

MILADA VÁVROVA, ANTONIN MIKULIK, MIROSLAV DOBES

Zastosowanie metod chromatograficznych do analizy żywności i surowców zwierzęcego pochodzenia

Z Katedry Higieny i Technologii Żywności Wyższej Szkoły Weterynaryjnej w Brnie (CSSR)

Chromatografia jest wysoce skuteczną metodą rozdzielczą, opierającą się na postępującym, wielokrotnym ustalaniu szeregu fazowych równowag poszczególnych jednostek analizowanej mieszaniny między dwiema wzajemnie nie mieszającymi się fazami, pozostającymi wobec siebie we względnym ruchu. Rozdział chromatograficzny można dokonywać tak w fazie gazowej, jak i w ciekłej.

Na podstawie stanu skupienia fazy wyróżnia się chromatografię gaz — ciecz, gaz — ciało stałe, ciecz — ciecz oraz ciecz — ciało stałe. Z punktu widzenia charakteru sił rozdzielczych wyróżniamy cztery główne typy chromatografii: adsorpcyjną, rozdzielczą, jonowymienną oraz na sitach molekularnych.

Według techniki rozwijania rozróżniane są następujące typy chromatografii: wymywania (elucyjna), rugowania i analiza czołowa (8). Do celów analitycznych najdogodniejszą jest chromatografia elucyjna (10).

W analizie żywności największe zastosowanie ma chromatografia adsorpcyjna, a zwłaszcza chromatografia cienkowarstwowa, gdzie fazą ruchomą jest ciecz a fazą stacjonarną ciało stałe, oraz chromatografia gazowa, gdzie fazą ruchomą jest gaz a fazą stacjonarną ciało stałe (9, 10).

W badaniach własnych metody chromatograficzne zastosowane zostały do analizy tłuszczów, zwłaszcza oznaczania estrów metylowych kwasów tłuszczowych a następnie wykorzystania chromatografii cienkowarstwowej i gazowej do analizy pozostałości obcych substancji (2, 3, 11, 12, 13, 14, 18, 21, 22). Ponieważ metody chromatograficzne zastosowano do materiału biologicznego, koniecznym było sprawdzenie postępowania w zakresie oczyszczania i wyosabniania wymienionych związków z materiału biologicznego.

Przygotowaniem próbek do analizy kwasów tłuszczowych z materiału biologicznego zajmowało się szereg autorów. Opracowano kilka ekstrakcyjnych i estryfikowanych postępowań, zawsze z uwzględnieniem tych kwasów, które oznaczano z mniejszą lub większą liczbą atomów C w drobinie (1, 4, 5, 7, 16). Wszystkie są czasochłonne, gdyż kładzie się w nich nacisk na dobre oddzielenie poszczególnych pasm.

Do analizy substancji obcych, zwłaszcza chlorowanych węglowodorów, metody chromatograficzne były używane z dużym powodzeniem. W badaniu ich pozostałości ważnym jest, żeby

zastosowana metoda była selektywna i specyficzna, ponieważ związki te znajdują się w materiale biologicznym w bardzo małych ilościach. Stąd też opracowano warianty oczyszczających postępowań dla wszystkich produktów żywnościowych (6, 19). Właściwe postępowania izolacyjne i oczyszczające są konieczne, zwłaszcza dla tych produktów żywnościowych które zawierają wysoki procent tłuszczów; wiadomym jest bowiem, że pozostałości chlorowanych węglowodorów deponują się przede wszystkim w tkance tłuszczowej (17).

Rozdzielanie chlorowanych węglowodorów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, która jest wystarczającą dla zwykłego stwierdzenia ich poziomu, opracował szczegółowo Szoklay i wsp. (19). W metodzie tej istotną rolę odgrywa jakość używanych rozpuszczalników, które muszą być przed użyciem redestylowane.

Ostatnio stosowaną metodą analityczną, używaną w analizie obcych związków, jest chromatografia gazowa, która znalazła szerokie zastosowanie zwłaszcza po wprowadzeniu EC wywołaczy. Ten wysoce selektywny detektor umożliwia oznaczenie nawet stężenia 10^{-14} g (15).

W analizie ważny jest odpowiedni wybór fazy stacjonarnej, a zwłaszcza właściwy dobór ruchomych faz, które umożliwiają rozdzielanie wszystkich izomerów lub metabolitów.

Materiał i metody

Przed właściwą analizą tłuszczu wszystkie próbki materiału biologicznego były homogenizowane, a mierzona 5 g roztarta z bezwodnym Na_2SO_4 p.a. Dla oznaczenia zawartości kwasów tłuszczowych w śmietanie (12%) i białej śmietanie (33%) zamiast bezwodnego siarczanu sodu użyto tlenku krzemu. Tak przygotowane próbki ekstrahowano bądź eterem dwuetylowym, bądź mieszaniną chloroform — metanol (1:1). Zmydlania dokonywano częściowo zmodyfikowaną metodą Formana (4) i Ingra (7), które opierają się na zmydłaniu próbek 30% KOH w alkoholu etylowym i wytrząsaniu kwasów tłuszczowych eterem naftowym lub eterem dwuetylowym. Estryfikację przeprowadzono metodą Rogozińskiego (16).

Oznaczenie poziomu kwasów tłuszczowych przeprowadzano w chromatografii gazowej Chrom IV, w następujących standardowych warunkach: długość kolumny 3 m, średnica 3 mm, zawartość kolumny 15% PEGA na Chromosorbie N, temp. kolumny 190°C , temp. iniektora 230°C , temp. detektora 205°C , gaz nośny N_2 , przepływ N_2 45 ml/min.

W dalszej części pracy zamierzaliśmy zmodyfikować metody oznaczania pozostałości obcych substancji i kwasów tłuszczowych w mięsie, wątrobie i tłuszczu świń, bydła i bażantów. Naważka zhomogenizowanej próbki wahała się od 10 do 20 g, próbka była powtórnie rozcierana z bezwodnym Na_2SO_4 p.a.

Zastosowaliśmy kilka oczyszczających postępowań: eter naftowy — acetonitryl i heksan — acetonitryl, oczyszczanie na kolumnie stężonym kwasem siarkowym oraz na kolumnie wypełnionej aktywowanym florizilem. W cienkowarstwowej chromatografii używano kilka układów rozwijających z heksanem, n-heptanem oraz układy mieszane w różnych stosunkach.

Potwierdzono także dwa sposoby wykrywania pozostałości na płytkach chromatograficznych, a to z dwufenylaminą w absolutnym alkoholu oraz roztworem AgNO_3 w acetonie z dodatkiem 2-fenoksyetanolu.

Pomiary metodą chromatografii gazowej dokonywane były na aparacie Varian AG, typ Pestilizer, model 2740-30, przy użyciu Sc^3H EC wywoływacza, temp. wywoływacza 245°C , temp. iniektora 235°C a temp. kolumny 195°C . Kolumny były napełniane bądź 5% DC na Varaporcie 30, 100—200 mesh, ewentualnie 1% QF + 5% OV 101 lub 3% QF 1 + 3% DC 200 + 1% OV 101, także na Varaporcie 30, 100—200 mesh. Jako nośny gaz, tzn. ruchomą fazę, użyto azotu, przepływ N_2 30—40 ml/min., który był oczyszczany na sicie molekularnym.

Wyniki i dyskusja

Dla uzyskania właściwych rezultatów analitycznych najważniejszym jest przygotowanie biologicznego materiału, zwłaszcza produktów żywnościowych o wysokiej zawartości tłuszczu, ponieważ niewłaściwie dobrane postępowanie oczyszczające i ekstrakcyjne może doprowadzić do poważnego zniekształcenia wyników oraz do znacznego błędu właściwego oznaczenia. Już podczas homogenizacji próbek należy koniecznie postępować tak, aby średnie próbki, które są pobierane z homogenatu, zawierały w sobie wszystkie właściwości próbek indywidualnych.

We własnej pracy stosowaliśmy przed właściwą ekstrakcją rozcieranie próbek z bezwodnym siarczanem sodu p.a., morskim piaskiem, ewentualnie siloksidem (tlenkiem krzemu). Związki te (które z próbki odcinają wodę) muszą być analitycznie czyste i jest wskazane, aby je uprzednio oczyścić rozpuszczalnikami używanymi w analizie, żeby zapobiec błędowi przy właściwym analitycznym oznaczeniu. Ekstrakcji dokonywano redestylowanym eterem naftowym p.a., w czasie 24 godzin przy nieustannym przepływie rozpuszczalnika. Sposób ten był najdogodniejszy i przy jego stosowaniu uzyskano największą wydajność.

Dalszą fazą jest tzw. oczyszczanie eterem naftowym — acetonitrylem. Oprócz eteru naftowego można stosować dimetylformamid. Do analizy chlorowanych węglowodorów dogodniej jest używać eteru naftowego, co doradza również Szokolay (19). W próbkach zawierających małe ilości tłuszczu (poniżej 10%) ten etap oczyszczania nie jest konieczny i można przystąpić bezpośrednio do oczyszczania na kolumnie.

Sprawdzaliśmy dwa typy kolumn. Najpierw florizil aktywowany przy 300°C , który jest w piśmiennictwie najbardziej zalecany, a następnie kolumnę wypełnioną krzemionką, nasyconą 10% kwasem siarkowym. Obydwa oczyszczające postępowania wykazały jednakową wydajność, tj. 90—95%; sądymy jednak, że oczyszczanie florizilem jest wygodniejsze z punktu widzenia czasu przygotowania kolumny, który przy użyciu

krzemionki jest dwukrotnie dłuższy. Należy również brać pod uwagę, że przygotowywanie kolumny ze stężonym kwasem siarkowym jest niewygodne także i z punktu widzenia bezpieczeństwa.

Po oczyszczeniu w kolumnie próbkę zagęszczano w rotacyjnym podciśnieniowym parowniku, a osad rozpuszczano w określonej ilości rozpuszczalnika i w ten sposób bezpośrednio przygotowywano bądź do analizy cienkowarstwowej lub chromatografii gazowej.

Tab. 1. Chromatografia cienkowarstwowa z różnym oczyszczaniem poprzedzającym na kolumnie

	Wydajność %	Czułość mg/kg	Granica oznaczalności g	Izomery i metabolity
Kolumna florizilowa	85—95	0,05—0,1	10^{-6}	p,p'-DDT DDE, γ -HCH, β + δ -HCH HCB
Kolumna krzemionkowa nasyc. 10% H_2SO_4	80—90	0,1	10^{-6}	dtto

Weryfikowaliśmy również postępowanie zalecane przez Hruškę i Kocianovą (6), które polega na ekstrakcji dwuetylenem, odparowaniu rozpuszczalnika i rozpuszczeniu uzyskanego tłuszczu w określonej ilości eteru naftowego. Dalej następowało oczyszczanie w kolumnie florizilowej. Metoda ta okazała się szczególnie przydatna do mięsa, wątroby i wyrobów mięsnych o małej zawartości tłuszczu. Przy analizie słoniny, łożu oraz wyrobów z zawartością tłuszczu większą niż 15%, dochodziło do niedostatecznego oddzielania składników tłuszczowych. Ten mankament metody zależny był w dużym stopniu także od serii użytego florizilu, gdyż stwierdzono, że ich jakość była różna, a niektóre i po aktywowaniu przepuszczają tłuszcz.

W naszej pracy całkiem przydatną okazała się metoda chromatografii cienkowarstwowej, opisana przez Szokolay'a (19), która nadawała się do każdego rodzaju badanego materiału. Sprawdzaliśmy kilka układów rozwijających i doszliśmy do wniosku, że najlepsze wyniki osią-

Tab. 2. Chromatografia gazowa z poprzedzającym oczyszczaniem na kolumnie

	Wydajność %	Czułość $\mu\text{g/kg}$	Granica oznaczalności g	Izomery i metabolity
Kolumna florizilowa	95	0,001	$5-10^{-11}$	o, p'-DDT p, p'-DDT DDE, DDD α , β + δ , γ -HCH, HCB

gnęliśmy przy dwukrotnym rozwijaniu n-heptanem. Za najdogodniejszy odczynnik wywołujący uznaliśmy roztwór AgNO_3 w acetonie z dodatkiem 2-fenoksyetanolu (firmy Fluka). Przy użyciu tej metody osiągnięto czułość 0,05–0,1 mg/kg.

Najbardziej selektywną metodą chromatograficzną do oznaczania chlorowanych węglowodorów była chromatografia gazowa. Dla rozdzielania wszystkich izomerów HCH (heksachlorcykloheksan) jako najdogodniejszą okazała się mieszana kolumna wypełniana 3% DC 200 + 2,5 QF 1 + 1% OV 101. Kolumna ta rozdziela dobrze również metabolity DDT. Stosunkowo dogodną i dobrze oddzielającą od siebie pozostałości HCH i HCB (heksachlorbenzen) była mieszana kolumna 3% QF 1 + 2,5% OV 101, na której nie rozdzielają się jednak izomery δ i β HCH. Jest to wadą metody, biorąc pod uwagę, że izometr β stanowi 30% technicznego HCH. Kolumny, które zawierają tylko 1 ruchomą fazę, są mniej przydatne. W naszych oznaczeniach pozostałości chlorowanych węglowodorów osiągnęliśmy czułość $5 \cdot 10^{-11}$, co jest wystarczające dla materiału biologicznego. Dla przejrzystości i dobrej oceny użytych przez nas metod, podajemy w następujących tabelach wydajność poszczególnych metod, ich czułość i liczbę oznaczonych metabolitów i izomerów.

Tab. 3. Zastosowane kolumny w chromatografii gazowej

1. 3% DC 200 + 2,5% QF 1 + 1% OV 101	— rozdziela wszystkie metabolity DDT i wszystkie izomery HCH
2. 3% QF 1 + 2,5 % OV 101	— rozdziela wszystkie metabolity DDT; nie dzieli β i δ izomerów HCH
3. 3% DC 200	— rozdziela wszystkie metabolity DDT; nie rozdziela α HCH i HCB; β i δ izomerów HCH.
4. 3% QF 1	— nie rozdziela o,p'-DDT i DDD oraz nie rozdziela wszystkich izomerów HCH

W dalszej części pracy zajmowano się oznaczaniem poziomów kwasów tłuszczowych, przede wszystkim podstawowych, w mięsie, wyrobach mięsnych i tkance tłuszczowej. W pracy stosowaliśmy podwójną ekstrakcję tłuszczu z biologicznego materiału, tj. bądź eterem dwuetylowym, a następnie mieszaniną chloroform-metanol w stosunku 1 : 1. Stwierdzono, że ilość wyekstrahowanego tłuszczu jest większa w drugim przypadku, kiedy nie ekstrahuje się tylko wolny tłuszcz, ale i dokonuje rozdzielenia poszczególnych lipidów. Po ekstrakcji następowało zmydlanie, przy czym najbardziej przydatnym okazał się 30% etanolowy KOH. Zmydlania dokonano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w czasie 1 godziny. Dalszym etapem było wytrząsanie uwolnionych kwasów tłuszczowych z

eterem naftowym, odparowanie rozpuszczalnika i estryfikacja. W naszych oznaczeniach stosowaliśmy estryfikację przy pomocy metanolu i H_2SO_4 . Ostatnim etapem było ponowne wytrząsanie z eterem naftowym i zagęszczenie do objętości odpowiedniej do wstrzykiwania do chromatografu. Do wytrząsania próbowaliśmy stosować także eter dwuetylowy, z którego jednak zrezygnowaliśmy, zwłaszcza z punktu widzenia bezpieczeństwa, a także dlatego, że każda użyta seria ma odmienne właściwości. Wydajność podanej metody wynosiła 85%, co jest wystarczającym dla materiału biologicznego.

Podane postępowanie oczyszczające, ekstrakcyjne i izolacyjne są czasochłonne. Ponieważ jednak dla stwierdzenia zawartości wyższych nienasyconych kwasów tłuszczowych jest konieczne, aby procesy utleniania i hydrolizy tłuszczu były jak najbardziej ograniczone, pracujemy na dalszą modyfikację metody, która umożliwi przygotowanie i analityczne oznaczanie próbek jeszcze tego samego dnia. Te szybkie metody są jednak stosunkowo mało wydajne (od 30–90%); ma to istotne znaczenie, gdyż takie kwasy, jak linolenowy, arachidowy oraz wyższe nienasycone kwasy tłuszczowe z liczbą węgli większą niż 20, występują w produktach żywnościowych zwykle w małych ilościach, stąd też szybkie metody wymagają dokładnego sprawdzenia. Właściwe oznaczanie na chromatogramie gazowym jest łatwe, a odczytywanie danych dokonuje się przez porównanie płaszczyzn „pików” ze standardami. Do oznaczeń ilościowych stosowano metodę wewnętrznej normalizacji i wewnętrznego standardu.

Piśmiennictwo

- Barviř J., Tošner A., Sušilova D.: Prumysl potravin, 46, 1963.
- Dobeš M., Jurajda V., Nápravník A., Vávrová M.: Medycyna Vet., 31, 530, 1975.
- Dobeš M., Vávrová M.: Výzkum metabolismu tuků a změny v mastných při jeho zpracování. (Závěrečná zpráva) Brno, Vysoká škola veterinární 1975, 67 s.
- Forman L.: Prumysl potravin, 21, 121, 1970.
- Holasová M., Jiroušová J., Blatný J.: Prumysl potravin, 22, 127, 1971.
- Hruška J., Kociánová M.: Stanovení rezidui chlorovaných pesticidů v potravinách, biologickém materiálu a vodě metodou plynové chromatografie. Návrh metod pro KHES, České Budějovice 1976.
- Ingr I.: Prumysl potravin, 23, 233, 1972.
- Jandák J.: Kolonová chromatografie. Sborník referátů, vyd. ediční středisko UJEP, Brno 1972.
- Janiček G., Šandera K., Hampel B.: Rukověť potravinářské analytiky. Red. E. Kleinová, I. vyd. Praha, SNTL, 1962.
- Analytická příručka, red. M. Stolvová, II vyd., Praha, SNTL, 1972.
- Lukášova J., Vávrová M.: Zbl. Abt. II, 59, 278, 1974.
- Mikulík A., Vávrová M.: Čs. Hyg., 20, 292, 1975.
- Mikulík A., Dobeš M., Vávrová M.: Vet. Med. (Brno), 22, 237, 1977.
- Mikulík A., Vávrová M., Dobeš M., Krul J., Svojanovská S.: Veterinářství, 27, 314, 1977.
- Pribela A. aj.: Analýza cudzorodných látok v požívatinách. Red. K. Artnerová, I. vyd. Bratislava, Alfa 1974.
- Rogoziński M.: J. Gas. Chrom., 2, 136, 1964.
- Rosival L., Szokolay A.: Cudzorodé látky v požívatinách. Red. F. Kalina, I. vyd. Martin, Osveta 1969.
- Smejkal J., Vávrová M., Slavík L., Frydrych Z.: Fleischwirtschaft, 53, 91, 1973.
- Szokolay A. et al.: Acta hygienica, 3, 1970.
- Vávrová M., Mikulík A.: Sledování rezidui chlorovaných pesticidů v živočišných potravinách chromatografickými metodami. (Závěrečná zpráva). Brno, Vysoká škola veterinární 1975, 82 s.
- Vávrová M., Mikulík A., Dobeš M.: Vet. Med. (Brno), 21, 187, 1976.

22. Vávrová M., Dobeš M., Mikulík A., Pažout V.: 21, 573, 1978.
 23. Vávrová M., Mikulík A., Dobeš M.: Contribution to toxicological effects of DDT and lindane on the biological value of the fat of pigs. Sborník referátu, Vyd. Merkur, Praha 1977, s. 137.

Adres autora: doc. dr Miroslav Dobeš, Palackého 1, 612 42 Brno.

Варвова М., Микулик А., Добеш М. — Применение хроматографических методов для анализа пищевых продуктов и сырья животного происхождения.

В работе были модифицированы хроматографические методы анализа остатков чуждых веществ и жирных кислот в мясе, мясных изделиях и жире. Показали, что при соответствующем экстракционном подходе, соответствующем подборе разбавителей, реактивов для проявления и колориса для газовой хроматографии можно достичь высокоспецифических результатов, и в этих случаях возможно полное использование селективности примененных методов. Чувствительность метода газовой хроматографии при употреблении Sc^3H ЕС проявителя к исследованию биологического материала составляла даже 10^{-7} мг/кг и делает возможным определение остатков хлорированных углеводородов даже в очень

малых концентрациях. Также для газовой хроматографии жирных кислот, становящейся в Чехословакии рутинным исследовательским методом в химических лабораториях ветеринарной службы, достигли сравнительно высокого процента производительности.

Vávrová M., Mikulík A., Dobeš M. — The application of chromatographic methods in food and raw animal materials analysis.

Modified chromatographic methods were used for the analysis of the residues of foreign substances and fatty acids in meat, butchers' products and fat. It was found that by means of suitable extraction procedures, proper solvents, development reagents and gas chromatographic columns was possible to obtain highly specific results. The sensitivity of the gas chromatographic methods was up to 10^{-7} mg/kg by the use of Sc^3H EC (electron capture) detector for the biological material under study and enabled to determine the residues of chlorinated hydrocarbons even in very low concentrations. Also a relatively high yield per cent was obtained in case of gas chromatography of fatty acids.

PROFILAKTYKA I HIGIENA PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ

ZDZISŁAW MELLER

Przegląd ważniejszych teorii dotyczących etiologii syndromów PSS i PSE

Z Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR-T w Olsztynie

W obecnym stanie badań mechanizm syndromów PSS (porcine stress syndrome) i PSE (pale, soft, exudative) nie jest wytłumaczony. Nie wiadomo, czy jego źródła należy szukać w samym mięśni, czy też w systemie hormonalnym lub neurologicznym.

Najczęściej upatruje się przyczyn w:

- nieprawidłowym funkcjonowaniu systemu hormonalnego;
- niedoskonałości układu oddechowego, prowadzącej w specyficznych warunkach do deficytu tlenowego w organizmie;
- nieprawidłowym metabolizmie węglowodanów.

Niżej, wykorzystując między innymi opracowania Topla (18) i Cassensa i wsp. (2), podano podstawowe kierunki badań zmierzające do naświetlenia przyczyn powstawania syndromów PSS i PSE.

Źródła energii mięśni szkieletowych

Energii potrzebnej mięśniom szkieletowym na skurcz i rozkurcz dostarczają dostępne adenozy-no-trójfosforan i fosfokreatyna (ATP i CP). Ta faza metabolizmu mięśniowego u świń wrażliwych na stres podlega prawdopodobnie pewnym

zaburzeniom. W czasie dużego wysiłku mięśnia, na skutek poważnego stresu, głównym źródłem ATP i CP jest rozpad glikogenu w procesie glikogenolizy. Produktem cyklu glikolitycznego jest kwas mlekowy. Stwierdzono, że u świń wrażliwych na stres wysoki poziom kwasu mlekowego tkanki mięśniowej obserwuje się wtedy, kiedy wchodzi ona w końcowe stadium PSS. Może być to główną przyczyną śmierci na skutek PSS.

Ilość kwasu mlekowego w mięśniach po śmierci jest także głównym regulatorem barwy mięsa. A zatem metabolizm kwasu mlekowego i czynniki, które kontrolują wytwarzanie i usuwanie kwasu mlekowego w tkankach ciała odgrywają główną rolę w regulacji adaptacji świń na stres a także mają wpływ na barwę mięsa oznaczoną po uboju.

Katecholaminy

Głównymi regulatorami glikolizy, a przez to metabolizmu kwasu mlekowego, są katecholaminy. Działanie adrenaliny, jak i noradrenaliny w komórce efektorowej jest wywoływane przez jeden lub drugi spośród dwóch typów mechanizmów receptyjnych (receptorów), przedstawionych jako α lub β .