie Wątroba Skóra Jaja	100 300 300 200	3 dni 90 ± 8 320 ± 22 93 ± 8 170 ± 14	7 dni p.o. 202 ± 17 p.o. 84 ± 13	14 dni p.o. 86 ± 7 p.o. p.o.
		Świnie (7 dni)	Mięśnie Wątroba Nerki Tłuszcz	100 300 600 300	7 dni 80 ± 7 145 ± 11 100 ± 7 120 ± 8	10 dni 50 ± 4 120 ± 9 p.o. 100 ± 8	
STM ⁷	75	Kury (14 dni)	Nerki Pozostałe tkanki	1000 500	5 dni p.o. p.o.		
	30	Świnie (14 dni)	Wątroba Nerki Mięśnie Tłuszcz	500 1000 500 500	24 godz. 1192 ± 22 326 ± 31 320 ± 30 117 ± 11	48 godz. 968 ± 21 267 ± 23 286 ± 20 p.o.	
TAP	50	Kury	Wątroba Mięśnie Tłuszcz	50	10 dni 397 ± 27 379 ± 24 286 ± 21	18 dni p.o. p.o. p.o.	28 dni p.o. p.o. p.o.
		Indyki	Wątroba Mięśnie Tłuszcz	50	10 dni 388 ± 32 377 ± 29 319 ± 28	18 dni p.o. p.o. p.o.	28 dni p.o. p.o. p.o.

Leki ¹ Drugs	DD ²	Zwierzęta ³ Animals	Tkanki Target tissues	MRLs (µg/kg)	Wyniki badań ⁴ Results of research (µg/kg)		
					21 dni	24 dni	30 dni
		Świnie, cielaki	Wątroba Mięśnie Nerki Tłuszcz	50	165 ± 10 128 ± 9 160 ± 12 135 ± 10	68 ± 7 49 ± 4 43 ± 4 30 ± 3	p.o. p.o. p.o. p.o.
FF ⁸	20	Indyki (21-30 dni)	Wątroba	2500	236 ± 16	159 ± 12	
			Mięśnie	100	196 ± 14	156 ± 10	
			Skóra / tłuszcz	200	149 ± 11	120 ± 8	
		Świnie, cielaki (14-30 dni)	Wątroba	2500	176 ± 11	135 ± 10	
			Mięśnie	100	76 ± 6	54 ± 5	
			Skóra / tłuszcz	200	p.o.	p.o.	
ENX ⁹	10	Indyki (10-12 dni)	Wątroba	200	10 dni 74 ± 6		
			Mięśnie	100	32 ± 3		
			Nerki	300	28 ± 2		
			Tłuszcz	100	28 ± 2		
		Kury (7-12 dni)	Wątroba	200	10 dni 78 ± 6		
			Mięśnie	100	43 ± 4		
			Nerki	300	29 ± 3		
		Tłuszcz	100	38 ± 3			
		Świnie (10 dni)	Wątroba	200	10 dni 162 ± 7		
Mięśnie	100		78 ± 6				
Nerki	300	85 ± 2					
Tłuszcz	100	40 ± 3					
NFLX	20	Świnie, cielaki	Wszystkie badane tkanki	Brak	12 dni p.o.	14 dni p.o.	
NIF ¹⁰	75	Indyki	Wątroba Nerki Mięśnie Tłuszcz	Brak	5 dni 269 ± 13 59 ± 9 177 ± 12 70 ± 10		

¹ Leki / Drugs: AMX – amoksylina (*amoxicillin*), DX – doksylicyna (*doxycycline*), ENX – enrofloksacyna (*enrofloxacin*), FF – florfenikol (*florfenicol*), NIF – nifursol (*nifursol*), NFLX – norfloksacyna (*norfloxacin*), OTC – oksytetracyklina (*oxytetracycline*), TAP – tiamfenikol (*thiamphenicol*), TC – tetracyklina (*tetracycline*), STR – streptomycyna (*streptomycin*)

² DD – Dobowa dawka leku (mg/kg m.c.) / The dose of drug with day (mg/kg of body weight)

³ Zwierzęta (okresy karencji) / *Animals (withdrawal period)*

⁴ Wyniki badań prezentują ilość dni od czasu ostatniego podania leku i znalezione poziomy leków (*Results of research present amount of day since last application of drug and their level*)

⁵ Wszystkie badane tkanki – mięśnie, wątroba, nerki, skóra / tłuszcz (*All edible tissues – muscle, kidney, liver, skin with fat*)

⁶ p.o. – poniżej granicy oznaczalności (*no detected*)

⁷ Streptomycyna oznaczana jako suma streptomycyny i dihydrostreptomycyny (*Streptomycin determined as sum of streptomycin and dihydrostreptomycin*)

⁸ Florfenikol oznaczany jako suma florfenikolu i jego metabolitu florfenikolu-aminy (*Florfenicol – sum of florfenicol and its metabolites measured as florfenicol-amine*);

⁹ Enrofloksacyna oznaczana jako suma enrofloksacyny i cyprofloksacyna (*Enrofloxacin determined as sum of enrofloxacin and ciprofloxacin*)

¹⁰ Nifursol należy do grupy kokcydiostatyków; został dopuszczony do wytwarzania i wprowadzania do obrotu na podstawie Rozporządzenia MR i RW z dn. 8-01-2003, jednakże rok później zaliczony został do substancji niedozwolonych, ze względu na jego prawdopodobne działanie teratogenne, mutagenne i genotoksyczne (Rozporządzenie MR i RW z dn. 19-04-2004).

Pozostałości wszystkich badanych tetracyklin wykryto w mięśniach karasi 14 dni od zaprzestania ich podawania. Oznaczone wartości w nieznaczny sposób przekraczały dopuszczalne normy dla pozostałości tetracyklin. Dopiero po 21. dniach poziomy tetracyklin w mięśniach ryb obniżyły się do wartości akceptowanych przez EU.

Wyjątkowo niski próg wartości MRL dla tiamfenikolu (50 µg/kg) stanowi niebagatelny problem dla hodowców, którzy aplikują tę pochodną chloramfenikolu zwierzętom, których tkanki przeznaczone są na cele konsumpcyjne. Zarejestrowane poziomy tego antybiotyku zostały przekroczone w badanych tkankach kurzych oraz indyjskich w 10 dni, a także świńskich w 21 dni od czasu ostatniego podania leku. Badania drobiu kontynuowano po 18. i 28. dniach, jednakże w żadnej badanej tkance nie wykryto tiamfenikolu w ilości przekraczającej granicę wykrywalności. Natomiast w przypadku tkanek świńskich tiamfenikol utrzymywał się zarówno po 21 i 24 dniach powyżej wartości MRL i dopiero po 30 dniach od ostatniego podania jego wartość obniżyła do poziomu poniżej LOD metody. Wyniki otrzymane dla tkanek zawierających florfenikol, enrofloksacynę i norfloksacynę nie odbiegały od poziomów spotykanych w literaturze i nie przekraczały z reguły wartości MRL. Wyjątek stanowiły tkanki mięśniowe indyków, u których w 12 i 18 dni od ostatniego podania, zaobserwowano poziom florfenikolu przekraczający ustalone wartości MRL. Pozostałe poziomy leków przeciwbakteryjnych oznaczono poniżej wielkości MRL, ustalonych dla testowanych tkanek jadalnych przez EU.

5.2. Wyniki prób tkanek jadalnych pochodzących z marketów

Wśród przebadanych prób tkankowych zakupionych w marketach na terenie Trójmiasta nie stwierdzono obecności pozostałości analizowanych leków powy-

żej granic oznaczalności dla tkanek, analizowanych opracowaną metodyką. Jedynie w mięśniach karpia zaobserwowano w obrazie elektroforetycznym śladowe ilości tetracykliny i oksytetracykliny na poziomie, który nie przekraczał granicy oznaczalności ilościowej, określonej w opracowanej metodzie (5 ng/g próby).

5.3. Badania farmakokinetyczne

Przydatność opracowanych metod elektroforetycznego oznaczania leków w materiale biologicznym potwierdzono także w przeprowadzonych badaniach farmakokinetycznych dwóch związków leczniczych, stosowanych w weterynarii: iwermektyny - na świnich i koniach oraz tiamfenikolu – na indykach. Określenie biodostępności leków stanowią jeden z podstawowych testów weryfikujących jakość opracowanej metodyki analitycznej. W badaniach przeprowadzonych na grupie 8 świń i 6 koni (obu płci) porównywano dwa preparaty iwermektyny: Ivomec premix aplikowany dożołądkowo, w jednorazowej dawce 0,1 mg/kg m.c. dla świń oraz preparat Eqvalan w postaci pasty podawanej koniom w dawce 0,2 mg/kg m.c. Badania biodostępności preparatu zawierającego tiamfenikol przeprowadzono na 12. indykach (po 6 sztuk z każdej płci), którym podawano lek w dawce 30 mg/kg m.c. zarówno dożylnie, jak i dożołądkowo. Krew do badań pobierano w określonych odstępach czasu, zachowując do analizy osocze do badań poziomu iwermektyny, a surowicę do badań tiamfenikolu. Stężenia leków oznaczano zweryfikowanymi metodami elektroforetycznymi przy użyciu aparatu do elektroforezy kapilarnej P/ACE 2100. Parametry farmakokinetyczne wyznaczono przy pomocy program WinNonLin (version 4,01) przyjmując model niekompartmentowy. Wartości C_{max} (maksymalnego stężenia leku) oraz t_{max} (czasu, w jakim stężenie to jest osiągnięte) odczytywano bezpośrednio z wyznaczonej krzywej zmian stężenia leku w zależności od czasu. Ze względu na możliwość ustalenia zarówno przedziału czasu pomiędzy kolejnymi aplikacjami leku, jak i czasu po jakim związek zostanie usunięty z organizmu istotnym było określenie okresu półtrwania ($T_{0,5}$). Do całkowania $AUC_{0-\infty}$ (całkowitego pola powierzchni pod krzywą) stanowiącego sumę powierzchni pól wyznaczonych eksperymentalnie (AUC_{0-t}) oraz tzw. pola resztkowego ($AUC_{t-\infty}$) zastosowana została metoda Purvesa [66]. Za istotne przyjęto te różnice, dla których poziom istotności (p) nie przekraczał 0,05. Wartości wyznaczonych parametrów farmakokinetycznych przedstawiono w tab. 10.

Pomimo, iż proces eliminacji iwermektyny zachodził szybciej u świń niż u koni, rezultaty badań wykazały brak znaczących różnic pomiędzy parametrami wyznaczonymi dla obu testowanych gatunków zwierząt. Wartości $T_{0,5}$, średniego czasu przebywania leku w organizmie (MRT) oraz objętości dystrybucji w stanie stacjonarnym (V_{dss}) były większe u koni niż u świń, co może tłumaczyć dłuższy efekt farmakologiczny. Różnice w analizowanych parametrach na po-

ziomie ufności 95% były jednak nieistotne. W przypadku testowanych indyków wyznaczone parametry farmakologiczne posłużyły ocenie biodostępności preparatu podanego dożołądkowo, której wielkość oszacowano na 65,4%. Wartości te nie odbiegały od stopnia biodostępności stosowanych preparatów tiamfenikolu, przytaczanych w literaturze dla owiec (60%) [47], czy dla królików (64,2 %) [1]. Podawana dawka 30 mg/kg m.c. dla indyków była w stanie zagwarantować osiągnięcie wartości MIC dla większości wrażliwych mikroorganizmów.

Tabela 10. Najważniejsze parametry farmakokinetyczne wyznaczone dla ivermektyny po podaniu dożołądkowym dla świń i tiamfenikolu po dożylnym i dożołądkowym dla indyków; (średnione wartości \pm SD).

Table 10. Mean pharmacokinetic parameters for ivermectin after intragastric administration for swine and horses and for thiamphenicol after intravenous and intragastric administration for turkeys; (values are mean \pm SD).

Parametr <i>Parameter</i>	Ivermektyna / <i>Ivermectin</i>		Tiamfenikol / <i>Thiamphenicol</i> (indyki / <i>turkeys</i>)	
	premiks / <i>premix</i> 0,6 % świnie / <i>swine</i>	pasta / <i>paste</i> 1,87 % konie / <i>horses</i>	podanie dożylne <i>intravenous</i> <i>application</i>	podanie dożo- łądkowe <i>intra-</i> <i>gastric applica-</i> <i>tion</i>
AUC _{0-t}	931,3 \pm 100,0	866,7 \pm 88,4	172,7 \pm 38,4	104,8 \pm 30,6
AUC _{0-∞}	1084,2 \pm 149,0	1222,2 \pm 245,5	178,9 \pm 40,7	116,9 \pm 30,6
T _{max} (h)	24; (24 - 24)	24; (24 - 24)	–	1,42 \pm 0,20
C _{max} (μ g/ml)	16,4 \pm 0,5	18,3 \pm 1,8	–	15,23 \pm 3,24
K _{el} (1/h)	0,028 \pm 0,01	0,023 \pm 0,008	0,19 \pm 0,08	0,10 \pm 0,03
T _{0,5} (h)	27,7 \pm 9,8	33,5 \pm 9,9	4,19 \pm 1,58	7,40 \pm 2,09
V _z (l)	–	–	8,51 \pm 3,41	26,14 \pm 13,23
V _{dss} (l)	0,34 \pm 0,03	5,7 \pm 0,5	–	–
MRT (h)	54,1 \pm 8,2	58,5 \pm 12,3	2,88 \pm 1,18	6,54 \pm 0,51
F (%)	–	–	–	65,4

Wielkości AUC dla ivermektyny wyrażono w ng h/ml, natomiast dla tiamfenikolu w μ g h/ml. (*AUC values has been expressed in ng h/ml, whereas for thiamphenicol in μ g h/ml*).

AUC_{0-t} – pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku, ekstrapolowane do nieskończoności (*area under the curve extrapolated to infinity*); AUC_{0-∞} – pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku, ekstra-polowane do nieskończoności (*area under the curve up to the last time (t)*); T_{max} (h) – czas, po jakim osiągnane jest maksymalne stężenie leku (*the time to reach peak concentration*); C_{max} (μ g/ml) – maksymalne stężenie leku (*the maximum plasma concentration*); K_{el} (1/h) – stała eliminacji (*the elimination rate constant*); T_{0,5} (h) – biologiczny okres półtrwania (*the apparent elimination half-live*); V_z (l) – objętość dystrybucji (*volume of distribution*); V_{dss} (l) – objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym (*volume of distribution at the steady state*); MRT (h) – średni czas trwania leku w organizmie (*mean residence time*); F (%) – biodostępność (*absolute bioavailability*).

5.4. Okresy karencji

Badania pozostałości chemioterapeutyków w tkankach jadalnych zwierząt, mleku, jajach oraz badania farmakokinetyczne mogą służyć do wyznaczenia okresów karencji dla leków, które podawane są zwierzętom w trakcie chowu. Stopień zanikania leków z tkanek w porównaniu z ustalonymi wartościami MRL umożliwia określenie czasu, jaki powinien upłynąć od zaprzestania ich podawania do chwili pozyskania organów do celów konsumpcyjnych. Wielkości okresów karencji są zróżnicowane dla konkretnych związków i zależą głównie od

stopnia ich kumulacji w poszczególnych tkankach (dla badanych leków okresy karencji przedstawiono w tab. 9). Wyniki analiz prób, pochodzących z tkanek jadalnych drobiu, świń i ryb są zgodne z okresami karencji proponowanymi przez EU. Wyjątek stanowi jedynie tiamfenikol, którego pozostałości przekraczające wartości MRL obserwowano w tkankach świń jeszcze po 24 dniach od ostatniego podania. Dlatego organizacje zajmujące się jakością żywności (jak podaje raport FAO/WHO) proponują wydłużyć okres karencji dla pochodnych chloramfenikolu (tiam- i florfenikolu) do 30 dni. Dla niektórych leków brak jest spójności w aspekcie okresu karencji dla zwierząt. Na przykład, dla enrofloksacyliny najczęściej podawanym okresem jest okres 10-dniowy, jednakże spotkać można w literaturze okresy karencji znacznie różniące się: od 5 dni na mleko kozie do 12 czy 14 dni na tkanki jadalne drobiu, bydła i owiec.

6. Dyskusja

Różnorodność chemioterapeutyków mogących znaleźć się w tkankach jadalnych pochodzenia zwierzęcego sprawia, iż dobór odpowiednich procedur przygotowania prób do analizy oraz optymalnych warunków detekcji i separacji elektroforetycznej jest zagadnieniem złożonym i wymaga nie tylko przeprowadzenia wszechstronnych badań, ale również zaprojektowania odpowiedniej procedury analitycznej.

6.1. Trudności napotymane przy analizie chemioterapeutyków w materiale biologicznym

Oznaczanie ilościowe substancji leczniczych w próbach biologicznych sprawia szereg trudności. Powodów jest kilka:

1. Analizowane próby stanowią konglomerat różnych pod względem fizykochemicznym składników.
2. Poziomy chemioterapeutyków w próbach biologicznych bywają zróżnicowane (obejmując zakres piko-, nano- oraz mikrogramowy), a wykrywanie ich w niskich stężeniach (mikrośladowych i ultramikrośladowych) ograniczone jest możliwościami detekcji najczęściej stosowanych detektorów.
3. Anality są najczęściej silnie związane ze składnikami matrycy i wymagają efektywnej izolacji.
4. Niektóre z oznaczanych substancji są trudno rozpuszczalne w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych, co stanowi często przeszkodę w opracowaniu jednolitej dla wszystkich oznaczanych leków procedury postępowania analitycznego.
5. Istnieje prawdopodobieństwo występowania produktów degradacji lub metabolitów substancji macierzystych.

Opracowując metodykę, należy mieć na uwadze fakt, iż kolejne etapy przygotowania mogą być przyczyną utraty pewnej ilości oznaczanych leków, jak również mogą stanowić źródło dodatkowych, niezamierzonych niekiedy zanieczyszczeń. Opracowując metodykę oznaczania chemioterapeutyków podjęto próby zredukowania ilości operacji i procesów wymaganych do przygotowania prób, przy równoległym zmniejszeniu ilości zużywanych rozpuszczalników organicznych.

6.2. Optymalizacja metody w aspekcie właściwości fizykochemicznych analitów

Przy opracowaniu metodyki oznaczania, należało uwzględnić odrębne właściwości poszczególnych grup chemioterapeutyków, głównie ich średnio-

polarny lub amfoteryczny charakter. Związki należące do grupy penicylin, znane są ze swej labilności i zdolności do inaktywacji pod wpływem różnych czynników. Rozkład hydrolytyczny najbardziej wrażliwego fragmentu ich struktury (pierścienia β -laktamowego) może być spowodowany nie tylko zbyt kwaśnym bądź zasadowym pH środowiska, lecz także działaniem enzymów, amin, stężonych roztworów alkoholi oraz jonami metali ciężkich. Ponadto, związki o charakterze utleniającym i redukującym również destrukcyjnie wpływają na antybiotyki należące do penicylin, rozkładając ich pierścień tiazolidynowy. Dlatego dobranie odpowiednich warunków zapewniających trwałość penicylin zarówno w procesie ich izolacji, jak i separacji elektroforetycznej okazało się kluczowym elementem opracowania metody oznaczania tej grupy antybiotyków. Największą trwałość badane penicyliny wykazywały w zakresie pH 6,5 – 7,5, lecz najefektywniejsze warunki rozdzielania elektroforetycznego uzyskano w bardzo wąskim zakresie pH (7,3 – 7,4).

W procesie izolacji penicylin i tetracyklin z tkanek w charakterze jednego z czynników izolujących użyto środka chelatującego, który wiązał obecne w roztworze jony metali wielowartościowych. Zastosowanie 0,05 M roztworu EDTA- Na_2 zdecydowanie zwiększyło wartości otrzymanych odzysków tych dwóch grup leków, zwłaszcza tetracyklin znanych ze swych zdolności do tworzenia kompleksów. Kolejnym problemem pojawiającym się przy oznaczaniu tetracyklin jest ich predyspozycja do ulegania w roztworach słabo kwaśnych procesowi epimeryzacji, polegającym na zamianie pozycji grupy dimetyloaminowej i atomu wodoru przy C-4, które ułożone w odwrotnym porządku niż w postaci naturalnej, tworzą mniej czynną formę „epi”. Warto zaznaczyć, że w badaniach pozostałości leków należących do grupy tetracyklin wymagane jest oznaczenie sumy obu form strukturalnych. Dwie grupy hydroksylowe (-OH) przy C-3 i C-10 oraz grupa dimetyloaminowa $[(-\text{N}(\text{CH}_3)_2)]$ w pierścieniu „A” czynią tetracykliny związkami o charakterze amfoterycznym, co stwarza kolejną trudność w opracowaniu ich metody ilościowego oznaczania. Z uwagi na ich największą trwałość w roztworach kwaśnych (pH 2,5) oraz brak zdolności tworzenia chelatów w pH < 3,0 do analizy elektroforetycznej tej grupy związków wybrany został bufor o niskiej wartości pH (pH = 2,7).

Stosunkowo dużą stabilność w szerokim zakresie wartości pH i temperatur wykazywał siarczan streptomycyny. Jednak grupa aldehydowa w cząsteczce streptomycyny może ulegać katalicznemu uwodornieniu do pierwszorzędowej grupy alkoholowej, tworząc bardziej trwałą i mniej toksyczną dihydrostreptomycynę. Ze względu na fakt, iż w badaniach pozostałości wymagane jest oznaczenie sumy obu związków, skład i pH buforu elektrolitycznego dobrano w taki sposób, by oba związki wykazywały identyczny czas migracji, a otrzymywany sygnał pochodził od sumy siarczanu streptomycyny i dihydrostreptomycyny. Podobnie jak większość aminoglikozydów, streptomycyna i jej siarczan uważane są za słabo wchłaniane (ok. 10%) z przewodu pokarmowego. Interesującym wydał się (stosunkowo wysoki, jak dla leku powszechnie uznanego za trudno

wchłaniany) oznaczony poziom pozostałości siarczanu streptomycyny w większości analizowanych tkanek świń, którym aplikowano ten antybiotyk w wodzie pitnej. Badania przeprowadzone na szerszą skalę z pewnością pozwoliłyby wyjaśnić, rejestrowany podczas testów, wysoki poziom streptomycyny w tkankach jadalnych zwierząt, którym podawano ten antybiotyk w trakcie chowu.

Amfenikole (pochodne chloramfenikolu) stanowiły kolejną grupę wymagającą szczególnej uwagi przy określaniu warunków analitycznych do ich jednoczesnego oznaczania. Chloramfenikol i tiamfenikol posiadają grupy hydroksylowe (-OH) pozwalające na tworzenie z jonami boranowymi kompleksów obdarzonych ładunkiem. Florfenikol natomiast, pozbawiony takich możliwości strukturalnych, pozostaje niejonizowany nawet w dość szerokim zakresie pH (2 – 12) [29], w jakim operuje elektroforetyczny układ separacyjny. Kiedy cząsteczka nie ulegała jonizacji lub stosunek ładunku do masy kilku analitów jednocześnie rozdzielanych był prawie identyczny, koniecznym było zastosowanie micelarnej elektroforezy kapilarnej. Analizy związków należących do amfenikoli, sulfonamidów i linkozamidów udowodniły, że dodatek SDS w odpowiednim stężeniu podnosi selektywność i efektywność rozdzielania elektroforetycznego. Dla tych związków najefektywniejszy proces rozdzielania zachodził przy użyciu anionowego związku powierzchniowo-czynnego (SDS) w stężeniu 25 mM.

Chinolony stanowią kolejną grupę związków o charakterze amfoterycznym, których grupa karboksylowa przy C-3 warunkuje właściwości kwasowe związków, a rodnik 7-piperazyńlochinolinowy decyduje o cechach zasadowych, co skutkuje ich występowaniem w wodnych roztworach w formie, anionów, kationów lub jonów obojnych. Wartości pKa chinolonów wahają się w granicach od (pKa₁) 5,5 – 6,3 dla grupy karboksylowej do (pKa₂) 7,6 – 9,3 dla ugrupowania aminowego [4, 46]. W roztworach o pH niższym niż pKa₁ chinolony występują w formie kationów, natomiast w pH wyższym niż ich pKa₂ – w formie anionów. W przedziale pomiędzy tymi wartościami najczęściej przybierają postać jonów obojnych, stąd w celu podniesienia selektywności rozdzielania elektroforetycznego zastosowano dodatek do buforu związku powierzchniowo czynnego, Tris-(hydroksymetylo)-aminoetanu (Tris), który umożliwił jednoczesne rozdzielanie sześciu chinolonów.

Oznaczane sulfonamidy, podobnie jak chinolony, cechuje amfoteryczny charakter i posiadanie dwóch zakresów pKa (2 – 3,5 oraz 5,4 – 7,7) [4, 38]. Pomimo możliwości ich rozdzielania przy użyciu słabo kwaśnych buforów elektrolitycznych (pH = 6,85), znacznie lepszą efektywność separacji uzyskano przy udziale MEKC z zastosowaniem SDS. Ponadto, celem uwydatnienia zdolności rozdzielczych układu, wprowadzono do buforu elektrolitycznego dodatek modyfikatora organicznego (20%; v/v), który wpłynął na zmniejszenie wielkości EOF i pozwolił na jednoczesną separację wszystkich oznaczanych sulfonamidów.

6.3. Optymalizacja warunków izolacji analitów z materiału biologicznego

Warunki postępowania analitycznego dobierano w taki sposób, by umożliwić efektywne oznaczenie poszczególnych grup leków możliwie najprostszym sposobem oraz w jak najkrótszym czasie. Ponadto, przy opracowaniu procedur starano się uwzględnić też aspekty ekonomiczne i ekologiczne analizy, głównie przez ograniczenie zużycia rozpuszczalników organicznych. Najczęściej spotykanym w literaturze sposobem ekstrakcji leków z materiału biologicznego jest homogenizacja w obecności rozpuszczalników organicznych bądź roztworów buforowych. Pomimo, iż stosowane w tym celu niepolarne rozpuszczalniki organiczne były bardzo efektywne, to w trakcie procesu dochodziło do współekstrakcji wielu trudnych do usunięcia lipidów, powodując tworzenie mało klarownych ekstraktów. Znacznie więcej zalet i większą przydatność w procesie izolacji średnio-polarnych i amfoterycznych chemioterapeutyków wykazały polarne rozpuszczalniki organiczne (zwłaszcza acetonitryl), które w połączeniu z TCA okazały się efektywnym czynnikiem nie tylko denaturującym białka, lecz również skutecznie izolującym anality z matrycy biologicznej. Natomiast 3% acetonitrylowy roztwór TCA okazał się najbardziej skuteczny przy oznaczaniu chinolonów i penicylin. Zbyt szybki proces deproteinizacji, w trakcie izolacji pozostałych grup leków, powodował adsorpcję związków na powierzchni denaturowanych cząsteczek, niekorzystnie wpływając na efektywność odbiałczenia [45]. Wzrost zawartości TCA w roztworze acetonitrylu powodował zwiększenie ilości współizolujących się związków, nie poprawiając zauważalnie skuteczności procesu ekstrakcji. Zastosowanie pojedynczych czynników odbiałczających nie zawsze dawało w pełni satysfakcjonujące wartości odzysków analitów. Dlatego przy ekstrakcji niektórych grup chemioterapeutyków posłużono się dodatkowymi odczynnikami, tworząc mieszaniny ekstrakcyjne, które w znaczący sposób poprawiały skuteczność procesu. Zdecydowany wzrost wartości odzysków zaobserwowano stosując roztwór EDTA- Na_2 przy homogenizacji prób zawierających tetracykliny i penicyliny. Ponadto, obniżenie wartości pH mieszaniny ekstrakcyjnej, poprzez zastosowanie buforu McIlvaine'a (pH 4,0), pozwoliło zwiększyć wartości odzysków dla tetracyklin oznaczanych w mięśniach ryb. Obecność dodatkowego rozpuszczalnika – metanolu – w mieszaninie ekstrakcyjnej okazała się pomocna przy oznaczaniu iwermektyny w osoczu krwi koni i świń.

Po zestawieniu różnych czynników odbiałczających próby i wybraniu optymalnych metod izolacji dla poszczególnych grup leków podjęto działania w kierunku poprawy efektywności przez powtarzanie homogenizacji nowymi porcjami odczynników. Jednakże wielokrotne (dwu- lub trzykrotne) przeprowadzanie ekstrakcji nie wykazało istotnego wpływu na poprawę wartości odzysków dla oznaczanych grup związków.

Przed przystąpieniem do dalszej analizy otrzymane ekstrakty odparowywano do sucha. Z uwagi na możliwość zmniejszenia się odzysków analitów w trakcie odparowania czynnika ekstrakcyjnego, próby umieszczono na łaźni wodnej o temperaturze nieprzekraczającej 45°C. Proponowany przez niektórych autorów [44] dodatek trudno lotnych cieczy (np. alkoholu izopropylowego) nie miał wpływu na wielkości odzysku podczas tego etapu. Straty analitów podczas odparowania warstwy acetonitrylowej z zastosowaniem wspomnianych warunków wynosiły od 2 do 6%.

Zaproponowana procedura oczyszczania polegająca na prostej jednostopniowej ekstrakcji leków z prób biologicznych okazała się być wystarczająca jedynie w przypadku oznaczania jednego leku z danej grupy (siarczanu streptomycyny, iwermektyny, tiamfenikolu, nifursolu) oraz w przypadku oznaczeń tetracyklin w tkance mięśniowej ryb. Dla pozostałych grup chemioterapeutyków procedura analityczna wymagała wprowadzenia etapu oczyszczania ekstraktu.

6.4. Optymalizacja warunków oczyszczania ekstraktu

Wstępnie przeprowadzony, klasyczny sposób oczyszczania ekstraktów, polegający na ekstrakcji typu ciecz – ciecz (LLE) spełniał swoje zadanie, ale w ograniczonym zakresie. Z uwagi na możliwość tworzenia się emulsji, brak powtarzalności w otrzymywanych wynikach oraz znaczne zużycie rozpuszczalników organicznych, ekstrakcja typu LLE najczęściej nie zdaje egzaminu w rutynowych badaniach pozostałości leków w żywności i tkankach jadalnych pochodzenia zwierzęcego. Znacznie sprawniejsza i skuteczniejsza do oczyszczania ekstraktów okazała się ekstrakcja do fazy stałej (SPE), polegająca na zaadsorbowaniu na stałym złożu składników próby i następnie ich wymywaniu (elucji) wybranym rozpuszczalnikiem. Wstępnie zbadano przydatność kilku rodzajów sorbentów, przeprowadzając testy przy użyciu wypełnień oktadecylowych na żelu krzemionkowym oraz złożów o charakterze polarnym. Wadą użycia sorbentów o charakterze polarnym okazała się konieczność przeprowadzania analitów z fazy polarnej do niepolarniej, co dodatkowo komplikowało procedurę oczyszczania. Oznaczone chemioterapeutyki stosunkowo dobrze zatrzymywane były na wypełnieniu oktadecylowym, natomiast endogenne składniki matrycy biologicznej nie były zbyt mocno związane. Uwzględniając większe powinowactwo analitów do wypełnienia kolumny, w porównaniu z oddziaływaniami pomiędzy analitami i matrycą biologiczną, do badań pozostałości leków wybrano kolumny z fazą odwróconą z wypełnieniem oktadecylowym (RP – C18). Procedura oczyszczania ekstraktów, zawierających anality przy użyciu SPE, wykazała nie tylko wyższą skuteczność (w porównaniu z LLE) przy usuwaniu substancji balastowych, pozostałych po wstępnej izolacji, lecz również okazała się przydatną metodą wzbogacenia składników próby. Wartości odzysków analitów uzyskanych po SPE przekraczały 80%, a uzyskane stężenia pozwalały na

ilościowe oznaczenia analitów na poziomach znacznie niższych niż ustalone wartości MRL. Ponadto, istotną zaletą zastosowania SPE było niewielkie zużycie rozpuszczalników organicznych, większa selektywność separacji i powtarzalność wyników analiz oraz stosunkowo krótki czas przygotowania próbek.

6.5. Detekcja i separacja elektroforetyczna

Do oznaczania ilościowego leków przeciwbakteryjnych wykorzystana została ich zdolność do adsorbowania światła UV. Poszczególne grupy chemioterapeutyków wykazywały maksimum absorpcji przy różnych długościach fal (od 200 do 280 nm). Dokonano wstępnej identyfikacji związków, analizując próby w poszczególnych charakterystycznych dla nich zakresach. Zdolność detekcji w zakresie krótkofalowym wykazywało kilka grup leków, co stwarzało teoretyczne możliwości przeprowadzenia jednoczesnej separacji mieszaniny tych związków. Jednak wybrane do analizy bufony elektrolityczne nie zawsze pozwalały na rozdzielanie mieszanin tych leków, ze względu na zróżnicowane właściwości (głównie szeroki zakres wartości pKa) analitów. Natomiast było możliwe wspólne oznaczanie amfenikoli, linkozamidów i sulfonamidów, dla których wybrano MEKC z buforem elektrolitycznym o pH 9,3 oraz tetracyklin i siarczanu streptomycyny doskonale rozdzielanych przy pH 2,5 – 2,7. Możliwość oznaczania przy krótkich długościach fal wykazywały również penicyliny, jednak całkowita ich separacja elektroforetyczna wymagała wąskiego, odmiennego od innych grup leków, zakresu wartości pH (pH 7,3 – 7,4). Teoretycznie, przy długości światła UV 280 nm istnieje szansa jednoczesnego oznaczenia chinolonów i tetracyklin, jednak podejmowane próby ustalenia wspólnego buforu, kończyły się niepowodzeniem, gdyż sygnały dla tych związków występowały w postaci słabo rozdzielonych lub niesymetrycznych pików.

Próby biologiczne (takie jak surowica, osocze krwi, a zwłaszcza tkanki jadalne zwierząt) zawierają szereg różnego rodzaju komponentów białkowych i lipidowych, które w istotny sposób mogą utrudniać oznaczanie substancji leczniczych. Celem zminimalizowania możliwości interferencji pików analitów z pikami matrycy biologicznej koniecznym było zastosowanie takich procedur, które skutecznie usunęłyby jak największą ilość endogennych substancji białkowych. Pomimo, iż podejmowano działania, mające na celu otrzymanie ekstraktów praktycznie pozbawionych komponentów pochodzących z matrycy biologicznej [15, 44, 45, 60], to opisane w literaturze procedury dotyczą jedynie oznaczeń techniką HPLC. Wieloetapowa i pracochłonna procedura otrzymania ekstraktów prób biologicznych staje się jednak mało użyteczna w rutynowych badaniach, monitorujących pozostałości leków przeciwbakteryjnych. Pomimo, iż CE jest uznaną techniką farmakopealną, dotychczas niewiele pojawiło się aplikacji z jej użyciem, dotyczących oznaczania chemioterapeutyków w materiale biologicznym. Porównując oznaczanie prób biologicznych różnymi technikami

separacyjnymi, można wnioskować, iż kapilary stosowane w elektroforezie znacznie lepiej tolerują wielkocząsteczkowe substancje balastowe niż kolumny chromatograficzne, których efektywność i wydajność spada w miarę przeprowadzania kolejnych separacji.

Badania wykazały ponadto, że próby analizowane techniką CE (w porównaniu z HPLC) nie wymagały tak skrupulatnego usunięcia wszystkich substancji balastowych z kilku powodów. Po pierwsze, separacja przy udziale CE przeprowadzana jest najczęściej w pustych kapilarach, pozbawionych jakiegokolwiek adsorbentu, stąd wielkocząsteczkowe substancje balastowe nie są niczym zatrzymywane, z uwagi na brak wypełnień tradycyjnie używanych w HPLC. W efekcie tego, sprawność kapilar stosowanych w CE w trakcie oznaczeń seryjnych, nie ulega tak znacznemu obniżeniu, jak kolumn przy oznaczeniach chromatograficznych. Po drugie, wysoka wydajność oraz rozdzielczość tej techniki umożliwia rozdzielenie wielu komponentów, zawartych w próbce w taki sposób, by ich czasy migracji nie kolidowały ze sobą. W trakcie analizy elektroforetycznej rozdzielaniu ulegały nie tylko anality, lecz także część wielkocząsteczkowych substancji balastowych. Po trzecie, opisywany często w literaturze problem adsorpcji substancji białkowych na wewnętrznej powierzchni ścian kapilary, może być eliminowany przez zastosowanie skutecznego systemu płukania. Odpowiednio dobrany układ roztworów przemycających kapilarę po zakończeniu każdej separacji pozwalał na usunięcie endogennych substancji balastowych z wnętrza kapilary w ciągu krótkiego cyklu płukania (1 – 2 minut).

6.6. Wpływ pH i stężenia buforu na separację analitów

Opracowując skład i pH buforu elektrolitycznego dla prób biologicznych, uwzględniano nie tylko możliwości separacyjne, lecz także przydatność do ilościowego oznaczania analitów. Wpływ wartości pH elektrolitu na oznaczane związki należy rozpatrywać w kilku płaszczyznach. Z jednej strony, w miarę wzrostu pH elektrolitu rośnie wielkość przepływu EOF, poprzez zmianę wartości potencjału zeta mierzonego przy wewnętrznej ścianie kapilary. Z drugiej strony, wartość pH buforu oddziałuje w istotny sposób na wielkość stopnia dysocjacji analitów. Natomiast wielkość stosunku ładunku do masy decyduje o ich prędkości elektroforetycznej, a rodzaj ładunku (ujemny bądź dodatni) wpływa na kierunek ich migracji (do anody lub katody). Zestawiając wszystkie te oddziaływania, okazuje się, że pH buforu posiada wpływ nie tylko na szybkość przemieszczania się analitów, a tym samym na ich czasy migracji, ale także na kolejność ich pojawiania się w okienku detektora. Dobierając odpowiednią wielkość pH buforu ustalono kolejność i czasy migracji analitów w taki sposób, by piki oznaczanych chemioterapeutyków nie kolidowały z pikami właściwymi dla endogennych substancji balastowych oraz związków pełniących rolę wzorców wewnętrznych. Do badań chemioterapeutyków w materiale biologicznym

z zastosowaniem techniki CZE wybrano bufony boranowo-fosforanowe, zapewniające szeroki zakres możliwości operowania wielkościami pH (2,5 – 9,3). W technice MEKC najbardziej użytecznym okazał się bufor boranowy, który w połączeniu ze związkami powierzchniowo-czynnymi pozwolił na separację analitów (zwłaszcza tych o charakterze amfoterycznym) w stosunkowo krótkim czasie (do 9 minut).

O wartości przepływającego prądu decyduje kilka czynników, takich jak: długość i średnica kapilary, siła jonowa elektrolitu oraz przykładane do układu napięcie. Wielkości wspomnianych parametrów dobierano w taki sposób, by generowane natężenie prądu nie przekraczało 100 μ A. Najistotniejszy wpływ na intensywność sygnału miało jednak stężenie wszystkich składników elektrolitu separacyjnego. Przeprowadzono analizy elektroforetyczne w zakresie stężeń od 10 do 75 mM każdego z komponentów elektrolitu, wykazując iż najbardziej optymalnym okazało się stężenie w zakresie 10 – 25 mM. Odpowiedni dobór wielkości tych stężeń gwarantował uzyskanie stabilności linii podstawowej, symetrycznego kształtu oraz odpowiedniej wysokości i ostrości pików.

6.7. Rola MEKC i związków powierzchniowo-czynnych

Rozdzielenie wszystkich analizowanych substancji leczniczych w obrębie jednej grupy chemicznej przy użyciu CZE nie zawsze było możliwe. Do analizy amfenikoli, linkozamidów i sulfonamidów zastosowano MEKC, pozwalająca na separację analitów zarówno obojętnych, jak i tych naładowanych (zjonizowanych). Do realizacji tego celu posłużyły jonowe związki powierzchniowo-czynne, z których SDS, okazał się najbardziej użyteczny. Jego dodatek umożliwił rozdzielenie wszystkich substancji leczniczych w obrębie analizowanej grupy, dzięki utworzeniu miceli, stanowiących amfifilowe kompleksy. Anality o charakterze obojętnym mogły ulegać podziałowi między dwie fazy: wodną i pseudostacjonarną (tworzoną przez te właśnie micelle), wykazując znacznie większe powinowactwo do ich hydrofobowego wnętrza niż do buforu separacyjnego. Zróznicowanie stopnia podziału w obu fazach powodowało powstanie różnic w prędkościach migracji. Przy oznaczaniu substancji obojętnych wzrost stężenia miceli pociągał wzrost współczynnika pojemnościowego, co automatycznie zwiększało odległości pomiędzy oznaczanymi substancjami. Stąd istotnym było, żeby stężenie środka powierzchniowo-czynnego przekraczało CMC. Celem określenia optymalnej ilości surfaktantu przeprowadzono analizy elektroforetyczne amfenikoli, linkozamidów i sulfonamidów przy udziale 10 mM buforu boranowego i SDS w zakresie stężeń 10 – 100 mM. Optymalne warunki rozdzielania elektroforetycznego dla każdej z analizowanych grup związków uzyskano przy 25 mM stężeniu SDS. Dodanie do buforu związków powierzchniowo-czynnych okazało się również przydatne w przypadku, kiedy piki oznaczanych substancji, pomimo zmiany pH elektrolitu, interferowały z pikami tych

substancji balastowych, których nie udało się usunąć w trakcie procedury oczyszczania próby.

6.8. Rozwiązania analityczne zastosowane w pracy

Zjawisko adsorpcji białek na wewnętrznej ścianie kapilary

Jedną z przyczyn zmniejszenia się powtarzalności wyników i pogorszenia rozdzielczości układu elektroforetycznego są interakcje analitów i białek z wewnętrzną ścianą kapilary. Dotyczą one głównie analiz protein lub prób zawierających komponenty białkowe (a w szczególności prób biologicznych tj. osocze i surowica krwi oraz tkanki jadalne zwierząt). Interakcje te w znaczący sposób mogą wpływać na obniżenie sprawności całego układu separacyjnego. Jednym ze sposobów zapobiegania temu zjawisku jest tworzenie połączeń kowalencyjnych reszt silanolowych z polimerami hydrofilowymi (typu glikol polietylenowy lub poliakrylamid), które tworząc powłokę na wewnętrznej ścianie kapilary skutecznie neutralizują ujemny ładunek na niej zgromadzony. Zmiana właściwości kapilary jest również możliwa przez używanie buforów o skrajnych wartościach pH. Jednakże rozwiązania takie nie zawsze są możliwe do wykonania ze względu na specyficzne właściwości analitów. Elementem, który w znaczący sposób poprawił sprawność układu i powtarzalność oznaczeń było wprowadzenie dodatkowego (kilkunastosekundowego) płukania metanolem całej kapilary, pomiędzy kolejno następującymi po sobie separacjami. Analizy elektroforetyczne, zwłaszcza te przeprowadzone na próbach tkankowych, udowodniły, że etap ten był konieczny, by uzyskać wymaganą powtarzalność wyników, zarówno tych dotyczących czasów migracji analitów, jak i wielkości rejestrowanych sygnałów. Jednakże w przypadku, kiedy zabiegi te nie dawały oczekiwanego efektu lub występowały dalsze zakłócenia w powtarzalności analiz elektroforetycznych, czas przepłukiwania metanolem wydłużano do 2 min oraz wprowadzono dodatkowe płukanie 0,1 M roztworem kwasu solnego. Taki tok postępowania (nie opisywany dotychczas w literaturze) umożliwił usunięcie większości substancji, będących źródłem interakcji powstających na wewnętrznej powierzchni kapilary. Zminimalizowanie tych oddziaływań pozwoliło na uzyskanie powtarzalnych czasów migracji analitów, których względne odchylenia standardowe nie przekraczało 1,2% (RSD < 1,2%). Te same analizy udowodniły również, że dzięki przepłukiwaniu kapilary metanolem, powtarzalność wielkości sygnałów umożliwiła osiągnięcie wysokich wartości współczynników korelacji liniowej ($r \geq 0,999$), podczas gdy bez stosowania tego etapu wartości te wahały się od 0,994 do 0,998.

Tetraboran sodu jako podstawowy składnik buforu elektrolitycznego

Praktycznie wszystkie analizy przeprowadzone została przy użyciu buforów, którym jednym ze składników był tetraboran sodu (boraks). Stwierdzono, że jego obecność nawet w kilkumolowym stężeniu wykazuje zdolność kompleksowania analitów, przez co nie tylko podnosi selektywność rozdzielania, ale również niejednokrotnie poprawia granicę oznaczalności. Podobne wnioski opisano w literaturze [91], opierając się na wąskiej grupie tetracyklin. Ponadto, zastosowanie innych buforów, jako podstawowe (węglanowego czy cytrynowego) może powodować hydrolizę (jak w przypadku oznaczania chloramfenikolu) [29] lub tworzenie niesymetrycznych pików w zapisie elektroforetycznym.

Rozcieńczony roztwór tetraboran sodu – rozpuszczalnikiem dla prób

Procedury przygotowania prób biologicznych do analizy zostały ułożone w taki sposób, by końcowy roztwór próby podawanej do układu cechował się zdecydowanie niższym przewodnictwem niż bufor separacyjny, wypełniający kapilarę. Najczęściej próby rozpuszczano w 2 mM roztworze boraksu, podczas gdy sumaryczne stężenia elektrolitów osiągały nawet kilkadziesiąt milimoli. Przykładane do układu wysokie napięcie powodowało wytworzenie znacznie wyższego natężenia pola elektrycznego w objętości nastrzykiwanej próby niż w całej objętości elektrolitu wypełniającego kapilarę. Jony oznaczanych substancji, ulegając ogniskowaniu na granicy stref próba – elektrolit, umożliwiły otrzymanie bardziej ostrych pików (efekt zawężania pasma). Analizowana próba przed podaniem do układu separacyjnego rozpuszczana była w roztworze buforu o stężeniu wielokrotnie niższym niż stężenie buforu separacyjnego. Znanym jest fakt, że mniejsze przewodnictwo (siła jonowa) roztworu w analizowanej próbce pod wpływem przyłożonego napięcia powoduje wytworzenie większego natężenia pola elektrycznego w porównaniu z natężeniem w buforze rozdzielającym. Poprzez ogniskowanie na granicy stref pomiędzy próbą i buforem separacyjnym uzyskiwano szybszą migrację rozdzielanych analitów, jednocześnie wywołując efekt zawężania pasma (*stacking*) i otrzymując bardziej ostre piki w zapisie elektroforetycznym.

Wysoka granica oznaczalności

Jedną z wad stosowania CE, przy użyciu konwencjonalnych detektorów UV, jest wysoka granica oznaczalności analitów. Krótka droga optyczna, jaką przemierza wiązka światła przez kapilarę (50 – 100 μm) nie czyni ją atrakcyjną dla analiz śladowych. Ponadto, ograniczona wewnętrzna średnica kapilary uniemożliwia wprowadzenie większych niż nanolitrowe objętości próby. Stąd

uzyskiwane granicy oznaczalności poniżej stężenia 1 ng/ml, przy zastosowaniu tradycyjnego detektora UV, jest wyzwaniem dość trudnym do osiągnięcia. Wady, związane z czułością metody, można jednak częściowo zrekompensować poprzez zastosowanie kilku rozwiązań. Jednym z nich jest wydłużenie drogi optycznej poprzez modyfikacje kapilar w obrębie miejsca przechodzenia wiązki światła UV. Zastosowana do analizy antybiotyków z grupy tetracyklin kapilara o rozszerzonej drodze optycznej (ELP) umożliwiła pięciokrotne obniżenie granicy oznaczalności. Innym sposobem poprawy zdolności detekcji były testy z użyciem kapilar o szerokiej średnicy wewnętrznej (100 μm), jednakże rejestrowane sygnały wykazywały jedynie dwukrotną poprawę czułości przy jednoczesnym obniżeniu rozdzielczości układu separacyjnego.

6.9. Detektory w analizie pozostałości

W celu obniżenia granicy oznaczalności stosowane mogą być detektory LIF oraz MS, dzięki którym można osiągać niskie poziomy wykrywania substancji (rzędu yoctomoli; 10^{-24} M). Jednak detektory fluorescencyjne mają ograniczone zastosowanie w analizie substancji leczniczych, gdyż tylko niewielki procent leków posiada zdolności fluorescencyjne, a dla większości z nich, koniecznym jest przeprowadzenie czasochłonnych reakcji upochadniania analitów. Najbardziej pożądane do analiz pozostałości, wydają się być detektory oparte na spektrometrii mas, które ze względu na możliwość dostarczania informacji na temat struktury chemicznej analitów oraz brak potrzeby stosowania standartowych roztworów odniesienia substancji wzorcowych, zalecane są obecnie przez Rozporządzenia EU do wykonywania oznaczeń zanieczyszczeń. Jednak wielokrotnie niższe koszty analiz przeprowadzanych przy użyciu detektorów UV sprawiły, że to właśnie one są powszechnie stosowane w laboratoriach monitorujących pozostałości leków w tkankach jadalnych i żywności pochodzenia zwierzęcego. Ponadto, próby połączenia detektora MS z techniką micelarnej elektroforezy kapilarnej kończyły się z reguły niepowodzeniem. Zastosowanie buforów, zawierających związki powierzchniowo-czynne (tj. SDS) jest ograniczone przy użyciu detektora MS, z uwagi na brak lotności utworzonych kompleksów micelarnych [24]. Kolejnym utrudnieniem zastosowania detektora MS w badaniach pozostałości leków jest konieczność uzyskania stosunkowo czystych ekstraktów, co w przypadku prób biologicznych wymaga z reguły żmudnych, niekiedy wieloetapowych i czasochłonnych procedur oczyszczania prób.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Prezentowana praca dotyczy metod elektroforetycznego oznaczania chemioterapeutyków, stosowanych w lecznictwie weterynaryjnym. Materiał biologiczny stanowiły płyny ustrojowe (osocze i surowica krwi) oraz tkanki jadalne zwierząt hodowlanych (głównie: mięśnie, wątroba, nerki oraz skóra z tłuszczem, a także płućka, żołądki, serca). Przedmiotem prac były chemioterapeutyki należące do różnych grup chemicznych (penicylin, tetracyklin, aminoglikozydów, amfenikoli, linkozamidów, chinolinów, sulfonamidów, awermektyn, nitrofuranów). Zróznicowany charakter fizyko-chemiczny wybranych substancji leczniczych oraz szeroki asortyment prób biologicznych stanowił przeszkodę w opracowaniu jednolitej procedury izolacji analitów z materiału biologicznego, jak również w wybraniu uniwersalnego buforu elektrolitycznego dla wszystkich oznaczanych związków. Procedurę izolacji leków z matrycy biologicznej oraz oczyszczanie prób z wielkocząsteczkowych substancji białkowych opracowano w taki sposób, aby ominąć trudne i czasochłonne postępowanie analityczne, proponowane najczęściej w literaturze [23, 34, 42]. Optymalizacja procesów przygotowania próbek do analizy pozwoliła na uzyskanie zadawalających wartości odzysków oznaczanych substancji leczniczych (> 77%). Ilościowa izolacja leków z materiału biologicznego przeprowadzona została przy użyciu acetonitrylu lub 3% acetonitylowego roztworu TCA. Efektywny proces oczyszczania ekstraktów, konieczny do oznaczeń niektórych grup związków, osiągnięto dzięki zastosowaniu techniki SPE, przy użyciu kolumnienek z wypełnieniem oktadecylowym. Opracowanie optymalnych warunków separacji elektroforetycznej i detekcji UV, przy różnych analitycznych długościach fal, umożliwiło ilościowe oznaczanie wszystkich testowanych substancji leczniczych.

Wyniki elektroforetycznych analiz pozostałości leków w materiale biologicznym pozwoliły na przedstawienie następujących wniosków:

1. Opracowany tok postępowania analitycznego umożliwił efektywną izolację analitów z badanych tkanek a zastosowane parametry analizy elektroforetycznej zagwarantowały satysfakcjonującą separację, stwarzając jednocześnie możliwości do ilościowego oznaczanie wszystkich substancji leczniczych w obrębie danej grupy chemicznej.
2. W celu obniżenia granicy oznaczalności, po raz pierwszy do analizy prób biologicznych, użyte zostały kapilary krzemionkowe o rozszerzonej drodze optycznej (ELP), pozwalające na pięciokrotną poprawę zdolności detekcji.
3. Zastosowanie skutecznego systemu płukania stworzyło warunki do zminimalizowania zjawiska adsorpcji białek na wewnętrznej ścianie kapilary i otrzymania wysokich wartości współczynników korelacji liniowej.

4. Ocena statystyczna otrzymanych wyników dowiodła, że elektroforetyczne metody oznaczania leków można zakwalifikować do tych, które spełniają wymogi stawiane oznaczeniom ilościowym.
5. Wykazano, że technika elektroforezy kapilarnej z powodzeniem może znaleźć zastosowanie zarówno w badaniach farmakokinetycznych, jak i w badaniach biodostępności weterynaryjnych produktów leczniczych. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń oraz znajomość wartości MIC i MAC można wykorzystać do określania wielkości dawek i częstości podania szeregu leków o działaniu przeciwbakteryjnym.
6. Opracowane metodyki pozwalają na ilościowe oznaczanie chemioterapeutyków znacznie poniżej ustalonych przez EU wartości MRL. Mogą być również przydatne do określenia czasów karencji dla leków podawanym zwierzętom hodowlanym.
7. Niezaprzeczalnym osiągnięciem prezentowanych metod jest ich przydatność w badaniach pozostałości szerokiego asortymentu leków przeciwbakteryjnych w tkankach jadalnych zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego. Gatunek zwierząt i rodzaj materiału nie miał istotnego wpływu na wielkość odzysków analitów.
8. Pewność uzyskania wiarygodnych i niezawodnych wyników analiz przy zastosowaniu stosunkowo prostych i szybkich procedur odbiałczających i ekstrakcyjnych stanowi dodatkowi argument przemawiający za możliwością wprowadzenia CE do rutynowych badań monitorowania poziomu leków.

Pomimo, iż elektroforeza kapilarna, jako stosunkowo nowa technika, nie cieszy się taką popularnością jak HPLC, to jej możliwości separacyjne są często w stanie rozwiązać zadania analityczne, które innym technikom następczą wiele trudności. W porównaniu z dotychczas stosowanymi metodami, technika CE, dzięki analizom z użyciem głównie wodnych roztworów elektrolitów, pozwala zminimalizować lub całkowicie wyeliminować kosztowne i niekiedy toksyczne rozpuszczalniki organiczne. Możliwości zastosowania detekcji UV przy krótkich długości fal (ok. 200 nm) pozwalają dodatkowo na ilościowe oznaczanie wielu substancji leczniczych, których analiza w obecności rozpuszczalników organicznych (jak w przypadku HPLC) jest trudna do przeprowadzenia lub wręcz niemożliwa. Niewielkie nakłady finansowe wymagane do przesiewowych (skryningowych) analiz żywności, zminimalizowanie zużycia rozpuszczalników organicznych oraz efektywność i szybkość analiz podkreślają aspekt ekonomiczny i ekologiczny badań pozostałości leków weterynaryjnych przy użyciu proponowanej techniki. Wymiernym aspektem praktycznym opracowanych metodyk jest możliwość ich wykorzystania do oznaczeń ilościowych pozostałości chemioterapeutyków w żywności pochodzenia zwierzęcego.

8. STRESZCZENIE

Środki przeciwbakteryjne wprowadzone zostały do lecznictwa weterynaryjnego w latach 50. XX wieku. Antybiotyki okazały się przydatne nie tylko w terapii i profilaktyce chorób infekcyjnych zwierząt, ale również w celu intensyfikacji chowu i zwiększenia rentowności produkcji. Aby zwiększyć przyswajalność paszy i skrócić okres tuczu leki przeciwbakteryjne były używane w hodowlach wielkostadnych, jako dodatki paszowe. Badania przeprowadzone w laboratoriach kontrolujących żywność wykazały, iż prawie 80% populacji zwierząt hodowlanych przez całe życie lub przez pewien jego okres otrzymuje leki (głównie chemioterapeutyki i środki o działaniu anabolicznym). Substancje te, kumulując się w tkankach jadalnych, stanowią zagrożenie dla konsumentów, zwłaszcza wtedy, gdy organy zwierząt rzeźnych są pozyskiwane do celów spożywczych przed zakończeniem okresu karencji. Aplikowanie w trakcie chowu zwierząt substancji farmakologicznie czynnych stwarza niebezpieczeństwo występowania ich pozostałości w tkankach jadalnych. Mogą one powodować uodparnianie się patogennych dla człowieka bakterii (rozwój zjawiska lekooporności), wywoływać reakcje alergiczne u osób wrażliwych, odczyny toksyczne lub wykazywać działanie nowotworowe. Wpływ długotrwałego przyjmowania niewielkich dawek leków na organizm człowieka nie jest w pełni znany, podobnie jak nieznany jest ich wpływ na potomstwo. W celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności międzynarodowe gremia działające przy Unii Europejskiej oraz JECFA zdefiniowały kryterium najwyższej dopuszczalnej pozostałości (MRL). Jest ono określane dla większości środków przeciwbakteryjnych, mogących pojawiać się w tkankach jadalnych i w produktach pochodzenia zwierzęcego, takich jak: mleko jaja, miód. W krajach Unii Europejskiej wartości MRL muszą być wyznaczone dla wszystkich substancji aktywnych farmakologicznie, mogących występować, jako pozostałości w produktach żywnościowych. Ustalone wielkości stanowią podstawę określania granicy wykrywalności dla metod analitycznych służących do kontroli pozostałości leków. Istotnym wydaje się opracowanie specyficznych i czułych metod, które posłużyłyby do wykrywania i ilościowego oznaczania substancji leczniczych w żywności, poniżej ustalonych wartości MRL.

Do oznaczeń pozostałości chemioterapeutyków w tkankach jadalnych zwierząt wykorzystuje się szereg testów przesiewowych, opartych na badaniach mikrobiologicznych i immunologicznych. Jednak możliwości pojawienia się fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych wyników oraz brak specyficzności tych oznaczeń sprawiają, że koniecznym staje się wprowadzenie w tym celu technik instrumentalnych. W ostatnich latach, dominującą rolę w laboratoriach analitycznych, monitorujących poziomy leków, pełniły techniki chromatograficzne. Jednakże, stosowanie chromatografii gazowej (GC) w badaniach pozostałości leków napotyka na szereg trudności. Wymagane wieloetapowe procedury oczyszczania próbek, jak również brak stabilności termicznej i zdolności two-

rzenia lotnych pochodnych analitów czynią ją nie przydatną do tego typu badań. Natomiast stosowanie techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) jest ograniczone przez: stosunkowo drogie wypełnienia kolumn, nie zawsze satysfakcjonującą zdolność rozdzielczą oraz konieczność używania dużych ilości rozpuszczalników organicznych. Ponadto, zastosowanie HPLC w połączeniu z detektorem UV może sprawiać trudności przy oznaczaniu analitów, absorbujących promieniowanie UV przy krótkich długościach fal ($\lambda = 190 - 210$ nm). Analiza takich substancji staje się kłopotliwa z uwagi na właściwości absorpcyjne najczęściej stosowanych rozpuszczalników organicznych.

Rozporządzenia zawarte w Dyrektywie 2002/657/EC, dotyczące metod oznaczania pozostałości w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, zalecają stosowanie detektorów opartych na spektrometrii mas (MS). Pomimo, że LC-MS jest uznawana za najbardziej pożądaną metodę, służącą do identyfikacji poszczególnych chemioterapeutyków w obrębie danej grupy chemicznej, to z uwagi na skomplikowane i dość kosztowne oprzyrządowanie nie znalazła szerokiego zastosowania do testów przesiewowych, monitorujących poziomy pozostałości leków w żywności.

Celem badań było opracowanie metodyki ilościowego oznaczania kilku grup chemioterapeutyków takich jak: penicyliny, tetracykliny, amfenikole, linkozamidy, sulfonamidy, chinolony oraz pojedynczych leków: siarczanu streptomycyny, iwermektyny oraz nifursolu w tkankach drobiu, świń i ryb. Zastosowano w tym celu technikę elektroforezy kapilarnej, która w ciągu ostatnich 15. lat odgrywa coraz większą rolę w analizie leków. Technika ta została wybrana do badań z uwagi na szereg zalet: krótki czas analizy, wysoką wydajność i sprawność układu separacyjnego oraz niewielkie zużycie próbek i rozpuszczalników organicznych.

Zaproponowana procedura przygotowania prób tkankowych do analizy oparta jest na odbiałczaniu za pomocą acetonitrylu. W celu uzyskania wyższych wartości odzysków przebadano mieszaniny ekstrakcyjne, w skład których obok acetonitrylu wchodziły: metanol, 3% kwas trichlorooctowy, bufor McIlvaine'a (pH = 4,0) oraz sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA-Na₂). Próby zawierające tetracykliny, siarczan streptomycyny, iwermektynę i nifursol wymagały jednoetapowego procesu odbiałczania, podczas gdy dla próbek, zawierających leki z grupy penicylin, amfenikoli, linkozamidów, sulfonamidów i chinolonów było koniecznym zastosowanie dodatkowej ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W toku dalszych badań przeprowadzono optymalizację parametrów separacji elektroforetycznej dla każdej z badanych grup chemioterapeutyków (tj. analityczna długość fali, skład i pH buforu, czasy nastrzyku oraz wielkość przykładanego napięcia). Wybrane wielkości parametrów stanowiły kompromis pomiędzy wydajnością, efektywnością rozdzielania a czasem analizy.

Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej w zakresie selektywności, dokładności, precyzji, liniowości, trwałości i odporności opracowanej metody.

Walidacja metody obejmowała również wyznaczenie granic wykrywalności (LOD) i ilościowego oznaczania (LOQ) dla analitów oraz obliczenie wartości odzysków. Korzystając z równań regresji określono także dodatkowe parametry wymagane przy ocenie pozostałości: decyzyjną wartość graniczną ($CC\alpha$, wyznaczającą poziom oraz wartości powyżej tego poziomu, które mogą zostać uznane jako niezgodne z błędem prawdopodobieństwa α) oraz zdolność wykrywania ($CC\beta$, definiowaną jako najmniejszy możliwie wykrywalny poziom substancji, który został zmierzony w próbce z błędem β).

Przedmiotem badań pozostałości leków przeciwbakteryjnych były tkanki jadalne (mięśnie, nerki, wątroba, skóra z tłuszczem) zwierząt różnego gatunku (drobiu, świń i ryb). Skuteczność opracowanych metod poddano weryfikacji, analizując próbki tkankowe pochodzące od zwierząt, którym podawano leki w dawkach terapeutycznych. Ponadto przeprowadzono testy na tkankach jadalnych i produktach pochodzenia zwierzęcego, zakupionych w lokalnych sklepach. Celem dalszych analiz było potwierdzenie przydatności metod elektroforetycznych do badań monitorowania poziomu leków stosowanych w weterynarii: iwermektyny (w osoczu krwi u świń i koni) oraz tiamfenikolu (w surowicy krwi u indyków). Przeprowadzone oznaczenia posłużyły do określenia biodostępności (w przypadku tiamfenikolu) oraz biorównoważności (w przypadku iwermektyny) badanych postaci leku. Opracowana metodyka okazała się wystarczająco czuła do oznaczeń pozostałości chemioterapeutyków na poziomach znacznie niższych niż ustalone wartości MRL. Przeprowadzone badania mogą zależeć zastosowanie do określania okresów karencji, które wyznaczane są dla leków weterynaryjnych w celu uniknięcia niebezpieczeństw, związanych z występowaniem ich pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. Opracowane metody mogą również z powodzeniem być zastosowane do ilościowego oznaczenia większości chemioterapeutyków stosowanych w lecznictwie weterynaryjnym i w hodowli zwierząt a technika CE, jako alternatywna metoda w stosunku do technik chromatograficznych, w pełni spełnia wymogi stawiane oznaczeniom ilościowym i może być użyta w laboratoriach, oceniających jakość i bezpieczeństwo żywności.

9. SUMMARY

Antimicrobial food additives were used in veterinary medicine for the first time in 1950's. Today, various kinds of antibiotics are applied in animal husbandry to control, prevent and treat infection as well as to decrease production costs in food producing animals. Together with the market globalization, chemotherapeutics are administered at sub-therapeutic doses for the whole production period and help to increase animals ability to absorb food and thus reach the market weight earlier. Currently, approximately 80% of all food-producing animals receive medication for a certain period or the whole of their lives. The veterinary drugs given to animals orally or parentally may be found in organ tissues, particularly when animals are slaughtered without any observance of the withdrawal time. Treating animals with antimicrobials represents a hazard to consumers due to drug residues in edible tissues of animal origin. There is a higher risk of developing allergies, drug resistance, as well as carcinogenic and toxic effect. In addition to immediate adverse consequences, there have also been the long-term effects to the exposure of low levels of residue, which have still been unknown. In order to ensure the safety of food for consumers, the European Union (EU) Commission and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) have established maximum residue limits (MRLs) for the most of antimicrobials in edible tissues of several animal species, their milk, honey and eggs. These MRLs are the basis for the determination of limits of detection (LODs) of various analytical methods used in residue surveillance. These limits require the development of sensitive and specific methods for the identification and quantification of drug residues in food.

Many screening (microbiological or immunoassay) tests have been used to detect chemotherapeutic residues in animal products, but a confirmation and an accurate quantification by instrumental methods is mandatory by the risk of false non-compliant results. Recently, the chromatographic techniques have been played a key role in residue analysis. However, the routine analyses by gas chromatographic (GC) methods are not feasible because of many purification steps required prior to the analysis of thermally labile and non-volatile chemotherapeutic compounds. On the other hand, high-performance liquid chromatography (HPLC) methods are limited by sometimes poor separation efficiencies, expensive columns and the consumption of relatively high amounts of organic solvents used as mobile phase, which can be harmful to the environment. Likewise, the application of HPLC with UV detection methods are strongly limited by UV absorption properties of drugs, which require a short wavelength detection ($\lambda = 190 - 210$ nm), in which most of the commonly used organic solvents of the mobile phase absorbs UV light as well. Since the publication of Decision 2002/657/EC, LC coupled to mass spectrometry (MS) has become the preferred technique for confirmation and quantification of drug residues in food samples. LC-MS methods are capable of identifying individual chemotherapeutics within

a class but involve relatively complex and expensive instrumentation, which may not always be available for routine monitoring.

In this work, CE methods for the quantification of several classes of chemotherapeutics including penicillin, tetracycline, amphenicol, lincosamide, sulfonamide, quinolone compounds as well as streptomycin sulfate, ivermectin and nifursol in poultry, swine and fish tissues have been developed and validated. In the recent 15 years, CE has gained increasing interest as a powerful analytical tool by advantage of its short analysis time, resolution and extremely high efficiency as well as its low sample and organic solvent consumption.

The proposed simplified clean-up protocol, including deproteinization by acetonitrile has been allowed to determinate of drug substances in a variety of tissue species. However, to obtain the best recoveries of analytes the combination of acetonitrile with trichlooacetic acid, methanol, McIlvaine's buffer solution (pH=4.0) or ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt (EDTA-Na₂) were also studied. The samples included tetracyclines, streptomycin sulfate, ivermectin and nifursol were deproteinized by acetonitrile without an additional clean-up steps, but the need of solid-phase extraction (SPE) extraction was evaluated for penicillin, amphenicol, lincosamide, sulfonamide and quinolone compounds. In the course of research, electrophoretic separation conditions (wavelength, composition and pH value of the buffer solutions, injection times and applied voltage) were selected for each of chemotherapeutic class, that were the best compromise between a good efficiency, resolution and fast analysis time.

The elaborated CE methods were validated in compliance with the analytical performance parameters required for analytical method validation, including selectivity, accuracy, precision, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), robustness, recovery and stability. Moreover the decision limit (CC α – limit, at which it can be decided that a sample is truly violate with an error probability of α) and detection capability (CC β – the smallest content at which a method is able, with an error probability of β to detect the analyte) were calculated for all analytes using calibration lines.

The CE method has been developed for the determination of antimicrobial residues in different animal (poultry, swine and fish) edible tissues (muscles, kidney, liver, skin and fat). The effectiveness of electrophoretic method has been checked by analyzing tissue samples from the animals, which were treated with therapeutic doses. Experiments have been also performed in tissue samples of animal origin commercial products obtained from several markets. Moreover, the usefulness of CE method has been exerted for pharmacokinetic research. The elaborated CE methods have been used for the monitoring of plasma/serum drug levels during pharmacokinetic trials with ivermectin (in swine and horses) and thiamphenicol (in turkeys). This has been done to evaluate its most efficacious dosage regimen and the bioavailability of the pharmaceutical form. The proposed methods have been appropriately sensitive for the edible tissues chemotherapeutic residues determination at the levels far below MRL values. This has

allowed establishing the withdrawal period, which has been necessary to avoid any risk for a human coming from consuming animals treated with those drugs. The developed CE methods could be satisfactorily applied as a routine procedure to quantify the most important classes of chemotherapeutic agents used in veterinary medicine and animal husbandry. The CE could be fully accepted as a complementary or alternative to LC separation technique in drug analysis and can be implemented in laboratories of food quality and safety control.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Abd El-Aty, A.M., Abo El-Sooud, K., Goudah, A.M.: Pharmacodisposition of thiamphenicol in rabbits. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2001, 108, 393.
2. Abjean J.P.: Screening of drug residues in food of animal origin by planar chromatography: application to sulfonamides. *J. Planar Chromatogr.* 1993, 6, 147.
3. Andersen W.C., Roybal J.E., Gonzales S.A., Turnipseed S.B., Pfenning A.P., Kuck L.R.: Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2005, 529, 145.
4. Babić S., Horvat A.J.M., Mutavdžić-Pavlović D., Kaštelan-Macan M.: Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2007, 26, 1043.
5. Bailac S., Ballesteros O., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Sanz-Nebot V., Navalón A., Vilchez J.L., Barbosa J.: Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* 2004, 1029, 145.
6. Bailac S., Barrón D., Sanz-Nebot V., Barbosa J.: Determination of fluoroquinolones in chicken tissues by LC-coupled electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 131.
7. Bednarek D., Szymańska-Czerwińska M.: Antybiotyki i inne substancje antybakteryjne stosowane w paszach leczniczych. *Życie Wet.* 2006, 81, 558.
8. Beltrán J.L., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Barbosa J.: Determination of quinolone antimicrobial agents in strongly overlapped peaks from capillary electrophoresis using multivariate calibration methods. *Anal. Chim. Acta* 2004, 501, 137.
9. Blanchflower W.J., Hewitt S.A., Kennedy D.G.: Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst* 1994, 119, 2595.
10. Blanchflower W.J., McCracken R.J., Haggan A.S., Kennedy D.G.: Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1997, 692, 351.
11. Di Corcia A., Nazzari M.: Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A* 2002, 974, 53.

12. Christodoulou E.A., Samanidou V.F., Papadoyannis I.N.: Development and validation of an HPLC confirmatory method for residue analysis of ten quinolones in tissues of various food-producing animals, according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2676.
13. Cherlet M., Schelkens M., Croubels S., De Backer P.: Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003, 492, 199.
14. Cinquina A.L., Longo F., Anastasi G., Giannetti L., Cozzani R.: Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 227.
15. Cooper A.D., Creaser C.S., Farrington W.H.H., Tarbin J.A., Shearer G.: Development of multi-residue methodology for the HPLC determination of veterinary drugs in animal tissues. *Food Add. Contam.* 1995, 12, 167.
16. Dufresne G., Fouquet A., Forsyth D., Tittlemier S.A.: Multiresidue determination of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in fish and shrimp by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 604.
17. European Commission, Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a community procedure for the establishment of MRL (maximum residue limits) of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, *Off. J. Eur. Union*, L224 (18 August 1990).
18. European Commission, Council Regulation 2377/90/EC, *Off. J. Eur. Union*, L224 (18 August 1990) (Consolidated version of the Annexes I to IV updated up to 1.04.2008).
19. European Commission, Commission Decision (2002/657/EC) of 14 August 2002, *Off. J. Eur. Union*, L221 (2002) 8.
20. European Commission (EC) Regulation No.1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union*, L268/29, 18.10.2003.
21. Faria A.F., de Souza M.V.N., de Almeida M.V., de Oliveira M.A.L.: Simultaneous separation of five fluoroquinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 2006, 579, 185.
22. FitzGerald S.P., O'Loan N., McConnell R.I., Benchikh E.L.O., Kane N.E.: Stable competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit for rapid measurement of 11 active beta-lactams in milk, tissue, urine, and serum. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 334.
23. Fuh M.-R.S., Chu S.-Y.: Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 2003, 499, 215.

24. Goetzinger W.K., Cai H.: Buffer system for the separation of neutral and charged small molecules using micellar electrokinetic chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 2005, 1079, 372.
25. Heitzman R. J. (ed.): *Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: reference materials and methods*. 2nd ed. Commission of the European Communities. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1994, UK.
26. Hermo M.P., Barrón D., Barbosa J.: Determination of residues of quinolones in pig muscle: Comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* 2005, 539, 77.
27. Hermo M.P., Barrón D., Barbosa J.: Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2006, 1104, 132.
28. Hernández M., Aguilar C., Borrull F., Calull M.: Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 2002, 772, 163.
29. Hillaert S., Van Den Bossche W.: Optimization and validation of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of florfenicol. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 36, 437.
30. Huang X., Yuan D., Huang B.: Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using Ether-type column liquid chromatography. *Talanta* 2007, 72, 1298.
31. ISO 11843-2: *Methodology in the linear calibration case*. Switzerland, Geneva 2000.
32. Jiménez-Lozano E., Roy D., Barrón D., Barbosa J.: Effective sorbents for solid-phase extraction in the analysis of quinolones in animal tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2004, 25, 65.
33. Johnston L., Mackay L., Croft, M.: Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 2002, 982, 97.
34. Juan-García A., Font G., Picó Y.: Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2006, 27, 2240.
35. Kania B.F.: *Praktyczna Chemioterapia Weterynaryjna*, Medyk, Warszawa 2005.
36. Kennedy D. G., McCracken R. J., Cannavan A., Hewitt S. A.: Use of liquid chromatography - mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *J. Chromatogr.* 1998, 812, 77.

37. Kietzmann M, Markus W., Chavez J., Bollwahn W.: Drug residues in untreated swine. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 1995, 102, 441.
38. Kim S.-C., Carlson K.: Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 1301.
39. Kishida K.: Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. *Food Control* 2007, 18, 301.
40. Korsrud G.O., Salisbury C.D.C, Fesser A., MacNeil J.: Laboratory evaluation of the Charm. Farm. Test for antimicrobial residues in meat. *J. Food Prot.* 1995, 58, 1129.
41. Korsrud G.O., Salisbury C.D.C., Rhodes, C.S., Papich M.G., Yates W.D.G., Bulmer W.S., MacNeil J.D., Landry D. A., Lambert G., Yong M. S. and Ritters L.: Depletion of penicillin G residues in tissues, plasma, and injection sites of market pigs injected intramuscularly with procaine penicillin G. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 421.
42. Lara F.J., García-Campaña A.M., Alés-Barrero F., Bosque-Sendra J.M., García-Ayuso L.E.: Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2006, 78, 7665.
43. Lee H.J., Lee M.H., Han In.K.: Application of ELISA for the detection of sulfamethazine residues in live cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2001, 14, 378.
44. Malisch B, Bourgeois B., Lippold R.: Multiresidues analysis of selected chemotherapeutics and antiparasitics. Part 1: Determination and their N4-actyl-metabolites, chloramphenicol and nicarbazin in meat. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, 1992, 88, 205.
45. Malisch B, Bourgeois B., Lippold R.: Multiresidues analysis of selected chemotherapeutics and antiparasitics. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, 1994, 90, 375.
46. Martinez M., McDermott P., Walker R.: Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *Vet. J.* 2006, 172, 10.
47. Mengozzi G., Intorre L., Bertini S., Giorgi M., Secchiari P.L., Soldani G.: A comparative kinetic study of thiamphenicol in pre-ruminant lambs and calves. *Res. Vet. Sci.* 2002, 73, 291.
48. Moats W.A.: High-performance liquid chromatographic determination of penicillin G, penicillin V and cloxacillin in beef and pork tissues. *J. Chromatogr.* 1992, 593, 15.
49. Moats W.A., Romanowski R.D.: Multiresidue determination of β -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 237.

50. Nagata T., Saeki M.: Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15, 2045.
51. Nakazawa H., Ino S., Kato K., Watanabe T., Ito Y., Oka H.: Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1999, 732, 55.
52. Okerman L., De Wasch K., van Hoof J., Smedts W.: Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and in porcine kidneys by solid-phase fluorescence immunoassay. *J. AOAC Int.* 2003, 86, 236.
53. Opaliński K.W.: Potencjalne zagrożenia dla środowiska związane z wykorzystaniem w hodowli (chowu) zwierząt produktów paszowych oraz niezbędne minimum badań pozwalające na stwierdzenie, czy ich stosowanie będzie wywierało na środowisko niekorzystny wpływ. Centrum Badań Ekologicznych PAN, Warszawa 2003.
54. Pawlaczyk J., Zając M.: Walidacja metod analizy chemicznej. Przykłady walidacji metod. AMP, Poznań 2005.
55. Pecorelli I., Bibi R., Fioroni L., Galarini R.: Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 2004, 1032, 23.
56. Pena A.L., Lino C.M., Silveira M.I.N.: Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 2003, 86, 925.
57. Pena A.L., Lino C.M., Alonso R., Barcelo D.: Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4973.
58. Petz M.: High pressure liquid chromatographic method for the determination of residual chloramphenicol, furazolidone and five sulphonamides in eggs, meat and milk. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1983, 176, 289.
59. Pfenning A.P., Roybal J.E., Rupp H.S., Turnipseed S.B., Gonzales S.A., Hurlbut J.A.: Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Florfenicol, Florfenicol Amine, and Thiamphenicol in Shrimp Tissue by Gas Chromatography with Electron Capture Detection. *J. AOAC Int.* 2000, 83, 26.
60. Posyński A.: Wykrywanie i oznaczanie pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego metodą chromatografii cieczowej. Puławy PIW, 1998.
61. Posyński A., Żmudzki J., Semeniuk S., Niedzielska J., Ellis R.: Determination of tetracycline residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 1998, 12, 294.

62. Posyński A., Żmudzki J., Ellis, R.L., Semeniuk S., Niedzielska J.: Validation study for the determination of tetracycline residues in animal tissues. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 862.
63. Posyński A., Żmudzki J., Mitrowska K.: Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2005, 1087, 259.
64. Posyński A., Mitrowska K., Żmudzki J., Niedzielska J.: Analytical procedure for the determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys. *J. Chromatogr. A* 2005, 1088, 169.
65. Przeniosło-Siewczyńska M., Kwiatek K.: Wybrane aspekty stosowania antybiotyków w żywieniu zwierząt oraz metody ich wykrywania w środkach żywienia zwierząt. *Życie Wet.* 2005, 80, 717.
66. Purves E.D.: Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-movement-curve (AUMC). *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1992, 20, 211.
67. Van de Riet J.M., Potter R.A., Christie-Fougere M., Garth Burns B.: Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2003, 86, 510.
68. Roliński Z.: *Farmakologia i Farmakoterapia Weterynaryjna*, PWRiL, Warszawa 2001.
69. Ruszczyc Z.: *Żywienie zwierząt i paszoznawstwo*. PWRiL Warszawa 1983.
70. Di Sabatino M., Di Pietra A.M., Benfenati L., Di Simone B.: Determination of 10 sulfonamide residues in meat samples by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 598.
71. Salisbury C.D.C., Sweet J.C., Munro R.: Determination of sulfonamide residues in the tissues of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 2004, 87, 1264.
72. Samanidou V.F., Nikolaidou K.I., Papadoyannis I.N.: Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 2247.
73. Shabir G.A.: Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 57.
74. Shaikh B., Moats W. A.: Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. *J. Chromatogr.* 1993, 643, 369.

75. 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.
76. Shao B., Zhao R., Meng J., Xue Y., Wu G., Hu J., Tu X.: Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2005, 548, 41.
77. Shearan P., O'Keefe M., Smyth M.R.: Comparison of matrix solid phase dispersion (MSPD) with a standard solvent extraction method for sulphamethazine in pork muscle using high performance liquid and thin layer chromatography. *Food Addit. Contam.* 1994, 11, 7.
78. Sin D.W.-M., Wong Y.-C., Ip A.C.-B.: Quantitative analysis of lincomycin in animal tissues and bovine milk by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 34, 651.
79. Sokol J., Matisova E.: Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 1994, 669, 75.
80. Sørensen L.K., Rasmussen B.M., Boison J.O., Keng L.: Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. B* 1997, 694, 383.
81. Soto-Chinchilla J.J., García-Campaña A.M., Gámiz-Gracia L.: Analytical methods for multiresidue determination of sulfonamides and trimethoprim in meat and ground water samples by CE-MS and CE-MS/MS). *Electrophoresis* 2007, 28, 4164.
82. Soto-Chinchilla J.J., García-Campaña A.M., Gámiz-Gracia L., Cruces-Blanco C.: Application of capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking to the sensitive determination of sulfonamides in meat and ground water. *Electrophoresis* 2006, 27, 4060.
83. Stoev G., Michailova A.: Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2000, 871, 37.
84. Toussaint B., Bordin G., Janosi A., Rodriguez A.R.: Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 11 (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney. *J. Chromatogr. A* 2002, 976, 195.
85. Verdon E., Couëdor P.: Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after precolumn derivatization. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 1083.
86. Verdon E., Couëdor P., Roudaut B., Sanders P.: Multiresidue method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in mul-

-
- timatrix/multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: Single laboratory validation study. *J. AOAC Int.* 2005, 88, 1179.
87. Verdon E., Couedor P., Sanders P.: Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry-In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 336.
 88. Witkiewicz Z.: *Podstawy Chromatografii*. WNT, Warszawa 2000.
 89. Yorke J.C., Froc P.: Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2000, 882, 63.
 90. Zhao S., Jiang H., Li X., Mi T., Li C., Shen J.: Simultaneous determination of trace levels of 10 quinolones in swine, chicken, and shrimp muscle tissues using HPLC with programmable fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 3829.
 91. Zhou J., Gerhardt G.C., Baranski A., Cassidy R.: Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics coupled with reductive fast cyclic voltammetric detection. *J. Chromatogr. A* 1999, 839, 193.