

ANDRZEJ POSYNIAK

Zastosowania chromatografii cienkowarstwowej w weterynaryjnej analizie toksykologicznej

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weternarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

W ciągu ostatnich 25 lat nastąpił gwałtowny rozwój metod analitycznych. Do rutynowego stosowania w toksykologii wprowadzono instrumentalne techniki chromatograficzne, absorpcyjną spektrofotometrię atomową i spektrometrię masową, a dla zwiększenia niezawodności i skrócenia czasu analizy zastosowano automatyzację toku analitycznego i komputerowe zbieranie danych. W toksykologicznej analizie materiału biologicznego najczęściej stosuje się metody chromatograficzne.

Zastosowanie chromatografii można rozpatrywać jako metodę końcową dającą ostateczny wynik oraz jako metodę wyodrębniania właściwego związku z badanego materiału, który następnie badany jest jedną ze stosowanych metod. Dla rozdziału mieszanin substancji chemicznych, ich identyfikacji oraz ilościowego oznaczania stosuje się przede wszystkim chromatografię gazową (GLC), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz chromatografię cienkowarstwową (TLC). Wysoki koszt instrumentalnych technik analitycznych ogranicza zakres ich zastosowań i za celowe należy uznać, tam gdzie to jest wystarczające, stosowanie prostych technik, do których zalicza się chromatografię cienkowarstwową.

Metodę chromatograficzną z zastosowaniem szklanych płytek pokrytych cienką warstwą tlenku glinowego pierwsi opisali w 1938 r. Izmailow i Shreiber (10). Dopiero jednak Stahl pracując od 1958 r. nad tą metodą uczynił z niej technikę możliwą do powszechnego stosowania. Skonstruował on proste w obsłudze urządzenia oraz wskazał na możliwości i szeroki zakres zastosowań (30, 31, 32). Od tego czasu TLC zyskała na znaczeniu i większość laboratoriów stosuje ją z powodzeniem obok innych technik analitycznych.

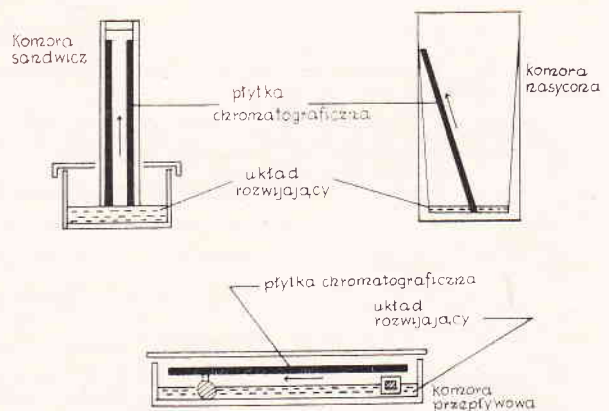
Technika chromatografii cienkowarstwowej

Podstawowym elementem TLC są prostokątne lub kwadratowe płytki, sporządzone ze szkła, plastiku lub aluminiowej folii. Płytki pokrywane są cienką (0,2 do 0,3 mm), jednolitą warstwą drobno sproszkowanej substancji, tzw. adsorbentu. Najczęściej stosowany jest żel krzemionkowy, tlenek glinowy, poliamid lub celuloza. Substancje te można łączyć lub modyfikować, dodaje się gipsu dla zwiększenia przychepności, buforu dla uzyskania odpowiedniego

pH, lub miesza z innymi substancjami, np. azotan srebrowy dodawany jest przy analizie insektycydów chloroorganicznych (16, 21).

Płytkę wraz z naniesionymi substancjami wzorcowymi i badanymi poddaje się tzw. rozwijaniu. W trakcie rozwijania chromatogramu następuje migracja rozpuszczalnika po powierzchni adsorbentu, a poszczególne składniki mieszaniny przemieszczają się z różnymi szybkościami, co powoduje ich rozdział. Rozwijanie przeprowadza się w komorach chromatograficznych, w użyciu są komory o różnej budowie (ryc. 1). Najprostszym i najczęściej stosowanym sposobem uzyskiwania chromatogramów jest rozwijanie wstępujące, wykonuje się je przy pionowym lub ukośnym ustawieniu płytki w komorze. Przy poziomym ułożeniu płytki oprócz rozwijania liniowego możliwe jest rozwijanie od- i dośrodkowe (ryc. 2). W celu uzyskania lepszych rozdziałów stosuje się różne sposoby rozwijania: rozwijanie wielokrotne, technikę stopniowego rozwijania, rozwijanie z jednoczesnym odparowywaniem rozpuszczalnika z płytki oraz rozwijanie dwukierunkowe.

Wykrywanie na chromatogramach analizowanych substancji wykonuje się metodami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. Do metod fizycznych zalicza się stosowanie lamp emitujących światło nadfioletowe. Wiele substancji fluoryzuje w tych warunkach, właściwość tę wykorzystano między innymi w analizie mikotoksyn (6). Możliwe jest również tworzenie na płytce fluoryzujących pochodnych, co stosuje się w analizie pestycydów i leków. Reakcja z



Ryc. 1. Komory stosowane w różnych technikach rozwijania chromatogramów



Ryc. 2. Sposoby rozwijania chromatogramów

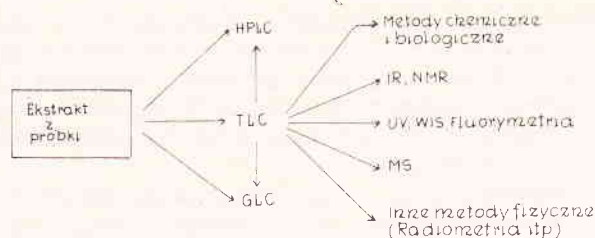
chlorkiem danzylu umożliwia wykrycie nanogramowych ilości insektycydów karbaminianowych oraz herbicydów mocznikowych (7, 8, 13). Natomiast tworzenie pochodnych z fluorescaminą znalazło zastosowanie w analizie sulfonamidów, może być także wykorzystane w analizie chloramfenikolu (11, 25, 28). Reakcje tworzenia fluoryzujących pochodnych są na ogół bardziej czułe od chemicznych lub biologicznych metod detekcji np. metodą mikrobiologiczną można wykryć 1000 ng chloramfenikolu, chemiczną — 100 ng, a w reakcji z fluorescaminą poniżej 50 ng (3).

Do metod fizycznych zalicza się również metody radiograficzne (autoradiografia), połączenia z autoradiografią wykorzystuje się w badaniach nad metabolizmem, dystrybucją i wydalaniem substancji chemicznych.

Najbardziej popularnym i najczęściej stosowanym sposobem wywoływania chromatogramów są metody chemiczne polegające na zastosowaniu odpowiednich odczynników dających reakcję barwną z substancjami znajdującymi się na płytce. Dla detekcji chemicznej opracowano liczne reakcje barwne o wysokiej czułości, selektywne lub wspólne dla całych grup substancji.

Do metod biologicznych należy zaliczyć metodę posiewów mikrobiologicznych stosowaną w analizie antybiotyków i leków przeciwbakteryjnych; umożliwia ona wykrycie 0,1 mg związku w kg badanego materiału (5). Wadą tej metody jest brak specyficzności, a zbyt duża średnica otrzymywanych stref zahamowań utrudnia identyfikację. Innym przykładem metod biologicznych są metody hamowania aktywności enzymów, przede wszystkim należy wymienić tutaj test hamowania esterazy cholinowej, umożliwiający wybiórcze wykrycie nano- i pikogramowych ilości insektycydów fosforoorganicznych i karbaminianowych (2, 18, 19, 20). Reakcja ta przewyższa czułością i selektywnością metody chemiczne. Zdolność hamowania enzymów wykorzystuje się również w analizie herbicydów hamujących fotosyntezę; zastosowanie tej reakcji pozwala wykryć 100—500 pg herbicydów triazynowych, mocznikowych lub karbaminianowych (14).

Zastosowanie TLC do rozdziału i identyfikacji bardzo małych ilości substancji toksycznych



Ryc. 3. Połączenia TLC z innymi technikami analitycznymi

spowodowało zainteresowanie metodami fizykochemicznymi, które umożliwiają ilościowe oznaczanie składników rozdzielanej na chromatogramie mieszaniny (ryc. 3). Pomiar ilościowych badanych związków przeprowadza się wprost na chromatogramie przy zastosowaniu odpowiednio skonstruowanych aparatów lub też rozdzielone substancje eluuje się z chromatogramu, a pomiary przeprowadza w otrzymywanych roztworach. Metody bezpośrednie górują nad metodami elucyjnymi szybkością i dokładnością pomiaru. Za najkorzystniejszą do bezpośrednich oznaczeń ilościowych uważa się metodę pomiaru fluorescencji (denzytometria).

Zastosowania chromatografii cienkowarstwowej

W analizie toksykologicznej do badań stosuje się szybkie testy skryningowe oraz metody specyficzne i potwierdzające. Kontrolowanie obecności substancji obcych w materiale biologicznym zazwyczaj rozpoczyna się od wstępnych metod skryningowych. Dopiero w drugim etapie badań stosuje się metody specyficzne lub potwierdzające; przewyższają one metody skryningowe czułością i dokładnością. Możliwości analityczne TLC predysponują ją do stosowania w badaniach skryningowych, a uzyskane wyniki można w razie potrzeby potwierdzić przez zastosowanie GLC lub HPLC.

W związku ze stosowaniem w leczeniu weterynaryjnym antybiotyków i środków przeciwbakteryjnych oraz przeciworobaczych, a także kokcydiostatyków, hormonów i stymulatorów wzrostu istnieje potrzeba kontrolowania poziomu tych związków w paszach i żywności zwierzęcego pochodzenia. Wśród wielu metod oznaczania również i TLC ma tu praktyczne zastosowanie. Dotyczy to przede wszystkim badania pozostałości sulfonamidów, kokcydiostatyków i hormonów.

Analiza chromatografią cienkowarstwową sulfonamidów na ogół nie przedstawia trudności. Wykorzystuje się reakcje barwne dla amin, a zastosowanie fluorescaminy umożliwia wykrycie 2—5 ng związku. W oparciu o tę reakcję opracowano wiele metod oznaczania sulfonamidów (9, 25, 29, 35). Na uwagę zasługuje metoda wykrywania sulfametazyny, która może być wykonana bezpośrednio na fermie lub w rzeźni.

Na podstawie zawartości sulfametazyny w moczu określa się jej zawartość w wątrobie i mięśniach. Przy stężeniach w moczu powyżej 1,3 mg/dcm³, stężenia w mięśniach są wyższe od 0,1 mg/kg; mięso takie nie może być dopuszczone do spożycia (4).

Stosowanie na coraz szerszą skalę antybiotyków jonoforowych do zwalczania kokcydiozy stworzyło potrzebę kontrolowania ich obecności w paszach. Niedopuszczalna jest bowiem ich obecność w paszach dla kur niosek oraz brojlerów w ostatnim okresie tuczu. Jest to problem tym bardziej ważny, że w przypadku skojarzenia leczenia z tiamuliną może dojść do ostrego zatrucia drobiu. TLC umożliwia rozdział i identyfikację monenzyny, narazyny, salinomycyny i lasalocidu. Do detekcji służy reakcja chemiczna z waniliną lub metoda bioautografii ze szczepem *Bacillus subtilis* (23).

Kolejnym istotnym zagadnieniem jest badanie pozostałości nie dopuszczonych do stosowania anabolicznych steroidów. Opracowano wiele metod wykrywania związków tej grupy, w tym reakcje tworzenia fluoryzujących pochodnych z kwasem siarkowym; umożliwia ona wykrycie 1—10 ng androgenów, estrogenów, czy też gestagenów. Metoda pozwala oznaczyć stężenia hormonów anabolicznych w mięsie lub moczu na poziomie 0,5—10 µg/kg (24, 36).

Kolejnym ważnym zagadnieniem, jakim zajmuje się weterynaryjna analiza toksykologiczna jest badanie pozostałości środków ochrony roślin w żywności zwierzęcego pochodzenia. Gdy w latach sześćdziesiątych powstała potrzeba oznaczania pozostałości pestycydów TLC była u szczytu swojego rozwoju, była podstawowym narzędziem analitycznym stosowanym w tych badaniach. Obecnie badania prowadzi się przede wszystkim przy zastosowaniu GLC, gdyż obowiązujące limity na ogół są poniżej możliwości TLC. Jest ona natomiast z powodzeniem stosowana w przypadkach rozpoznawania zatruc u zwierząt pestycydami; występujące wówczas stężenia w paszach lub materiale zwierzęcym mogą być wykrywane tą techniką. Przy wprowadzaniu do stosowania pestycydów nowej generacji opracowuje się metody ich oznaczania oparte przede wszystkim na instrumentalnych technikach analitycznych (GLC lub HPLC). Jakkolwiek nie zapomina się i o TLC — przykładem są prace dotyczące badania syntetycznych piretroidów (22, 27, 34).

Poważnym problemem w toksykologii weterynaryjnej jest możliwość skażenia pasz grzybami wytwarzającymi mikotoksyny. Opracowano wiele metod badania tych substancji, większość z nich wykorzystuje do badań właśnie TLC. Przyjęte w praktyce laboratoryjnej metody wykrywania i oznaczania mikotoksyn opierają się głównie na właściwości fluoryzowania w świetle UV (26, 33).

Możliwe jest ponadto oznaczanie alkaloidów glikozydów i innych substancji czynnych wy-

tworzonych przez rośliny wyższe, a mogących być przyczyną zatruc zwierząt. Opracowano między innymi metodę ilościowego i jakościowego oznaczania alkaloidów łubinu, pozwalającą odróżnić nieszkodliwy łubin słodki od toksycznego łubinu gorzkiego (12).

Podsumowanie

Przedstawiony przegląd zastosowań TLC w weterynaryjnej analizie toksykologicznej wskazuje, że wytrzymuje ona konkurencję nowoczesnych technik instrumentalnych i z powodzeniem może być stosowana w laboratoriach toksykologicznych. Tym bardziej, że udoskonalenia i usprawnienia czynią TLC nadal atrakcyjnym narzędziem pracy analityków. Zastosowanie tzw. wysokosprawnych płytek cienkowarstwowych dało lepsze rozdzielanie niższą wykrywalność. Ten rodzaj płytek został wykorzystany w analizie sulfonamidów, mikotoksyn i hormonów (9, 15, 36). Pewnym usprawnieniem jest zastosowanie komory „Sandwicz” do ciągłego rozwijania chromatogramów. Komora daje nowe możliwości metodyczne w TLC: minimalne zużycie eluentu, zwiększoną czułość detekcji, możliwość prekoncentracji rozcieńczonych roztworów próbki i inne (16, 17, 34).

Piśmiennictwo

- Abbott D. C., Tatton O. G., Wood N. F.: *J. Chromatogr.* 42, 83, 1969.
- Ackermann H., Lexow B., Plewka E.: *Arch. Toxicol.* 24, 316, 1969.
- Allen E. H.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 68, 990, 1985.
- Anon.: *US Dept. Agricult.*, 1985.
- Barbiers A. R., Neff W.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 59, 846, 1976.
- Betina V.: *J. Chromatogr.* 334, 216, 1985.
- Frei R. W., Lawrence J. F.: *J. Chromatogr.* 61, 174, 1971.
- Frei R. W., Lawrence J. F.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 55, 6, 1972.
- Haagsma N., Dieleman B., Gortemaker B. G. M.: *Vet. Quart.* 6, 8, 1984.
- Izmailov N. A., Schreiber M. S.: *Farm.* 3, 1, 1938.
- Johannes B., Korfer K. H., Schad J., Ulbrich J.: *Arch. Lebensmittelhyg.* 34, 1, 1983.
- Karlsson E. M., Petter H. V.: *J. Chromatogr.* 155, 218, 1978.
- Lawrence J. F., Laver G. V.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 57, 5, 1974.
- Lawrence J. F.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 63, 758, 1980.
- Lee K. Y., Poole C. F., Zlatkis A.: *Anal. Chem.* 52, 827, 1980.
- Matysik G., Soczewiński E., Matyska M.: *Farm. Pol.* 39, 6, 1983.
- Matysik G., Matyska M., Soczewiński E.: *Bromat. Chem. Toksykol.* 13, 261, 1985.
- Mendoza C. E., Shields J. B.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 54, 508, 1971.
- Mendoza C. E.: *J. Chromatogr.* 78, 29, 1973.
- Mendoza C. E., Wales P. J., McLeod H. A., McKinley W. P.: *J. Chromatogr.* 93, 173, 1968.
- Moats W. A.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 49, 795, 1966.
- Ogierman R., Siłowiecki A.: *Chromatographia* 14, 459, 1981.
- Owles P. J.: *Analyst* 109, 1331, 1984.
- Ryan J. J.: *J. Chromatogr.* 127, 53, 1976.
- Scatterer B. Z.: *Lebensm. Unters. Forsch.* 176, 20, 1983.
- Scott P. M., Lawrence J. W., Walbeck von W.: *Appl. Microbiol.* 20, 839, 1970.
- Shono T., Ohsawa K., Casida J. E.: *J. agric. Fd Chem.* 27, 316, 1979.
- Sigel C. W., Woolley J. L., Nichol Ch. A.: *J. Pharm. Sci.* 64, 973, 1975.
- Soczewiński E.: *Chem. Anal.* 23, 515, 1978.
- Stahl E.: *Chemiker Ztg* 82, 323, 1958.
- Stahl E.: *Pharm. Rdsch* 2, 1, 1959.
- Stahl E.: *Arch. Pharm.* 293, 531, 1960.
- Steyn P. S.: *J. Chromatogr.* 45, 473, 1969.
- Sundararajan R., Chowla R. P.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 66, 1009, 1983.
- Thomas N. H., Epstein R. L., Ashworth R. B., Marks H.: *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 66, 884, 1983.
- Verbeke R.: *J. Chromatogr.* 177, 69, 1979.

Adres autora: mgr Andrzej Posyński, ul. Sadowa 4 m 21, 24-100 Puławy