

7. *Streszczenie*

Jednym z priorytetowych zadań Unii Europejskiej jest bezpieczeństwo żywności i ochrona zdrowia konsumenta przed znanymi oraz nieznanymi czynnikami ryzyka. Zgodnie z wytycznymi unijnymi, próbki są kierowane do badań w celu wykrycia stosowania substancji zakazanych oraz kontroli zgodności z maksymalnymi poziomami pozostałości dla substancji dozwolonych do stosowania.

Określenie stopnia skażenia żywności wymaga zastosowania odpowiednio czułych, precyzyjnych i dokładnych metod analitycznych. W ostatnim czasie techniką z wyboru, szeroko stosowaną w analizie żywności na całym świecie, stała się technika chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Metody stosowane dotychczas w ramach krajowego programu badań kontrolnych to metody wieloskładnikowe obejmujące kilkanaście/kilkadziesiąt analitów z tej samej klasy, m.in. antybiotyki i chemioterapeutyki, kokcydiostatyki, benzoimidazole, nitroimidazole i amfenikole w jajach. W związku z dużą liczbą próbek przesyłanych do badań oraz związków podlegających kontroli zaistniała potrzeba opracowania nowej, prostej, szybkiej i taniej wieloskładnikowej metody pozwalającej na jednoczesne oznaczenie ww. substancji w trakcie jednej analizy.

W związku z powyższym opracowano dwie wieloskładnikowe potwierdzające metody oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych i dodatków paszowych oraz obecności barwników zakazanych w dwóch matrycach - jajach oraz albuminie jaja kurzego. Metody te pozwalają na oznaczenie, odpowiednio, 120 oraz 85 analitów jednocześnie. Opracowane metody spełniają wymagania Decyzji Komisji 2002/657/WE dla potwierdzających metod analitycznych. Wiarygodność metody wieloskładnikowej dla świeżych jaj dodatkowo sprawdzono na archiwalnych próbkach pochodzących z międzylaboratoryjnych badań porównawczych oraz potwierdzając obecność wykrytych substancji metodami urzędowymi oznaczania pozostałości antybiotyków i chemioterapeutyków oraz kokcydiostatyków w jajach. Użyteczność wieloskładnikowej metody oznaczania pozostałości w albuminie sprawdzono analizując próbki archiwalne albuminy jaja kurzego. Potwierdzono obecność pozostałości wykrytej we wcześniejszych badaniach enrofloksacyny oraz dodatkowo oznaczono obecność doksycykliny, na poziomie sięgającym do 596 µg/kg.

Opracowane metody są szybkie, łatwe i pozwalają na otrzymanie wiarygodnych wyników, a zastosowanie wieloskładnikowych metod w badaniach pozwoliło na wykrycie większej liczby zanieczyszczeń.

Przy pomocy opracowanej metody przeprowadzono badania kontrolne 150 próbek jaj. Na tej podstawie oceniono stopień skażenia jaj pozostałościami leków weterynaryjnych i dodatków paszowych. W 65 (43%) próbkach stwierdzono obecność jakiegokolwiek pozostałości z badanych grup. Ponieważ w niektórych próbkach stwierdzano obecność więcej niż jednego analitu, uzyskano 87 wyników dodatnich zgodnych (58%) i 13 niezgodnych (8,7%) z obowiązującym prawem. Obecność leków przeciwbakteryjnych wykryto w 23 próbkach (15%), kokcydiostatyków w 49 próbkach (33%), w 2 oznaczono obecność benzoimidazoli (1,3%). Najczęściej stwierdzanymi lekami były enrofloksacyna i doksycyklina, obydwa zakazane do stosowania u niosek jaj konsumpcyjnych. Wyniki analiz są spójne z wynikami badań obecności substancji przeciwbakteryjnych z systemów pojenia drobiu. Pozostałości kokcydiostatyków, będące rezultatem zanieczyszczeń krzyżowych pasz na linii produkcyjnej, były na poziomach śladowych, uzyskano tylko 1 wynik niezgodny (salinomycyna).

Dokonano oceny narażenia konsumenta na kontakt z zanieczyszczoną żywnością. Do obliczeń użyto najwyższych stężeń, jakie oznaczono dla każdego z wykrytych związków. Na tej podstawie określono, że w żadnym z analizowanych przypadków spożycie skażonych jaj czy też albuminy jaja kurzego nie naraziłoby konsumenta na spożycie ksenobiotyków w dawkach przekraczających dopuszczalne dzienne spożycie (ADI).

Zaplanowano także doświadczenie na kurach nioskach, które miało na celu zasymulowanie przechodzenia wybranego barwnika - Sudanu I, do jaj. Barwnik ten należy do grupy przemysłowych barwników azowych, zakazanych do stosowania w żywności, jednakże pozostałości tych barwników, w tym kancerogennego Sudanu I, są w niej wykrywane. Najczęściej ich obecność raportowana jest w przyprawach, takich jak papryka w proszku, curry czy kurkuma, jednak notowano także przypadki znalezienia barwników Sudan I i IV w jajach.

W celu realizacji zaplanowanego doświadczenia opracowano dwie wieloskładnikowe metody oznaczania barwników zakazanych do stosowania w żywności w żółtkach jaj oraz w paszy.

W wyniku doświadczenia przeprowadzonego na nioskach, w czasie którego zwierzęta otrzymywały paszę doświadczalną zawierającą Sudan I na trzech poziomach

(0,5; 5 i 50 mg/kg) uzyskano profil zanikania pozostałości tego barwnika w jajach. Zgodnie z przewidywaniami jego obecność stwierdzono jedynie w żółtkach jaj, jednakże stopień przechodzenia Sudanu I do jaj był znacznie niższy, niż można się było tego spodziewać, na podstawie jego właściwości fizykochemicznych. Obecność Sudanu I w żółtkach powyżej granicy wykrywalności metody stwierdzono jedynie dla najwyższego poziomu badanego czynnika w paszy. Plateau uzyskano w siódmym dniu podawania paszy o stężeniu 50 mg/kg Sudanu I, wynosiło ono $0,29 \pm 0,028 \mu\text{g/kg}$ i utrzymywało się do piątego dnia od momentu zaprzestania podawania paszy.

Ponieważ ilość Sudanu I w jajach była znacznie mniejsza niż wynikało to z założeń poczynionych przed przystąpieniem do realizacji doświadczenia, a losy Sudanu I w organizmie kury nie zostały wyjaśnione w trakcie przeprowadzonych badań, istnieje potrzeba ich kontynuacji ze względu na wysoką toksyczność potencjalnych metabolitów i/lub produktów rozpadu barwnika.

8. Summary

Food safety and consumers health protection from known and unknown risk factors is one of the priorities of the European Union. In accordance with UE guidelines the use of prohibited substances and the compliance with the maximum residue levels for substances which are authorized for use are controlled.

The determination of the level of contamination of food requires sensitive, precise and accurate analytical methods. Recently, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become the technique of choice, widely used in the analysis of food. The methods used so far in official residue control in Poland are multi-residue methods involving several/dozens of analytes from the same class, such as antibiotics and chemotherapeutics, coccidiostats, benzimidazoles, nitroimidazoles and amfenikoles in eggs. Due to the large number of samples and compounds subjected to inspection there is a need to develop a new, simple, rapid and inexpensive method for the simultaneous determination of above substances during a single analysis.

Accordingly, two confirmatory methods for the determination of residues of veterinary drugs, feed additives and the presence of dyes banned for use in food have been developed in two matrices – whole eggs and lyophilized egg albumen. These methods allow for the simultaneous determination of 120 and 85 of analytes, respectively. Developed methods fulfill the requirements of Commission Decision 2002/657/EC for the confirmatory methods. The credibility of a multiclass-multiresidue method for fresh eggs was additionally confirmed by official methods for determination of residues of antibiotics, chemotherapeutics and coccidiostats in eggs and with use of archival samples from interlaboratory comparison. The usefulness of a multi-residue method for the determination of residues in egg albumen was verified by analyzing samples of archive albumens. The presence of enrofloxacin detected in previous study was confirmed and additionally doxycycline at a level of up to 596 µg/kg was detected.

Developed methods are quick, easy and allow obtaining reliable results. The use of multiclass-multiresidue methods allowed for the detection of a greater number of food contaminants.

A multiclass-multiresidue method was used to analyze 150 egg samples, taken by the Veterinary Inspection. On the basis of these results, the degree of contamination of eggs with veterinary drugs and feed additives residues has been evaluated.

Out of the samples tested, 65 (43%) revealed to contain at least one compound from the targeted groups. Because some of the samples were found to contain more than one compound, 87 (58%) samples were positive and 13 (8.7%) were non-compliant with the law. Antimicrobial drugs were found in 23 samples (15%), coccidiostats in 49 samples (33%) and 2 samples indicated the presence of benzimidazoles (1.3%). Enrofloxacin and doxycycline were the most frequently found drugs; both are banned for use in hens laying eggs for consumption. The results of these analyses are consistent with the results of the control of the presence of antimicrobial substances in poultry water supply systems. The residues of coccidiostats, as a result of cross-contamination of feed on the production line, were at trace levels. Only one non-compliant result for salinomycin was determined.

The consumer exposure on chemical residues in eggs was evaluated. Calculations were made using the highest concentrations for each of the detected compounds. It was concluded, that the consumption of any of the eggs or albumen, would expose the consumer for xenobiotics consumption that excess the acceptable daily intake (ADI).

An experiment was designed to study the transfer of an industrial, forbidden for use in food azo dye – Sudan I to eggs. Residues of azo dyes, including carcinogenic Sudan I, are detected in food. Most frequently, their presence is reported in spices, such as pepper powder, curry or curcuma, but cases of finding of Sudan dyes I and IV in eggs were also reported.

An experiment was carried out on laying hens, during which the animals were given an experimental feed containing Sudan I at three levels (0.5, 5 and 50 mg/kg), and the residue depletion of the dye in eggs was determined. As expected, it was found only in egg yolks, but the transfer of Sudan I to eggs was significantly lower than it might have been expected on the basis of its physical and chemical properties. The dye was found in egg yolks above the limit of quantification of the method only for the highest level of Sudan I in feed. Plateau level ($0.29 \pm 0.028 \mu\text{g/kg}$) was obtained on the seventh day of administration of the feed containing 50 mg of Sudan I per kg and lasted to the fifth day of the withdrawal.

The concentration of Sudan I in eggs was much lower than it appeared from the assumptions made prior to the experiment, and the fate of Sudan I in the body of laying hens was not explained during the study. Therefore, there is a need to continue this research, because of the high toxicity of potential metabolites and/or degradation products of Sudan I.