

# A takarmányok furazolidon és nitrofurazon tartalmának vizsgálata\*

ŐSZ JÓZSEFNÉ

Országos Takarmányozási és Állattenyésztési Felügyelőség Laboratóriumi Központ, Budapest

A takarmány premixek az antibiotikumok mellett kemoterápiás szereket is tartalmaznak. Ezeknek az anyagoknak profilaktikus szerepük van. Etetésükkel érzékeny gazdasági veszteségeket előidéző parazitás megbetegedések előzhetőek meg, mint pl. az *Eimeria* legkülönbözőbb fajai által okozott kokcidiózis. Kokcidiostatikumként a legkülönbözőbb szerves vegyületeket alkalmazzák, többek között a *Doad* és *Stillmann* által 1944-ben felfedezett nitrofurán vegyületeket. Ezek hatásmechanizmusukat tekintve citokróm antogonisták (1).

1960-as évektől kezdődően a nagyüzemi állattenyésztésben a nitrofurazont elsősorban a baromfi-, juh- és kecske kokcidióziisa a furazolidont pedig a baromfitífusz kivédésére alkalmazták. A rezisztencia kialakulásának elkerülésére a kokcidiostatikumokat ugyanúgy, mint a hozamnövelő szerként használt antibiotikumokat bizonyos idő eltelte után újjal váltják fel.

Furazolidont ma főként a sertés és baromfi nevelési periódusának kezdetén, a nitrofurazont pedig kizárólag terápiás célból alkalmaznak.

Állategészségügyi és közegészségügyi szempontból egyaránt fontos, hogy a takarmányok kokcidiostatikum tartalmát megfelelő módszerrel ellenőrizzük. Dolgozatomban a furazolidon és a nitrofurazon vizsgálatok során szerzett azokról a tapasztalataimról szeretnék beszámolni, amelyek az élelmiszerek reziduum vizsgálatánál is felhasználhatóak.

## Vizsgálati anyag és módszer

A takarmányoknak ma már csak elenyésző százaléka tartalmazhat 5-nitrofurán vegyületeket. Olyan vizsgálati módszereket célszerű tehát alkalmazni, amely alkalmas a reziduumok kimutatására is. A furazolidon 3/5-nitro-furfuliden/-amino-2-oxazolidon és a nitrofurazon 5-nitro-2-2-furáinaldehid kimutatása takarmányokból a következő eljárásokkal történik:

Minőségi kimutatás:

1. Kémiai azonosítási próba
2. Vékonyréteg kromatográfiai vizsgálat

Mennyiségi meghatározás:

Mikrobiológiai értékmérés, agardiffúziós módszerrel.

\*A lektor megjegyzése: A kezelés utolsó napjától kezdve az antibiotikum ürülési időtartamig a tejet élelmiszeripari célokra felhasználni, közfogyasztásra átadni, köz- és állategészségügyi, valamint minőségi okok miatt az MSZ 3698 szabvány és a higiénés szabályzat, valamint az Állategészségügyi és Élelmiszerhigiéniai Főosztály közleménye értelmében tilos. (Biológiailag aktív test idegen anyagok, hormonok, As, antibiotikumok etetésének tilalma. Mezőg. Ért. 26. 1975.)

1. Tejporos tápszerminták gyors ellenőrzésére szolgál az Amerikai Gyógyszerkönyvből adaptált azonosítási próba. Könnyű alkalmazhatóságáról a tejiparban már hazai szerző is beszámolt (2). Kémcsőbe 1 g tápszert mérünk, melyhez 10 cm<sup>3</sup> kézmeleg desztillált vizet öntünk. Alapos homogenizálás után 2 cm<sup>3</sup> 30%-os KOH oldatot adagolunk hozzá és jól összekeverjük. Megfigyeljük, hogy változik-e az oldat színe. Ha narancs- vagy citromsárga színt észlelünk ez nitrofurán vegyületek jelenlétére utal, ha azonban az oldat színe változatlanul fehér, a minta nem tartalmaz ilyen anyagokat. Ez a módszer csak tejporos malac- és borjú tápszerek vizsgálatára alkalmas, mivel a premixek vizes elegye a bennük levő alkatrészek miatt már eleve sárgás színűek.

A kimutatható mennyiség alsó határa: furazolidon esetében 0,5 mg/kg, nitrofurazonnal pedig 0,1 mg/kg.

Megjegyezni kívánom, hogy a premixek hatóanyagtartalma ennek legalább százszorosa.

2. A gyakorlatban az 5 nitrofurán készítmények kimutatására vékonyréteg kromatográfiás eljárást ritkán alkalmazunk, mivel ez a módszer a sok pigmentet tartalmazó minták hosszadalmas tisztítását kívánja meg, másrészt legfeljebb csak félkvantitatív mennyiségi meghatározást tesz lehetővé (3).

A módszert abban az esetben gazdaságos alkalmazni, ha egyazon minta furazolidont és nitrofurazont is tartalmaz.

Az eljárás lényege, hogy 10–20 g mintát 8 órán át acetonitrilrel extraháljunk. A kapott extraktumot 5 cm<sup>3</sup>-re bepároljuk, majd ebből 50 és 100 ul-t az etalon oldatokkal párhuzamosan vékonyrétegen kromatografálunk. A kromatogramot felszálló kromatográfiával fejlesztjük ki. A lemezeket UV fényben, 366 nm-en hullámhosszon megvizsgáljuk úgy, hogy az aktív anyag foltjait az etalonéhoz hasonlíthassuk. A furazolidon Rf értéke 0,577, a nitrofurazoné 0,82.

A kifejlesztett és megszáritott lemezre – kis melegítés után – etiléndiamint porlasztunk. A furazolidon világossárga színű, a nitrofurazon pedig narancssárga színű foltot ad. A módszer pontossága takarmányoknál  $\pm 10\%$ . A félkvantitatív meghatározáshoz addítvány standardot készítettem, amit a vizsgálati anyaggal és az etalon oldatokkal párhuzamosan kell vékonyrétegen kromatografálni.

Additív standardot az antibiotikum és a kokcidiosztatikum vizsgálatoknál minden esetben alkalmazok, mivel sokkomponensű és nem tiszta anyagok vizsgálatáról van szó. Az additív standardot úgy készítem, hogy a vivőanyaghoz ismert hatáserősségű furazolidont vagy nitrofurazont mérek és ezt ugyanúgy vizsgálom, mint a mintát és a referencia standardot.

### *Mennyiségi meghatározás*

A napi rutinvizsgálatok alkalmával a pozitív azonosítási próbát többnyire mikrobiológiai értékmérés követi (4).

Az értékmérés az ún. latin négyzetten, lyukasztásos, agardiffúziós módszerrel történik. Lényege, hogy olyan vegyületek biológiailag aktív hatóanyagtartalmát, amelyek aktivitásának csökkenése kémiai úton nem határozható meg, mikroorganizmusok segítségével mérjük meg. A takarmány kokcidiosztatikum tartalmától függően az alaposan homogenizált mintából 1 vagy 10 g-ot mérünk. A bemért anyagot megfelelő oldószerral eldörzsöljük, majd 30 percig rázatjuk. Szűrés, centrifugálás vagy könnyen ülepedő anyagok esetében dekantálás után a tiszta oldatból hígítási sort készítünk, amelyből 100 ul-t az előre kiöntött, tesztorganizmussal inokulált táptalaj meghatározott rendszer szerint elkészített lyukaiba pipettázunk. Az oldatok a táptalajba diffundálva a lyukak körül gátolják a tesztorganizmus növekedését. 16 óras 34 °C-on történő inkubálás után lemérjük a kialakult gátlási gyűrűk átmérőjét. Az átmérő nagysága a vizsgált anyag koncentrációjával arányos

Az ismeretlen hatóanyag-tartalmú minta által okozott inhibíciós zónák átmérőjének adatait a standard tisztaságú anyag átmérőjéhez viszonyítva megkapjuk a minta hatóanyagtartalmát.

A kapott adatokat félogaritmikus rendszerben ábrázolva megkapjuk az ún. aktivitási görbét. Matematikai úton a gyógyszeripartól átvett variancia analízist alkalmazzuk, mely szükség esetén számítógépes kiértékelést is lehetővé tesz. Az agardiffúziós teszt hibahatára takarmányoknál  $\pm 10\%$ . Kimutatás alsó határa furazolidonnál 0,5, nitrofurazonnál 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

### Összehasonlító vizsgálatok

280 vizsgálatot végeztem annak megállapítására, hogy az antibiotikumok biológiai érték mérésénél leggyakrabban használt oldószerek közül melyek válnak be legjobban az 5-nitrofurán vegyületek extrahálására. Arra is választ kerestem, van-e olyan oldószer, melyből egyidejűleg antibiotikum és furazolidon vagy nitrofurazon is mérhető. Négyféle oldószert vontam be a vizsgálat sorozatba. A furazolidon oldószereül a dimetilformamidot ajánlja a szakirodalom (5). Az 50%-os metanolegyes antibiotikumok pl. a flavomycin és a virginiamycin vizsgálatánál használatos, a n/10 sósav a tetracyclinek oldószere, a bacitracin vizsgálatoknál pedig jól bevált az oxálsavas eldörzsölés és a pH 2-es glikokoll pufferral való rázatás (6).

Háromféle tesztorganizmussal dolgoztam *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus flavus* ATCC 1024 és *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. törzsével. Ezek közül a *M. flavus* specifikusan a cinkbacitracin tesztorganizmusa, a másik kettő értékmérésre általánosan alkalmazott mikroorganizmus.

A vizsgálatok eredményét a következő táblázatok tartalmazzák.

Furazolidon visszanyerése takarmányokból

1. táblázat

Oldószer	Tesztorganizmusok					
	Bac. subtilis		M. flavus		Staph. aureus	
	Minta %	A.st. %	Minta %	A.st. %	Minta %	A.st. %
Dimetilformamid	100	100	0	0	100*	100*
Metanol 50%-os	95,45	95,6	0	0	96*	95*
Sósav n/10 . . . . .	81,8	82,3	0	0	0	0
Oxálsav + glikokollpuffer . . . . .	90,91	91,1	0	0	0	0

\* = a gyűrűk nem élesek a lyukak körül diffúz feltisztítás A.st. = additív standard

Nitrofurazon visszanyerése takarmányokból

2. táblázat

Oldószer	Tesztorganizmusok					
	Bac. subtilis		M. flavus		Staph. aureus	
	Minta %	A.st. %	Minta %	A.st. %	Minta %	A.st. %
Dimetilformamid	98,1	99	0	0	96,2	97,03
Metanol 50%-os	100	100	0	0	100	100
Sósav n/10 . . . . .	87,3	88,1	0	0	84	84,6
Oxálsav + glikokollpuffer . . . . .	90,25	91,1	0	0	80,12	81,4

A.st. = Additív standard.

## ÉRTÉKELÉS

A táblázatok alapján megállapítható:

1. *Bacillus subtilis* tesztorganizmussal inokulált táptalajon a furazolidon dimetilformamidos feltárás a nitrofurazon 50%-os metanolos kivonás után mérhető agardiffúziós érték-méréssel.
2. A bacitracin tesztorganizmusaként használt *Micrococcus flavus* sem a furazolidon, sem a nitrofurazon mikrobiológiai érték-mérésére nem alkalmas.
3. A *Staphylococcus aureus* növekedését a furazolidon csak gyengén gátolja. A nitrofurazon 50%-os metanollal extrahálva jól mérhető.
4. Miután az antibiotikum vizsgálatoknál dimetilformamidot nem használunk, szükség esetén lehetőség van arra, hogy nem 100%-os kinyerés ellenére, additív standard alkalmazásával furazolidont is lehet mérni, akár cinkbacitracin, akár tetraciklinek mellett.
5. Az 50%-os metanol alkalmas az antibiotikumok és a nitrofurazon egyidejű mérésére. Tehát egy oldatból két különböző tesztorganizmussal inokulált lemezen egy antibiotikum és egy kokcidiosztatikum mikrobiológiai érték-mérése végezhető el.

## I R O D A L O M

- (1) Zajonc, V. I.: Veterinarija Spofa 2, 115, 1973.
- (2) Wagner, A.: Magyar Áo. Lapja 5, 34, 1976.
- (3) Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, Berlin, 1967.
- (4) Simpson, J. S.: Analytical Microbiology, 88, 1963.
- (5) Assoc. Off. Agric. Chemists, 641, 1965.
- (6) Illés E.: Magyar Áo. Lapja 17, 267, 1962.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФУРАЗОЛИНА И НИТРАФУРАЗОНА КОРМОВ

Й. Ёс

Автор в статье дает отчет об опытах приобретенных при исследованиях фуразолидона и нитрофуразона в кормах. Выполнил сравнительные исследования 280 образцов с целью определения, что из среды растворителей применяемых при исследованиях антибиотиков которые подходят для одновременного измерения антибиотиков и кокцидиостатиков. На основании исследований установили, что из одного и того-же раствора при помощи другого и другого тесторганализма можно определить нитрофуразона и флавомицина.

## UNTERSUCHUNG DES GEHALTES AN FURAZOLIDON UND NITROFURAZON IN FUTTERN

J. Ósz

Erfahrungen bei der Bestimmung des Furazolidon- und Nitrofurazongehaltes in Futtern werden beschrieben. Eine vergleichende Untersuchung von 280 Mustern wurde durchgeführt, um festzustellen, welche der bei der Untersuchung von Anti-

biotika benützten Lösungsmittel zur gleichzeitigen Messung von Antibiotika und Coccidiostatika geeignet sind. Auf Grund der Untersuchungen wurde bestätigt, dass das Nitrofurazon und das Flavomycin in derselben Lösung mittels unterschiedlichen Testorganismen bestimmbar sind.

## INVESTIGATION OF THE CONTENT OF FURAZOLIDON AND NITROFUZZAZON IN FODDERS

*J. Ősz*

Results of the analysis of fodders from the aspect of their content of furazolidon and nitrofurazon are given. A comparative investigation of 280 samples was carried out in order to select those of the solvents applied at the investigation of antibiotics which are suitable for the simultaneous measurement of antibiotics and coccidiostatics. On the basis of these investigations it was found that on choosing different test organisms nitrofurazon and flavomycin can be determined in the same solution.