Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, PIWet. w Puławach

WOŹNIAK B.

Oznaczanie trenbolonu i octanu trenbolonu w moczu bydlęcym metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej i chromatografii cieczowej

Determination of trenbolone and trenbolone acetate in bovine urine by high-performance thin-layer chromatography and liquid chromatography

Octan trenbolonu (TBA) jest syntetycznym sterydem wykazującym właściwości anaboliczne. Jest od 8 do 10 razy silniejszym anabolikiem niż testosteron. Stosowany jest w hodowli bydła jako implant sam lub w połączeniu z estradiolem 17β lub zeranolem. Powoduje zwiększenie masy ciała zwierząt, poprawia współczynnik wykorzystania paszy oraz retencję azotu. W zależności od rodzaju implantu dawka octanu tmbolonu wynosi od 40 do 300 mg na zwierzę, a implantację przeprowadza się zwykle 60–150 dni przed ubojem. Octan trenbolonu po wprowadzeniu do organizmu zwierząt jest szybko hydrolizowany do aktywnego metabolitu 17β trenbolonu (TBOH).

Niektóre państwa jak np. USA zezwalają na stosowanie TBA w tuczu bydła, w Polsce i krajach UE stosowanie hormonów w celach anabolicznych jest zabronione (Dyrektywa 96/22/EC). Dlatego konieczne jest prowadzenie badań pozostałości hormonów w tkankach zwierząt rzeźnych i co się z tym wiąże dysponowanie metodami wykrywania tych związków.

Opracowano prostą metodę wykrywania trenbolonu i octanu trenbolonun w moczu bydlęcym. Zbadano 30 fortyfikowanych trenbolonem i octanem trenbolonu próbek moczu bydlęcego dla zakresu stężeń 0,5–20 ng/g (ppb).

Próbki przefiltrowanego moczu ekstrahowano dwoma porcjami eteru dietylowego. Fazy eterowe odparowywano do sucha, pozostałość rozpuszczano w 3 ml buforu octanowego o pH = 4,8, dodawano 10 ul glukuronidazy AS i inkubowano 2 godz. w temperaturze 62°C. Próbę oczyszczano na kolumience C 18 (l ml/l 00 mg), hormony eluowano metanolem, który następnie odparowywano, a suchą pozostałość rozpuszczano w acetonie i nanoszono na płytkę chromatograficzną HPTLC (silica gel bez wskaźnika). Zastosowano dwukierunkową technikę rozwijania płytki, chromatogram wywoływano 10% kwasem siarkowym w etanolu. Płytkę analizowano pod lampą UV przy długości fali 366 nm. Identyfikację hormonów przeprowadzano przez porównanie barwy i Rf plamek obecnych w próbie z wzorcami. Zarówno octan trenbolonu jak i trenbolon dają intensywnie świecące niebiesko-zielone plamki widoczne pod lampą bez aktywacji cieplnej płytki, co jest ich cechą charakterystyczną, ponieważ zdecydowana większość hormonów widoczna jest dopiero po wygrzaniu płytki. Ułatwia to identyfikację trenbolonów i sprawia że chromatogramy są bardzo czyste. Limit detekcji trenbolonu w moczu bydlęcym metodą HPTLC wynosi 0,5 ng/g (ppb), natomiast octanu trenbolonu 2 ng/g. Identycznie przygotowane próbki analizowano równolegle na chromatografie cieczowym HP 1100 z detektorem DAD przy długości fali 340 nm na kolumnie Lichrosorb RP 18, stosując jako fazę ruchomą metanol z wodą (80:20 v/v) i szybkość przepływu l ml/min. Dla zakresu stężeń 5–20 ppb uzyskano dla obydwu hormonów odzysk około 50%.