

mają zdolność wytwarzania penicyliny, reagują na penicylinę tylko jeden raz (przy nawrotach penicylina jako podstawowy antybiotyk nie działa).

Adres autora: dr med. Jerzy Szczepański, Biała Podl. ul. Sienkiewicza 8.

WŁODZIMIERZ KLACZYŃSKI

PZLZ Haczów

RUMENOTOMIA ORAZ CESARSKIE CIĘCIE U JAŁÓWKI

Zabiegi wymienione w tytule doniesienia, są wykonywane rutynowo przez wielu lekarzy wet. w naszym kraju. Przypadek, który publikuję jest o tyle ciekawy, iż obydwie te zabiegi dokonane zostały u jednego zwierzęcia w odstępie 3 miesięcy.

Opis przypadków

Dnia 30.VI.1964 r. doprowadzono do PZLZ Haczów, jałówkę rasy simentaler, lat 3, która była 7 miesięcy cielna. Stanowiła ona własność Ob. S. M. zamieszkałego w Haczowie. U jałówki wystąpiły objawy ostrej niestrawności. Temp. 40,3°; tętno 85/min. oddechy 32/min. Próby Ruegga, Kalchschmidta i Götzego — wybitnie dodatnie. Rozpoznanie: *Reticuloperitonitis traumatica*. Badania ginekologiczne nie przeprowadzono.

Zdecydowałem wykonać rumenotomię w celu usunięcia ciała obcego. Zabieg wykonano na stojąco w znieczuleniu nasiękowym (100 ml— 1% roztworu *polocainum hydrochloricum* bez adrenaliny). Metoda wykonania zabiegu uproszczona (1 para kleszczyków Peana do wyciągania żwacza oraz rękaw). Tą metodą, wykonałem w r. 1964 — 50 rumenotomii i nigdy nie stwierdziłem powikłań ze strony otrzewnej w miejscu uchwytu kleszczykami.

Po przecięciu powłok w czasie omacywania narządów jamy brzusznej, stwierdziłem świeży wzrost między ścianą czepca a przeponą oraz dużą ilość włóknika w okolicy zrostu. Po otwarciu żwacza usunąłem z czepca: 3 ciała obce, 2 druty dł. 4 cm oraz gwóźdź dł. 5 cm — perforujący przednio — dolną ścianę czepca. Żwacz szylem szwem dwupiętrowym Lemberta — jedwabiem nr 4. Powłoki brzuszne też jedwabiem 4 szwami „ósemkowymi” — łącznie otrzewną, mięśnie i skórę. Ta metoda szycia jamy brzusznej przy niewielkich cięciach i w miejscach nie predysponowanych do powstawania przepuklin jest wygodna, szybka i pozwala na

usuniecie szwów. Do jamy brzusznej podałem 900.000 j.m. *penicillinum procainicum* oraz 2 g *streptomycinum*.

Zwierzę wydano właścicielowi na 3 dzień w stanie ogólnym dobrym bez zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego.

Dnia 26.X.1964 r., wezwano mnie ponownie do tej samej jałówki, w celu rozwiązania powikłanego porodu. Wody płodowe częściowo odeszły przed 2 godzinami. Temp. — 38,5; tętno — 80/min.; oddechy — 35/min. Badaniem *per vaginam* stwierdziłem: znaczne przewężenie na pograniczu przedsonka pochwy a pochwą właściwą, jak również błoniastą przegrodę z kilkoma podłużnymi otworami (*hymen persistens*). Właściciel przypomina sobie, iż inseminator miał trudności z wprowadzeniem pipety inseminacyjnej. Do pochwy z trudnością udaje się wprowadzić dłoń. Szyjka maciczna była niezupełnie rozwarta. Zdecydowałem wykonać cesarskie cięcie i poleciłem krowę doprowadzić do P.Z.L.Z. odległego o 1 km. Ze względu na bardzo dobry stan ogólny jałówki, zabieg przeprowadziłem z miejscowym znieczuleniem na stojącym zwierzęciu z lewej strony. Wykonałem cięcie powłok brzusznych długości 35 cm rozpoczynające się około 5 cm do tyłu od dolnego kąta blizny po rumenotomii. Po otwarciu jamy brzusznej, skontrolowałem bliznę po rumenotomii, stwierdzając niewielki zrost żwacza z otrzewną ścienną. W zroście otorbiony ropień wielkości małego orzecha laskowego. Róg maciczny wprowadziłem do rany, wyprowadzając na zewnątrz jego część końcową. Cięciem długości 25 cm otworzyłem macicę, zgodnie z przebiegiem podłużnych włókien mięśniowych. Wydobyłem buhajka wagi około 35 kg, żywego w dobrym stanie. Natychmiast po podwiązaniu pępownicy podałem podskórnie cielakowi 30 ml surowicy Bovicolin oraz 30 ml surowicy Boviforin. Do macicy włożono 3 pałeczki *carbovet* oraz wsypano 3 g *detreomycyny*. Macicę szylem jedwabiem Nr 4, szwem dwupiętrowym Lemberta. Do mięśniówki macicy wstrzyknięto 20 j.V. hypofizyny. Łożysko odeszło po 6 godzinach. Na drugi i trzeci dzień podano pierwiastce po 250 ml polisulfamidu. Krowę wraz z cielęciem wydano właścicielowi na 4 dzień w dobrym stanie ogólnym. Operację wykonałem z lek. wet. Ryszardem Prostakiem. Operowałem z lewej strony, ponieważ chciałem sprawdzić zmiany pozostałe po rumenotomii.

Dwukrotna operacja z punktu widzenia ekonomicznego jest opłacalna. Całkowity koszt obu zabiegów wyniósł 1.100 zł, z czego 500 zł za rumenotomię zwróciło właścicielowi PZU. Koszt cesarskiego cięcia pokrywa wartość, jaką przedstawia cielę. Nie jest wykluczone, że poród następny może się odbyć, o ile krowa zajdzie w ciążę po cesarskim cięciu.

Adres autora: Włodzimierz Klaczyński, PZLZ Haczów pow. Brzozów.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

HENRYK KRACZKOWSKI

Chromatografia cienkowarstwowa i jej zastosowanie

Z Katedry Chemii Fizjologicznej Wydziału Wet. w Lublinie
Kierownik: prof. dr JÓZEF SKULMOWSKI

Metodę chromatografii adsorpcyjnej wprowadził w 1906 r. rosyjski botanik Cwiet. Rozdzielał on barwniki roślin na kolumnie wypełnionej węglanem wapniowym. Od tego czasu, przez okres kilkudziesięciu lat nie posługiwano się tym sposobem rozdzielania substancji. Dopiero gdy w 1931 r. Kuhn i Lederer (38) oraz Kuhn, Winterstein i Lederer (39) zastosowali metodę Cwietą do preparatyki barwników, rozpoczął się szybki rozwój chromatografii. Zastosowaniu tej techniki zawdzięczać należy wykrycie barwników liści roślin, flawonów

i innych naturalnych barwników. Badania te stanowiły początek chromatografii adsorpcyjnej na kolumnach. Metodę cwiętowską stosowano przede wszystkim do rozdzielu substancji lipofilnych. Chromatograficzny rozdział substancji hydrofilnych, wchodzących w skład połączeń białkowych, węglowodanów i kwasów nukleinowych umożliwiła dopiero chromatografia rozdzielcza, którą wprowadzili Martin i Synge (43). W dalszym etapie rozwoju chromatografii żel zastąpiono bibułą filtracyjną. Był to początek chromatografii bibułowej, a za-

początkowali ją *Consdan, Gordon i Martin* (13). Po otrzymaniu przez wspomnianych badaczy udanych rozdziałów aminokwasów nastąpił żywiołowy rozwój chromatografii bibułowej. Pewne trudności w chromatografii bibułowej nastęczało rozdzielanie substancji lipofilnych. Wprowadzenie chromatografii na warstwach adsorbenta usunęło te trudności i zapoczątkowało nową technikę chromatograficzną, znaną obecnie pod nazwą cienkowarstwowej lub płytkowej (niemiecka „Dünnschicht-Chromatographie”, angielska: „Thin layer chromatography”, „Chromatostrips”, „Chromatoplates”, francuska: „Chromatographie sur couches minces”, rosyjska: „Tonkoslojnaja chromatografija”). Chromatografię cienkowarstwową stosuje się zaledwie od kilku lat. Początków tej techniki można by doszukiwać się jeszcze w cwiętowskiej chromatografii kolumnowej. Odpowiednikiem kolumny jest cienka warstwa adsorbenta na płytce. Za pierwowzór chromatografii cienkowarstwowej mogą być uważane próby, które przeprowadzał w 1938 r. *Izmailow i Shraiber* (32) na płytkach powleczonych pastą tlenku glinu i wody. Pewne modyfikacje tej techniki wprowadził *Williams* (102). Dalszym etapem rozwoju tej metody są próby *Halla i Meinharda* (44). Zastosowali oni skrobię jako czynnik wiążący dla uzyskania większej trwałości warstwy. Równocześnie z *Meinhardem* i inni badacze, między innymi *Kirchner, Miller i Keller* (35, 36) oraz *Reitsem* (75) używali do analizy olejków wąskich płytek szklanych, pokrytych adsorbentem. Chromatografię cienkowarstwową stosowali ponadto: we Francji — *Demole* (19, 20), *Paris i Gordon* (55) oraz *Lederer*, we Włoszech — *Riganesie* (88), w Anglii — prócz *Reitsem*y również *Brygant* (10), *Bernhard* (7) i inni. Dynamiczny rozwój techniki chromatografii cienkowarstwowej rozpoczął się od badań *Stahla* (83), które stanowią przełom w rozpowszechnianiu tej techniki dla rozdziału i identyfikacji coraz większej ilości związków chemicznych. *Stahl* (87, 88, 89, 90 91) w wyniku systematycznych doświadczeń opracował dokładną technikę tej metody oraz ustalił zespół czynników, warunkujących otrzymanie powtarzalnych wyników. Dla tej metody podstawy teoretyczne opracowali *Brenner, Niederwieser i Pataki* (9). Bardzo interesujące i mające duże znaczenie są ich prace nad wpływem parametrów na współczynniki R_f .

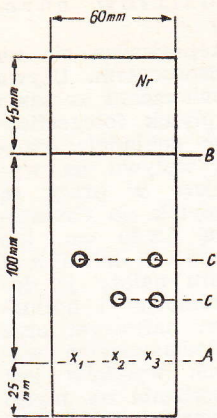
Technika chromatografii cienkowarstwowej.

W zależności od typów rozdzielanych związków chemicznych stosuje się różne adsorbenty, przeważnie nieorganiczne. Najczęściej używane są adsorbenty standaryzowane, produkowane przez firmy: E. Merck (Darmstadt — NRF), M. Woelm (Eschwege — NRF), Macherey, Nagel (Düren — NRF), Camag (Muttenz — Szwajcaria) i Fluka (Buchs Szwajcaria). Powszechnie stosuje się żel krzemionkowy (niem.: Kieselgel), tlenek glinu (niem.: Aluminium-oxid), ziemię okrzemkową (niem.: Kieselgur) i sproszkowaną celulozę, (niem.: Cellulosepulver). Są to adsorbenty czyste albo zawierające środek wiążący jak gips lub skrobię.

Adsorbenty przygotowane do innych technik chromatograficznych nie nadają się do chromatografii cienkowarstwowej. Jednym z warunków dobrego rozdziału jest odpowiednie, praktycznie sprawzone rozdrobnienie adsorbentu. Ostatnio firma Woelm wyprodukowała „uniwersalne” adsorbenty nadające się tak do chromatografii cienkowarstwowej, jak i kolumnowej. W kraju były próby produkcji adsorbentów dla tej techniki, lecz dotychczas nie przeprowadzono ich standaryzacji i nie wprowadzono na rynek. Znane są również liczne modyfikacje odmiany powszechnie stosowanych adsorbentów. Zestawy do techniki cienkowarstwowej produkują: f-ma Desaga (Heidelberg — NRF), Shandon (Londyn), Camag (Muttenz — Szwajcaria) i Warsztaty Konstrukcyjno-Naprawcze Akademii Medycznej w Lublinie.

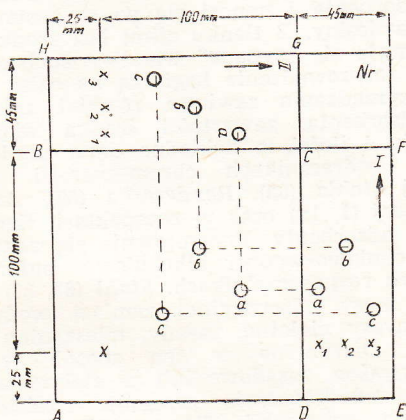
Przeprowadzanie rozdziałów chromatograficznych.

Rozdział chromatograficzny przeprowadza się na płytkach szklanych pokrytych adsorbentem. Używa się płytek o najrówniejszej powierzchni, ze szkła kryształowego, lustrzanego lub płytek fotograficznych. Brzezi płytek powinny być dokładnie oszlifowane. Grubość płytek nie ma wpływu na wyniki rozdziału, ale najwygodniejsze w pracy są o grubości 3—4 mm. Wymiary płytek do chromatografii jednokierunkowej wynoszą 6 x 20 cm. lub 6 x 17 cm, a do dwukierunkowej 20 x 20 lub 17 x 17 cm. Przed naniesieniem adsorbentu należy je dokładnie umyć w mieszaninie chromowej i odtłuścić alkoholem etylowym i eterem naftowym oraz przechowywać w eksikatorach. Podstawowym warunkiem otrzymania powtarzalnych wyników jest należyte naniesienie warstwy adsorbenta na płytki szklane. Sposób przyrządzania warstw zależy od rodzaju adsorbenta i nanosi się go w postaci proszku lub zawiesiny. Z tlenku glinu bez środka wiążącego formuje się „sypane” warstwy suchego proszku przez rozprowadzenie bagietką na całej płytce. Sposób przyrządzania zawiesin również zależy od rodzaju adsorbenta, zawartości środka wiążącego, jego rodzaju i ilości, a dokładne dane zamieszczone są w podręcznikach chromatografii cienkowarstwowej *Stahla* (83), *Randeratha* (67), *Achrema i Kuzniecovej* (1, 1a) oraz w prospektach firm produkujących adsorbenty. Przygotowuje się zawiesiny: wodne, alkoholowo-wodne, alkoholowe, buforowane lub w innych rozpuszczalnikach. *Stahl* (83, 86) wprowadził do masy adsorpcyjnej zamiast wody rozcieńczone kwasy nietłotne, zasady, mieszaniny buforujące itp. Otrzymane w ten sposób warstwy reakcyjne kwaśne, zasadowe lub ze stałym pH pozwalają na udoskonalenie procesów rozdzielczych i oczyszczania substancji. Ten sposób przyrządzania adsorbentów zastosowano w chromatografii cienkowarstwowej alkaloidów. Obecnie stosuje się wiele sposobów powlekania płytek szklanych zawieszoną adsorbenta, a nanoszenie przy użyciu ruchomego powlekaacza jest najczęściej stosowane i daje dobre wyniki. Ważną zaletą dobrego powlekaacza jest możliwość nastawiania i kalibrowania szczeliny, która umożliwia równomierne rozprowadzenie masy o jednolitej grubości na całej powierzchni płytki. Należy nadmienić, że adsorbenty produkcji f-my Woelm rozprowadza się na płytkach bez powlekaacza. Przy nakładaniu warstw za pomocą ruchomego powlekaacza umieszcza się płytki na szablonie winidurówym w pozycji poziomej. Na płytkę krańcową nakłada się powlekaacz, do jego rynienki nalewa przygotowaną zawieszinę adsorbenta i pokrywa płytki, które suszy się początkowo w temp. pokojowej, a następnie po zastaleniu adsorbenta, pozostawia w temp. pokojowej przez 12—24 godzin, lub aktywuje w suszarce w temp. 105—115° przez 15 minut. Sposób suszenia zależy od składu i rodzaju adsorbenta. Płytki pokrywane sproszkowaną celulozą bez gipsu należy aktywować. Przed naniesieniem badanego roztworu przygotowuje się płytkę, oznaczając miejsce naniesienia w odległości 2,5 cm od brzegów i zakreśla marginesy (Ryc. 1, 2), które wyznaczają drogę rozdziału, wynosząca około 10 cm od miejsca startu. Dłuższa droga rozdziału powoduje powstawanie rozlanych plam i tzw. „ogonów”. Na marginesy nanosi się roztwory substancji wzorcowych dla ułatwienia identyfikacji. Badaną substancję nanosi się na płytki za pomocą dokładnie kalibrowanych i wyciągniętych pipet, podobnie jak w chromatografii bibułowej. Rozwijanie przeprowadza się metodą: wstępująca — jedno- i dwukierunkowa, rzadziej soliwowa i horzontalna, np. krążkowa. Technika krążkowa stosuje się dla osiągnięcia szczególnie wyraźnego i ostrego rozdziału. Powszechnie stosowany sposób rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych przeprowadza się w ten sposób, że płytki szklane z naniesioną substancją wstawia się do komory chromatograficznej skośnie,



Ryc. 1. Chromatogram cienkowarstwowy o wymiarach płytki 6x17 cm. Rozwijany techniką jednokierunkową wstępującą.

A - linia startu
 B - " frontu układu rozwijającego
 C - środek plamy
 x_1, x_2, x_3 = miejsce naniesienia badanych subst.
 x_1, x_2 = pojedyncze substancje
 x_3 = mieszanina substancji x_1, x_2



Ryc. 2. Chromatogram cienkowarstwowy o wymiarach płytki 17x17 cm. Rozwijany techniką dwukierunkową wstępującą.

ABCD = chromatogram rozwijany techniką dwukierunkową w układzie nr 1 i 2
 CDEF = " " " jednokierunkową " nr 1
 BCGH = " " " " " nr 2
 I kierunek rozwijania w układzie nr 1
 II " " " nr 2
 x = punkt naniesienia mieszaniny badanych substancji (a, b, c)
 x_1, x_2, x_3 = punkt naniesienia substancji wzorcowych (a, b, c)
 a, b, c = plamy rozdzielone techniką dwukierunkową na chromatogramie ABCD i jednokierunkową CDEF i BCGH.

umieszczone w ramach szklanych pionowo lub horyzontalnie. Komorami są najczęściej szklane akwaria. Ścianki komory wykłada się wewnątrz bibułą filtracyjną i zwilża każdorazowo tuż przed wstawieniem płytek roztworem układu rozwijającego. Uzyskuje się w ten sposób stan przesycenia komory parami układu, nieodzowny w chromatografii cienkowarstwowej. Zanurzenie płytek wynosi 1 cm. Komory powinny być szczelnie zamknięte i nie otwierane w czasie trwania rozdzielania. Czas rozwijania zależy od układu, rodzaju adsorbenta, grubości warstwy, temperatury i wynosi średnio 60 do 150 minut. Przy powtórnych chromatografowaniu (rechromatografii) należy dolać do komory kilkadziesiąt ml układu. Po rozwinięciu chromatogramu i wyjściu z komory, płytki suszy się w suszarce w temperaturze odpowiedniej dla badanej substancji i stosowanego układu. Wysuszone płytki ogląda się w świetle ultrafioletowym, a jeśli rozdzielone substancje fluoryzują, plamy fotografuje się. Najczęściej stosowanym sposobem wywoływania jest równomierne spryskanie płytki właściwym odczynnikiem za pomocą rozpylaczy dających mgiełkę. Po kilku-nastu minutach obserwowania, w temp. pokojowej, powstających plam wstawia się płytkę do suszarki do pełnego wywołania plam. Długie ogrzewanie płytek nie jest wskazane, prowadzi bowiem do zaciemnienia tła, zatarcia konturów i zmiany barw plam. Wskazana jest rejestracja barw. Po pełnym wywo-

łaniu odrysowuje się plamy na kalce, a płytkę fotografuje. Niekiedy przeprowadza się stabilizację plam odpowiednimi odczynnikami. Dla dokumentacji chromatogramy utrwała się specjalnie przygotowanymi roztworami np. „Neatan” f-my Merck i otrzymuje je w postaci folii, które należy przechowywać w ciemnym miejscu, by zapobiec czernieniu tła i zanikaniu barw. Sposoby oznaczeń ilościowych są w chromatografii cienkowarstwowej podobne do stosowanych w chromatografii bibułowej. Stosuje się metody: półilościowe na podstawie pomiarów powierzchni plam, densytometryczne i elucji. Technika eluowania jest nieco inna, niż w chromatografii bibułowej. Plamy barwne, widoczne w świetle ultrafioletowym lub zabarwione wywoływaczem, obrysowuje się, żel zeszkrobuje do próbek, eluuje rozpuszczalnikiem, odwirowuje, w płynie znad osadu wywołuje reakcję barwną i przeprowadza ilościowe oznaczenia w kolorymetrze lub spektrofotometrze.

W ostatnich latach coraz częściej stosuje się rozdział elektroforetyczny na warstwach pokrytych adsorbentem oraz elektrochromatografię cienkowarstwową (31, 56, 57).

Technika cienkowarstwowa jest dużym postępem w porównaniu z chromatografią kolumnową i bibułą. Znajduje coraz szersze zastosowanie do badań w chemii, medycynie i biologii. Wprowadza się ją do badań coraz innych związków nieorganicznych i organicznych w botanice, farmakognozji i chemii farmaceutycznej, w farmakologii i biochemii, w badaniu leków i analizie klinicznej. Dotychczas stosowano chromatografię cienkowarstwową do rozdzielania i identyfikacji lipidów, aminokwasów i peptydów, alkaloidów, węglowodanów, zasad organicznych, witamin, terpenów, kwasów nukleinowych oraz jonów nieorganicznych. Na korzyść techniki cienkowarstwowej, w porównaniu z chromatografią bibułą, przemawiają następujące zalety: a) skrócenie czasu rozwijania z kilkunastu godzin do kilku, b) nanoszenie mniejszych ilości badanych substancji, co świadczy o większej czułości tej techniki, c) lepsze wyniki rozdzielania, otrzymanie plam zwartych i ostro odgraniczonych, d) wywoływanie odczynnikami agresywnymi, zawierające stężone kwasy i zasady, e) uzyskiwanie lepszej powtarzalności współczynników Rf, f) wpływanie na zmianę środowiska warstwy przez sporządzanie zawiesin z kwasami, zasadami lub roztworami buforowymi, g) dowolność przy doborze składników dla przygotowania masy do powlekania, przez co eliminuje się impregnację stosowaną niekiedy w chromatografii bibułowej, h) wprowadzanie do warstw adsorbenta indykatorów lub substancji fluoryzujących, i) połączenie z techniką izotopową dla zwiększenia czułości oznaczeń, j) zastosowanie odpowiednich dodatków do warstw tzw. stero-selektynywnych adsorbentów dla rozdzielania izomerów przestrzennych, k) stosowanie w mikro- i makro-preparatyce, l) stosowanie do seryjnych badań analitycznych, ł) stosowanie różnych adsorbentów i ich mieszanin, m) większa dokładność w oznaczeniach ilościowych, n) lepsze wyniki utrwalenia dla celów dokumentacji, o) dowolność w zmianie warstwy adsorbenta.

Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej w analizie.

Rozdział aminokwasów i peptydów przeprowadza się zazwyczaj na warstwach żelu krzemionkowego z gipsem, a aminokwasów w postaci soli na buforowanych warstwach czystego żelu krzemionkowego. Pochodne aminokwasów, peptydy i proteiny rozdziela się na warstwach Sephadex G-25. Płytki powlecone żelem krzemionkowym z gipsem aktywuje się w temp. 110° przez 15 minut. Zakres stężeń poszczególnych aminokwasów waha się w granicach od 1-5 µg (34, 53, 60, 61). Do rozdzielania aminokwasów stosuje się układy używane również w chromatografii bibułowej techniką jedno- lub dwukierunkową. Rozwinięte chromatogramy suszy się, na-

stepnie wywołuje 0,2% roztworem minhydriny w metanolu, a powstałe barwy stabilizuje roztworem azotanu miedziowego w bezwodnym etanolu.

Zastosowanie techniki chromatografii cienkowarstwowej dla aminokwasów wykazało, że jest znaczne obniżenie dolnej granicy wykrywalności oraz wybitne skrócenie czasu rozwijania (z 40 do 5 godzin) w porównaniu z techniką bibułową. Potwierdzeniem ułatwienia rozdzielania jest szereg prac (34, 53, 61, 101) odnoszących się do wykrywania i identyfikacji aminokwasów we krwi, moczu i spermie. W badaniach nad aminoacidurią, na płytce wystarczy nanieść 10 μ l moczu, podczas gdy dla uzyskania takiego samego rozdzielania na bibułę nanosi się od 50 μ l wżwyz. Ponadto odsalanie moczu, niezbędne a czasochłonne i dające wielkie straty w chromatografii bibułowej, w tej technice jest zbędne. Do rozdzielania aminokwasów stosuje się również tlenek glinu bez środka wiążącego (101) i sproszkowaną celulozę (54, 60). Na warstwach celulozy MN-300 rozdzielono 15 aminokwasów (103), a dobry rozdział kilkunastu aminokwasów otrzymano na warstwach żelu krzemionkowego z gipsem, wytrąsniętych z buforem fosforanowym (50) oraz na warstwach sypanego tlenku glinu (46, 47). Chromatografia cienkowarstwowa wykazała swoją wyższość nad bibułową przy rozdzielaniu i identyfikacji zarówno DNF-, jak i PTH-aminokwasów (59, 101). Na żelu krzemionkowym rozdzielać można dwunitrofenylo-pochodne wszystkich aminokwasów, zarówno rozpuszczalnych, jak i nierozpuszczalnych w wodzie i kwasach. Rozdzielanie na warstwach adsorbenta okazało się bardzo użyteczne dla pochodnych indolowych (54), lepsze na płytkach powleczonych żelem niż celulozą. Technika cienkowarstwowa oznaczano sekwencję aminokwasów w peptydach (61), a dobre wyniki otrzymano dla pochodnych peptydów w reakcji z fenyloizocjanianem (60). W technice cienkich warstw, przy rozdzielaniu peptydów na żelu krzemionkowym nanosi się badane substancje rzędu 0,01 mikromola, podczas gdy w bibułowej średnio 1 mikromol, a tylko niekiedy 0,1–0,2 mikromola (12).

Rozdzielanie cukrów metodą chromatografii cienkowarstwowej daje lepsze rezultaty niż bibułowej, ponieważ w czasie rozwijania na bibule mieszaniny cukrów mogą ulegać rozkładowi. Do rozdzielania stosowano wszystkie znane adsorbenty w odpowiednio dobranych układach. Dla otrzymania dobrych rozdzielania należy stosować dla tej samej mieszaniny cukrów rozwijanie na różnych adsorbentach i w kilku układach. Wyraźne rozdziały jedno-, dwu-, i trójcukrów otrzymano na warstwach ziemi okrzemkowej z gipsem, wytrąsniętej z octanem sodowym. Stosowano również żel krzemionkowy z gipsem (18), żel wytrąsnięty z kwasem bornym (58) oraz mieszaninę żelu krzemionkowego z gipsem i tlenku glinu z gipsem, znaną pod nazwą „Alusil”, na których rozdzielano jedno-, dwu-, i trójcukry, alkoholo-cukry, amino-cukry, kwasy cukrowe, fenylhydrazon, kwas neuraminowy i inozytyle. Stosowanie odpowiednio dobranych układów pozwala rozdzielić na tych adsorbentach glukozę od fruktozy i od sacharozy oraz sacharozę, glukozę i fruktozę. Na aktywowanych warstwach sproszkowanej celulozy MN-300 z domieszką gipsu lub bez gipsu rozdzielają się, przy dwukrotnym chromatografowaniu, prawie wszystkie cukry. Najlepsze wyniki otrzymano techniką *Matthiasa* (8) na warstwach żelu z gipsem oraz na warstwach celulozy z gipsem. Zidentyfikowano sacharozę, d-melibiozę, maltozę, laktozę, melecytozę, rafinozę, mannozę, arabinozę, likozę i ribozę. Na tlenku glinu czystym i z domieszką gipsu rozdzielono monosacharydy i fenylhydrazon, a na czystym gipsie pentozy i heksozy. Ostatnio zastosowano proszek poliamidowy (perlon) i rozdzielono 14 glikozydów (31). Po rozwinięciu i wysuszeniu, chromatogram ogląda się w świetle ultrafioletowym, a następnie wywołuje odczynnikami, jak: aldehydem anyżkowym (93),

naftorezorcyną (58, 27, 63), ftalanem aniliny (15, 45), azotanem srebrnym (18), odczynnikami rezorcynowo-orcynowym i innymi (2, 37, 58). Technika cienkowarstwowa pozwala na przeprowadzenie oznaczeń ilościowych przez wywołanie plam stężonym kwasem siarkowym, eluowanie i kolorymetrowanie (21) lub przez „mokre” spalanie adsorbenta z dodatkiem dwuchromianu potasowego i kwasu siarkowego oraz odmiareczkowanie dwuchromianu (33, 58).

Chromatografię cienkowarstwową stosowano najczęściej do rozdzielania substancji lipidowych z uwagi na możliwość stosowania drastycznych wywoływaczy. Do ich rozdzielania używa się powszechnie stosowanych adsorbentów, a sposób przygotowania zawiesin jest taki jak dla innych związków. Rozdział chromatograficzny można przeprowadzać również na płytkach impregnowanych, a impregnacja pozwala na uzyskanie lepszych rozdzielaw substancji. Impregnację przeprowadza się przez zanurzenie płytki w odpowiednich roztworach. Do rozdzielania stosuje się żel krzemionkowy ze środkami wiążącymi, jak gips lub skrobia, tlenek glinu i ziemię okrzemkową (3, 41, 67, 105) oraz celit z gipsem (105). Lipidowe ekstrakty z krwi rozdzielano na żelu krzemionkowym z gipsem a chromatogramy wywoływano trójchlorkiem antymonu i identyfikowano w świetle ultrafioletowym. Rozdzielanie w kilku układach doprowadziło do identyfikacji około 30 lipidów i produktów ich hydrolizy (28). Lipidy surowicy krwi rozdzielano na tlenku glinu, jak również fosfolipidy, cholesterol i glicerydy (74). Na warstwach żelu krzemionkowego z gipsem rozdzielano lipidy tkanki nerwowej (29) frakcje lipidowe z mięśni bydła (97) oraz glikolipidy i fosfatydy (98). Udało się również rozdzielić sterydy (6). Uniwersalnymi wywoływaczami lipidów są: błękit bromotymolowy z kwasem bornym i wodorotlenkiem sodowym, błękit bromotymolowy z wodorotlenkiem sodowym, chlorek antymonu i inne. Granice wykrywalności leżą między 0,1 a 1,0 mikrograma. Do wykrywania sterydów stosuje się 50% kwas siarkowy i bezwodnik kwasu octowego. Oznaczenia ilościowe lipidów przeprowadza się metodami densytometrycznymi (64, 65).

Zastosowanie techniki cienkowarstwowej do badań nad alkaloidami doprowadziło do rozdzielania i identyfikacji około 54 alkaloidów (99). Ułatwieniem w ich wykrywaniu jest stosowanie wywoływaczy zawierających stężone kwasy, których nie można używać w chromatografii bibułowej. Ze względu na dużą ilość znanych alkaloidów, a dla doboru odpowiedniego układu i adsorbenta, dokonuje się wstępnie rozdzielaw, pozwalających zaliczyć badane substancje do grupy o Rf niżej lub powyżej 0,30. Rozdział przeprowadza się na warstwach żelu krzemionkowego z gipsem (99, 100), a Rf określa przy pomocy wskaźników Rodaminy B lub żółcieni masłowej. Zasadniczy rozdział alkaloidów obu grup przeprowadza się na żelu krzemionkowym z gipsem, żelu krzemionkowym zasadowym i tlenku glinu z gipsem w odpowiednio dobranych układach dla danego adsorbenta. Rozdzielone alkaloidy wywołuje się odczynnikami jodoplatynowym (76, 99). Dokładną identyfikację nieznanego alkaloidu przeprowadza się przez rozwinięcie chromatogramu w kilku układach, typowych dla danej grupy i stosowanie specyficznych reakcji barwnych. Dla większości alkaloidów występują duże zróżnicowania barw. Rozdzielono alkaloidy grupy opium, tropanu, indolowe, ipekakuany, belladonna, opium, rauwolfii, sporyszu, strychniny, chininy oraz pseudoalkaloidy purynowe. Do rozdzielaw alkaloidów stosuje się ponadto żel krzemionkowy z gipsem wytrąsnięty z buforem fosforanowym, celulozę sproszkowaną z formamidem, a wywołuje odczynnikami Drogen-dorffa (48) i jodoplatynianem (76, 99), oraz kwasem nadchlorowym z chlorkiem żelazowym i innymi specyficznymi odczynnikami (96). Chromatografia

cienkowarstwowa jako „szybka” metoda oddaje specjalnie cenne usługi w toksykologii i w badaniach takich środków leczniczych, co do których zachodzi obawa, iż zawarte w nich alkaloidy w czasie sterylizacji mogą ulegać rozkładowi. Prócz obszernej omówionych związków chemicznych stosowano chromatografię cienkowarstwową do rozdzielania całego szeregu innych substancji, przeprowadzając również oznaczenia ilościowe. Rozdzielano i identyfikowano: kwasy nukleinowe i nukleozydy na warstwach celulozy, na celulozie z wymiennikami jonowymi i celulozie z proszkiem polietylenowym (68, 69, 70, 71, 72, 73), hormony sterydowe na żelu krzemionkowym (1, 1a, 5, 16), karotenoidy na żelu krzemionkowym (20, 88, 92), tokoferole na tlenku glinu lub żelu krzemionkowym (77), witaminy grupy B i C na żelu krzemionkowym z dodatkiem indykatorów fluoryzujących (24), witaminy grupy B₆ i PP na żelu krzemionkowym (51), flawonoidy na proszku poliamidowym (17, 66), insektycydy na tlenku glinu i żelu krzemionkowym (4, 23), trójterpenoidy (95), antyoksydanty (78), fenole i fenoletery na żelu krzemionkowym (20, 25, 58, 92), aminy na buforowanym żelu krzemionkowym i na proszku celulozowym (30, 49, 94), tworzywa sztuczne i plastyfikatory na żelu

krzemionkowym z indykatorami fluoryzującymi (14), leki recepturowe na żelu krzemionkowym (40), barbiturany, pochodne fenotiazyny, pirazononu, sulfonamidy na żelu krzemionkowym lub żelu buforowanym (22, 26, 40, 51, 104), związki nieorganiczne (kationy i aniony) na żelu krzemionkowym z gipsem lub na żelu ze wskaźnikiem fluoryzującym. Liczni badacze wykazali, że czas rozdzielania związków nieorganicznych w porównaniu z chromatografią bibulową skrócony został z 13 do 2 godzin (79, 80, 81). Dokonany w ogólnych zarysach przegląd osiągnięć chromatografii cienkowarstwowej dowodzi, że technika ta bardzo rozwinęła się w ostatnich pięciu latach i znalazła w wielu dziedzinach szerokie zastosowanie. Istnieją nadal możliwości udoskonalania techniki tej metody, wprowadzenia nowych modyfikacji zarówno w doborze adsorbentów i odczynników wywołujących, w składzie układów rozwijających, jak i w oznaczeniach ilościowych.

Piśmiennictwo u autora.

Adres autora: dr Henryk Kraczkowski, Lublin, ul. Pstrońskiego 8.

COLLOQUIUM MEDICUM

PYTANIE I:

Czy buhaje wystawiane na wystawie hodowlanej muszą posiadać świadectwa zdrowia wystawiane przez lekarza wet.?

Czy buhaje nieplodne, lub obustronne wnętrza mogą znajdować się na wystawie hodowlanej ogólnokrajowej i czy mogą być nagradzane przez komisje pracujące na tej wystawie?

Stawiam te pytania dlatego, gdyż spotkałem kilku tzw. hodowców, którzy twierdzą, że na wystawach ocenia się zwierzęta w zależności od pochodzenia, budowy i pielęgnacji. — inne momenty nie mają decydującego wpływu. Ja nie mogłem się z tym zgodzić, gdyż uważam, że najważniejszym kryterium do uznania zwierzęcia, w tym wypadku buhaja, za sztukę hodowlaną, jest zdrowotność i zdolność do rozrodu. Te dobre cechy hodowlane posiadane w rodowodzie trzeba jakoś przekazać dalej.

W. S.

ODPOWIEDŹ:

Zagadnienie jest uregulowane regulaminem Nr PZb III 18/3/65 dokonywania oceny bydła oraz nagradzania hodowców na wystawach, pokazach lub aukcjach hodowlanych. Departament Produkcji Zwierzęcej Ministerstwa Rolnictwa rozesłał regulamin w formie odbitek powielanych.

Stosownie do § 1 tego regulaminu:

I. Zwierzęta biorące udział w wystawach wojewódzkich i pokazach powiatowych muszą posiadać świadectwa zdrowia, stwierdzające, że są one wolne od gruźlicy, brucelozy oraz chorób zakaźnych.

II. Buhaje biorące udział w aukcji muszą posiadać:

1. Urzędowe świadectwo pochodzenia wystawione przez wojewódzką stację oceny zwierząt, przy czym pochodzenie buhajów dla PZUZ musi być sprawdzone w oparciu o badanie grup krwi.

2. Świadectwo zdrowia wystawione przez powiatowego lekarza wet., że buhaje są wolne od:

a) gruźlicy (trzykrotna tuberkulinizacja i badanie kliniczne z wynikiem ujemnym, a w zakresie buhajów pochodzących z obór uznanych urzędowo za wolne od tbc — jednokrotna tuberkulinizacja i badanie kliniczne z wynikiem ujemnym),

b) od brucelozy (trzykrotne badanie krwi i nasienia w odstępach nie krótszych, niż 30 dni, a w zakresie buhajów z obór uznanych za wolne od brucelozy — badanie jednokrotne),

c) od zarazy rzeżączkowej i mętlikowej.

Buhaje nieplodne czy wnętrza nie powinny się znajdować na wystawie, a tym bardziej nie powinny być nagradzane. Buhaje takie nie mogą być przede wszystkim uznane (§ 4 ust. 1 w związku z § 8 ust. 2 rozporządzenia Ministra Rolnictwa z dnia 5.VI.1962 r. w sprawie uznawania buhajów za odpowiednie do hodowli — Dz. U. Nr 38, poz. 168). M. in. obowiązkiem lekarza wet. wchodzącego w skład komisji kwalifikacyjnej uznającej buhaje za odpowiednie do hodowli jest zbadać buhaje klinicznie ze szczególnym zwróceniem uwagi na choroby i zmiany organiczne mające wpływ na zdatość buhaja do rozrodu i wyrazić swą opinię co do anatomicznej prawidłowości budowy buhaja (ust. 5 instrukcji Nr 1 Ministerstwa Rolnictwa z dnia 12.I.1963 r. w sprawie nadzoru nad zdrowotnością buhajów — Dz. Urz. Min. Roln. Nr 5, poz. 22). Po nieuznaniu buhaj powinien być wytrzebiony w ciągu 2 tygodni, co już ma się rozumieć wyklucza posłanie go na wystawę.

PYTANIE II:

Zwracam się z zapytaniem, czy nie należałoby zmienić rozliczeń remanentowych, bo w naszym powiecie i przypuszczalnie tak jest w całym kraju, że za każdy brak w biopreparatach czy środkach farmaceutycznych i ujawniony przy remanencie obciążony za składowanie musi płacić. Jeżeli jest natomiast jakakolwiek nadwyżka dolicza się ją na poczet zakładu. Uważam, że PZLZ nie jest sklepem, aby się można rozliczyć co do złotówki. Tym bardziej, jeśli jest kilku pracowników w danym zakładzie i każdy ma dostęp do leków. Moim zdaniem powinna być dopuszczalna suma niedoborów do wysokości 300 zł, za które osoba odpowiedzialna za składowanie nie powinna płacić.

J. D. w S.

ODPOWIEDŹ:

Poruszone zagadnienie zostało ostatnio tymczasowo unormowane pismem okólnym Nr 11 Min. Roln. — Dep. Weterynarii z dn. 7.XII.1964 r. w sprawie cen leków weterynaryjnych i normatywu zapasów leków (rozesłano do wszystkich PZWet. w formie odbitek