

INOCENTYNA KARKOCHA

METODA OZNACZANIA 3,3'-DWUCHLORO-5,5'-DWUNITRO-0,0'-DWUFENOLU W MLEKU

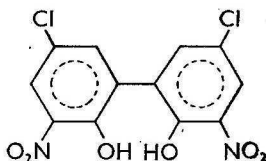
Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego
Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr M. Nikonorow

Opracowano metodę oznaczania 3,3'-dwuchloro-5,5'-dwunitro-0,0'-dwufenolu w mleku rynkowym przy zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej.

Do zwalczania motylicy wątrobowej u bydła i owiec stosuje się w weterynarii lek o nazwie „Distolon”. Podaje się go w formie jednogramowych tabletek [1]. Tabletki zawierają po 0,2 g substancji czynnej, którą jest 3,3'-dwuchloro-5,5'-dwunitro-0,0'-dwufenol. Preparat handlowy tego związku ma nazwy: „Bilevon” lub „Bayer 9015”.

Czysty związek ma postać żółtego krystalicznego proszku, który nie rozpuszcza się w wodzie.

Wzór strukturalny tego związku jest następujący:



W piśmiennictwie znajduje się niewiele prac dotyczących oznaczania bilevonu. Thomson i Anderson oznaczali ten związek w tkankach zwierzęcych przy zastosowaniu chromatografii gazowej [2]. Natomiast Starek i współpracownicy opisali oznaczanie bilevonu we krwi i w moczu za pomocą chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej oraz metody spektrofotometrycznej [3].

Ze względu na przechodzenie bilevonu do mleka leczonych krów, zaistniała konieczność opracowania względnie szybkiej i prostej metody oznaczania tego związku w mleku.

Do oznaczania bilevonu w niniejszej pracy zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiałem doświadczalnym było mleko rynkowe. Stosowany w pracy badawczej bilevon otrzymano z Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Gorzowie.

Odczynniki

1) aceton cz.d.a.; 2) kwas siarkowy 9 n; 3) 20% wodny roztwór NaOH; 4) nasycony roztwór NaCl; 5) wata szklana; 6) eter etylowy pro narcosi, destylowany; 7) eter naftowy, destylowany; 8) alkohol metylowy cz.d.a.; 9) alkohol etylowy 95%; 10) chloroform destylowany (frakcja wrząca w temp. 60—62°C); 11) żel krzemionkowy G Mercka wg *Stahla* do chromatografii cienkowarstwowej; 12) benzen cz.d.a.;

13) roztwory standardowe bilevonu: 1) 0,1% roztwór w alkoholu metylowym (0,050 g związku rozpuszczono w 50 ml metanolu) — roztwór A; 2) 0,01% roztwór bilevonu otrzymany przez rozcieńczenie 10 ml roztworu A do objętości 100 ml, roztwór B (przygotowywano bezpośrednio przed oznaczaniem);

14) siarczan sodu cz.d.a., suszony w temp. 140° przez 7 godz.

Przygotowanie płytek

Płytki o wymiarach 10×17 cm dokładnie wymyte i wysuszone, pokrywano zawiesiną 1,0 g żelu krzemionkowego w 3,5 ml wody destylowanej. Płytki suszono przez noc na powietrzu w temperaturze pokojowej, po czym aktywowano w suszarce elektrycznej w temp. 105° przez 1/2 godziny. Tak przygotowane płytki przechowywano w eksykatorze nad wysuszonym żelem krzemionkowym.

Ekstrakcja bilevonu i oczyszczanie wyciągów

Z 1 litra dokładnie wymieszanego mleka rynkowego pobierano 25 ml do kolbki stożkowej, poj. 100 ml, zawierającej mały zwitek waty szklanej. Do próby dodawano niewielkimi porcjami 50 ml acetonu łagodnie mieszając i po przykryciu płytką Petriego pozostawiano na 15 min. okazyjnie mieszając. Następnie próbę wirowano przy obrotach 3 tysiące/minutę w ciągu 10 minut. Płyn znad osadu sączono przez lejek z wata szklaną do rozdzielacza pojemności 500 ml. Kolbkę i osad w próbówce wirówkowej przemywano dwukrotnie acetonem, używając każdorazowo 15 ml rozpuszczalnika i rozbijając osad pałeczką szklaną w ciągu 3 minut. W ten sposób otrzymaną zawiesinę wirowano wg opisu podanego wyżej i otrzymany ekstrakt sączono do poprzednio wymienionego rozdzielacza.

Osad w próbówce przemywano trzeci raz 10 ml acetonu, wirowano i sączono. Do rozdzielacza dodawano 180 ml wody destylowanej, 10 ml nasyconego roztworu NaCl i 0,8 ml 9 n H_2SO_4 . Próbę ekstrahowano trzykrotnie eterem etylowym, używając dwa razy po 100 ml i trzeci raz 50 ml eteru, wytrząsając każdorazowo przez 5 minut. Wyciągi eterowe zbierano w zlewce poj. 250 ml i po dodaniu ok. 5 g bezwodnego Na_2SO_4 , pozostawiano na co najmniej 2 godziny. Następnie eter odparowywano w łaźni wodnej w temperaturze do 40° do obj. około 50 ml i sączono przez sączek z bibuły filtracyjnej do rozdzielacza pojemności ok. 200 ml.

Zlewkę i sączek płukano trzykrotnie, używając po 5 ml eteru. Wyciąg eterowy ekstrahowano trzykrotnie stosując dwa razy po 50 ml i jednorazowo 25 ml roztworu uzyskanego przez zmieszanie: 150 ml wody destylowanej; 0,4 ml 20% roztworu wodorotlenku sodowego i 9 ml nasyconego roztworu NaCl. Wytrząsano każdorazowo przez 5 minut. Uzyskany wyciąg wodny wytrząsano w rozdzielaczu z 25 ml eteru naftowego w ciągu 2 minut.

Po usunięciu warstwy eteru naftowego, do ekstraktu wodnego dodawano 0,6 ml 9n H_2SO_4 i ekstrahowano trzykrotnie w rozdzielaczu poj. 250 ml, używając po 50 ml chloroformu. Wytrząsano każdorazowo w ciągu 5 minut. Wyciąg chlo-

roformowy sączone do kolbki ssawkowej poj. 500 ml przez lejek Schotta 3G3 zawierający sącdek z bibuły Whatman Nr 3 i warstwę bezwodnego Na_2SO_4 w ilości około 10 g.

Sączenie odbywało się bez podłączania próżni, którą stosowano tylko do ściągnięcia resztek płynu z sączka. Przesącz przenoszono do zlewki poj. 250 ml, popłukując sącdek i kolbkę ssawkową trzy razy po 10 ml chloroformu. Chloroform zagęszczano do objętości około 5 ml w łaźni wodnej o temp. do 40° pod zimnym nadmuchiemy z fena. Pozostałość przenoszono do probówki, popłukując zlewkę chloroformem trzy razy po 2 ml rozpuszczalnika.

Zawartość probówki zagęszczono do objętości 2 ml, w łaźni wodnej o temp. do 40° , umieszczając nad powierzchnią płynu rurkę szklaną, połączoną z pompą wodną próżniową. Koniec rurki szklanej i ścianki probówki opłukiwano ok. 2 ml chloroformu. Po całkowitym oddestylowaniu chloroformu, do pozostałości w probówce dodawano ok. 0,1 ml alkoholu metylowego, opłukując nim koniec rurki szklanej i ścianki probówki. Otrzymany roztwór służył do nanoszenia na płytkę.

W identyczny sposób przygotowywano próby fortyfikowane, dodając do 25 ml mleka przed odbiłączeniem od 10 do 30 μg bilevonu z roztworu standartowego B.

Rozwijanie chromatogramów

Na przygotowane płytki chromatograficzne nanoszono w całości roztwory alkoholowe uzyskane z prób mleka kontrolnego i fortyfikowanego, popłukując probówki dwukrotnie 0,05 ml porcjami metanolu, oraz odpowiednie ilości roztworu standartowego. Chromatogramy rozwijano w komorze szklanej benzenem do wysokości 13 cm od linii startu. Po wyjęciu płytek z komory i odparowaniu rozpuszczalnika, spryskiwano je 20% roztworem NaOH.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Po wywołaniu chromatogramu 20% roztworem wodorotlenku sodowego, uzyskiwano żółto zabarwione plamy bilevonu o wartościach R_f od 0,24—0,26. Intensywność zabarwienia plam była proporcjonalna do stężenia bilevonu, przy czym czułość metody dla plam tego związku uzyskanych z wyciągu mleka wynosi 5 μg . Wykrywalność metody wynosi 2 μg . Opracowana metoda pozwala na wykrycie 5 μg bilevonu w badanej próbce 25 ml, co odpowiada zawartości 0,2 mg tego związku w 1 litrze mleka. Odzyskiwalność metody wynosi ok. 100%.

WNIOSKI

Opracowana metoda jest dość prosta w wykonaniu i może być stosowana do seryjnych, ilościowych oznaczeń bilevonu w mleku.

И. Каркоха

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ 3,3-ДИХЛОР-5,5-ДИНИТРО-0,0-ДИФЕНОЛА В МОЛОКЕ

Содержание

Обработано метод определения 3,3-дихлор-5,5-динитро-0,0-дифенола в молоке применяя хроматографию в тонком слое на кремнистом желе Г Мерка. Подвижной фазой был бензол. Для проявления пятен 3,3-дихлор-5,5-динитро-0,0-ди-

фенола на хроматографической плитке применено 20% водный раствор гидроксида натрия. R_f проявленных пятен колебался в границах 0,24—0,26. Чувствительность метода 2 μ г. Этим методом можно обнаружить 5 μ г этого соединения в исследуемой 25 мл пробе, что отвечает содержанию 0,2 мг в 1 л. молока.

I. Karkocha

A METHOD OF ESTIMATION OF 3,3'-DICHLORO-5,5'-DINITRO-0,0'DIPHENOL IN MILK

Summary

A method for the assessment of 3,3'-dichloro-5,5'-dinitro-0,0'-diphenol in milk has been worked out using thin-layer chromatography on silica G gel by Merck.

Benzene served as a moving phase. For the development of the stains of 3,3'-dichloro-5,5'-dinitro-0,0'-diphenol a 20% aqueous solution of sodium hydroxide has been used. R_f of the stains developed ranged between 0.24 and 0.26. The detectability of the method was 2 ngms. Using the above method 5 ngms of the compound in question can be detected in the sample of 25 ml, which is equivalent to 0.2 mg per one liter of milk.

PIŚMIENNICTWO

1. *Vadémecum Leków Weterynaryjnych*, 1968, s. 75. — 2. *Thornton J. S., Anderson C. A.*: Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 1967, 2, 111. — 3. *Starek A., Migros A., Chrobak F.*: Brom. Chem. Toks., 1971, 4, 17.

Dn. 9-II-1972 r.

Warszawa. ul. Chocimska 24.