

INOCENTYNA KARKOCHA

WYKRYWANIE POZOSTAŁOŚCI DWUETYLOSTYLBESTROLU W MIĘSIE DROBIU*

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego Zakładu Higieny
w Warszawie

Kierownik: prof. dr M. Nikonorow

Opisano metodę ekstrakcji dwuetylostylbestrolu z tkanki mięsnej drobiu oraz jego ilościowe oznaczanie techniką chromatografii cienkowarstwowej.

Dwuetylostylbestrol (DES) 3, 4-dwu (p-hydroksyfenyl)-3-heksan, syntetyczny estrogen, o działaniu podobnym do naturalnego hormonu estradiolu.

Preparat może być stosowany do leczenia zwierząt hodowlanych oraz drobiu a także podczas chowu (w paszy lub w postaci wszczepów podskórnych). Praktyka ta, przy jednoczesnym braku nadzoru weterynaryjnego (brak okresów karencji) może być przyczyną pozostałości DES w żywności pochodzenia zwierzęcego, w tym również w mięsie drobiu. Z tych względów ostatnio niektóre kraje wycofały się ze stosowania DES w celach hodowlanych (Belgia, Francja, Holandia, Irlandia, RFN, USA, Włochy) w innych kontrola obejmuje mocz i kał zwierząt przeznaczonych do uboju [2, 3].

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał do badania stanowiło mięso drobiu pozbawione skóry i tłuszczu, rozdrobnione w maszynce do mielenia. 50,0 g próbki tkanki mięsnej przechowywano w zamrażalniku, w szczelnych naczyniach.

Aparatura, szkło

Poza typowym wyposażeniem laboratoryjnym stosowano: 1) homogenizator typ MPW — 309, firmy Mechanika Precyzyjna; 2) lampę kwarcową o długości fali 254 nm, firmy Camag; 3) zestaw do ekstrakcji: kolbka stożkowa ze szlifowaną szyjką poj. 500 ml, z wylotem w postaci zgiętej rurki szklanej, oraz chłodnicą palcową [1].

Odczynniki

1) acetonitryl cz.d.a.; 2) benzen cz.d.a., destylowany; 3) bezwodnik kwasu octowego; 4) etanol absolutny; 5) etanol 95%; 6) eter etylowy pro narcosi; 7) chlorek metylenu cz., destylowany; 8) chloroform cz.d.a.; 9) n-heksan cz.d.a.; 10) kwas siarkowy stężony cz.d.a.; 11) kwas solny stężony cz.d.a.; 12) kwas solny 5 n roztwór; 13) sodu węglan 10% roztwór; 14) sodu wodorotlenek 1% roztwór; 15) żel krzemionkowy 60, f-my Merck, nr. kat. 5127; 16) roztwór wzorcowy DES* (A) podstawowy, o stężeniu 0,1 mg/ml, przygotowany w etanolu absolutnym. Roztwór wzorcowy (B) o stężeniu 10 µg/ml przygotowano przez rozcieńczenie etanolem roztworu „A”.

* Pracę wykonano w ramach problemu MR-12

** Substancja wzorcowa f-ny „Polfa” z Jeleniogórkich Zakładów Farmaceutycznych.

Ekstrakcja DES

Badany związek ekstrahowano wg [1] z modyfikacjami. 50,0 g próbki mięsa fortyfikowane roztworem wzorcowym, odpowiadającym 0,25 μg do 1 μg DES, homogenizowano w pojemniku objętości ok. 200 ml z 150 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą (9+1) przez 2 minuty, przy napięciu zasilania 90 V. Zawartość przenoszono ilościowo do kolbki ekstrakcyjnej, przemywając pojemnik i wirnik homogenizatora 50 ml w/w mieszaniny. Dodawano 2 ml 5 n roztworu kwasu solnego, zamykano chłodnicą palcową, podłączoną do kranu i ogrzewano w łaźni wodnej o temp. 92—94°C, przez 0,5 h kilkakrotnie mieszając. Kolbkę ochładzano do temperatury pokojowej. Zawartość jej sączono przez bibułę *Whatman* Nr. 1 na lejku *Büchnera* do kolbki ssawkowej poj. 500 ml, przy słabej próżni. Chłodnicę i kolbkę ekstrakcyjną przemywano dwukrotnie 20 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą, przenosząc popłuczyny na lejek z masą mięsną (przy wyłączonej próżni), mieszano dokładnie pałeczką szklaną, uciskano delikatnie szklanym korkiem o szerokiej powierzchni i ponownie sączono. Przesącz oczyszczano w gruszkowym rozdzielaczu pojemności 500 ml, przez dwukrotne, energicznie mieszanie dookoła osi poziomej z 50 ml n-heksanu wysyczonego mieszaniną acetonitrylu z wodą (9+1). Po rozdzieleniu warstw, n-heksan odrzucano. Do ekstraktu dodawano 60 ml benzenu, mieszano i przemywano trzykrotnie z 30 ml 10% roztworu węgla sodu, jak wyżej. Warstwę wodną (dolną) każdorazowo odrzucano. Ekstrakt przemywano trzykrotnie, jak wyżej, 30 ml wody destylowanej. Warstwy wodne odrzucano. Do ekstraktu dodawano 30 ml 1% roztworu wodorotlenku sodu i silnie wytrząsano, przez 2 minuty. Frakcję wodną (dolną) przenoszono do rozdzielacza pojemności 250 ml.

Fazę organiczną przemywano 20 ml wody. Do połączonych frakcji wodnych dodawano 2 ml stężonego kwasu solnego. DES ekstrahowano 20 ml benzenu, energicznie wytrząsając przez 2 minuty. Frakcję benzenową przenoszono do zlewki poj. ok. 25 ml, a pozostałość w rozdzielaczu przemywano ok. 5 ml benzenu. Wyciąg benzenowy odparowywano w strumieniu azotu, do obj. ok. 2 ml, w łaźni wodnej o temp ok. 50°C. Ścianki zlewki splukiwano ok. 2 ml benzenu i odparowywano do sucha na łaźni wodnej, przy wyłączonej grzałce.

Pozostałość w zlewce rozpuszczano w ok. 1 ml etanolu absolutnego, przez kilkakrotne przemywanie naczyń i nanoszono w całości na płytkę chromatograficzną.

W identyczny sposób postępowano z próbkami kontrolnymi, nie fortyfikowanymi.

Rozwijanie chromatogramu — chromatogram rozwijano dwukierunkowo do wysokości ok. 13 cm w układach rozpuszczalników: 1) chloroform + etanol + benzen (36+1+4); 2) n-heksan + eter etylowy + chlorek metylenu (4+3+2).

Po wysuszeniu płytki w temp. pokojowej, DES wykrywano jednym z wymienionych sposobów przez: 1) naświetlanie 20 min. pod lampą kwarcową $\lambda=254$ nm, w odległości 10 cm od źródła światła — plamy DES wykazują zabarwienie żółte; 2) spryskiwanie płytki 5% roztworem kwasu siarkowego w etanolu [4] (do lekkiego zawilgocenia płytki) i ogrzewanie przez 12 min. w temp. 95°C — plamy DES w świetle dziennym wykazują zabarwienie szare — niebieskie, w świetle UV, $\lambda=366$ nm — zabarwienie czerwone.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Intensywność zabarwienia plam DES uzyskanych na chromatogramach jest proporcjonalna do ilości tego związku.

Czułość metody wynosi 0,25 μg , odzyskiwalność ok. 100%.

Zastosowaną techniką wykrywa się 0,25 μg DES w badanej próbce, tj. 0,005 mg w 1 kg mięsa drobitu.

Ze względu na prostą technikę, metoda może być stosowana do seryjnych oznaczeń.

И. Каркоха

ОБНАРУЖЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЕСТРОЛА В МЯСЕ ДОМАШНЕЙ ПТИЦЫ

Резюме

Описывается полуколичественный метод определения диэтилстильбестрола (ДЭС) в мясе с применением тонкослойной хроматографии. ДЭС экстрагировали из мяса смесью ацетонитрила с водой (9+1). Экстракты очищали n-гексаном, 10% раствором карбоната натрия, водой. Исследуемое соединение повторно экстрагировали из водной в органическую фазу при изменении pH среды. Этаноловый раствор ДЭС наносили на хроматографическую пластинку

покрытую кремниевым гелем G Мерка. Пробы развивали в двух направлениях в системах растворителей: 1) хлороформ + этанол + бензол (36+1+4), 2) н-гексан + этиловый эфир + метиленхлорид (4+3+2). Пятна ДЭС идентифицировали одним из следующих способов: 1) в свете UV при длине волны 254 нм, 2) после sprыскивания 5% раствором серной кислоты в этаноле и 12-минутном нагревании при темп. 95°C.

С помощью описанной техники обнаруживали 0,005 мг ДЭС в 1 кг мяса.

I. Karkocha

DETECTION OF DIETHYLSTILBOESTROL RESIDUES IN POULTRY MEAT

Summary

A semiquantitative method for determination of diethylstilboestrol (DES) in the meat is described based on thin-layer chromatography. DES was extracted from the meat with a mixture of acetonitrile with water (9+1). The extracts were purified with n-hexane, 10% sodium carbonate solution and water. The tested compound was re-extracted from the aqueous phase into the organic phase changing the pH of the medium. The ethanol solution of DES was placed on chromatographic plates in the system of solvents: 1) chloroform + ethanol + benzene (36+1+4); 2) n-hexane + ethyl ether + methylene chloride (4+3+2). DES spots were identified either at UV light at 254 nm wavelength or after spraying with 5% sulphuric acid in ethanol and 12 min and heating at 95°C.

This technique detected 0.005 mg DES in 1 kg of meat.

PIŚMIENICTWO

1. Karkocha I.: Oznaczenie pozostałości dwuetylostylbestrolu w mleku. Roczn. PZH, 1975, 26, 273. — 2. Table ronde sur l'utilisation des oestrogenes en elevage. RTVA, 1980, 159. — 3. Vademecum Leków Weterynaryjnych, Prasa ZSL, Warszawa, 1979, 409. — 4. Verbeke R.: Sensitive multi — residues method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals. J. Chromatogr., 1979, 177, 69.

Dn. 20.XI.1981 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.