

PRAKTYKA LABORATORYJNA

BARBARA MAJEWSKA, JULITTA RYBCZYŃSKA

Oznaczanie ciał ketonowych w postaci acetonu w osoczu, sianie i mleku u bydła

Z Instytutu Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

U krów produkcyjnych bardzo często w wyniku zaburzeń przemiany pośredniej dochodzi do hyperketonemii, przy której poziom ciał ketonowych wynosi od 15 do 70 mg% (17). Spowodowana jest ona niepełnym pokryciem zapotrzebowania energetycznego w związku z nasileniem przemian pośrednich w okresie ciąży i laktacji, bądź też jest następstwem nieprawidłowego żywienia (pasze zawierające związki ketoplastyczne).

W tej sytuacji wylania się problem diagnostyki laboratoryjnej ketoz u przeżuwaczy. Celem pracy było opracowanie rutynowej metody oznaczania ciał ketonowych w osoczu, sianie i mleku u bydła. Dotychczasowe metody ilościowego oznaczania ciał ketonowych opierają się na barwnych reakcjach, jakie daje aceton, bądź kwas acetoctowy z nitroprusydkiem sodowym, aldehydem salicylowym i 2,4-dwunitrofenylohydrazyną. Do jakościowego (7, 13, 14), bądź ilościowego (2, 9, 12) oznaczania stężenia ciał ketonowych najczęściej wykorzystywana jest próba z nitroprusydkiem sodowym, w której powstający czerwono-brunatny związek daje podstawę do badań kolorymetrycznych. Reakcja ta jest czuła przede wszystkim w odniesieniu do acetoctanu i w wypadku oznaczania całkowitych ciał ketonowych w materiale biologicznym, otrzymuje się wyniki zaniżone, poza tym w warunkach przechowywania materiału, jak i w warunkach próby (temperatura), następuje dekarboksylacja acetoctanu do acetonu. Jedną z najbardziej czułych w stosunku do acetonu metod oparta jest na tworzeniu czerwonego produktu kondensacji tego metabolitu z aldehydem salicylowym (4, 5, 6). Pomimo licznych modyfikacji upraszczających tę metodę (1, 3, 10), istnieją nadal duże trudności z zastosowaniem jej w rutynowych badaniach masowych, ze względu na konieczność przeprowadzenia acetoctanu w aceton oraz oddestylowania acetonu z materiału biologicznego, bądź oddestylowania go w naczynkach Conwaya (16).

Podobnie kłopotliwa jest kolorymetryczna metoda oznaczania ilościowego ciał ketonowych w postaci acetonu oparta na barwnej reakcji tego związku z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną, wymagająca również przeprowadzenia acetoctanu w aceton, sama reakcja natomiast przebiega w wysokiej temperaturze i pod ciśnieniem (11).

Ogólnie znane metody miareczkowe (jodometryczne i oksydymetryczne) są dokładne, ale nieprzydatne do szybkich oznaczeń masowych, znajdują natomiast zastosowanie przy oznaczaniu stężenia acetonu w roztworach standardowych.

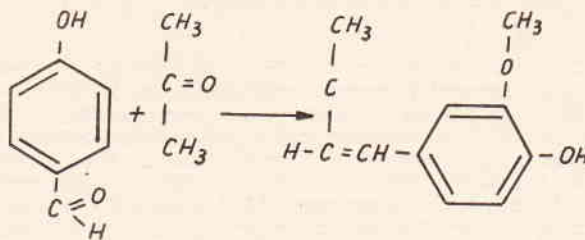
W związku z brakiem prostych metod możliwych do wykonania w badaniach masowych, laboratoria posługują się obecnie przede wszystkim próbami jakościowymi z nitroprusydkiem sodowym, które stosuje się dla osocza rozcieńczonego wodą. Wykazano, że poziom ciał ketonowych w moczu i mleku jest wykładnikiem nasilenia ketonemii, jednak korelacja stężenia tych związków we krwi, moczu i mleku jest niewielka. Jest to wynikiem utleniania ketonów w tkankach pozawątrobowych, proporcjonalnie do stężenia we krwi. Mechanizm oksydacji ciał ketonowych zostaje nasycony przy stężeniu tych metabolitów we krwi około 70 mg%. Dopiero przy takim ich poziomie dalszy wzrost ketogenezy powoduje zwiększenie wydalania acetonu, kwasu acetoctowego i beta-hydroksymasłowego z moczem.

Ponieważ dla związków ketonowych istnieje zjawisko przypominające próg nerkowy, lepszą metodą ustalenia nasilenia ketozy jest oznaczanie ketonemii a nie ketonurii.

W tej sytuacji wydawało się celowe opracowanie metody ilościowego oznaczania ciał ketonowych, która nie wymagałaby długiej wstępnej obróbki materiału biologicznego, jak odbiałanie, destylacja, dyfuzja acetonu czy przekształcanie acetoctanu w aceton, a która określałaby poziom jak największej ilości frakcji ciał ketonowych.

Materiał i metody

Aceton oznaczano w osoczu, sianie i mleku u krów rasy ncb. Krew w celu odciążenia osocza pobiera-



no do probówek pod warstwę parafiny, podobnie siarę i mleko. Do oznaczania poziomu acetonu wykorzystano reakcję kondensacji waniliny z acetonem w środowisku silnie alkalicznym, w wyniku której powstaje związek o czerwono-brunatnym zabarwieniu, wykazujący maksimum absorpcji przy długości fali 490 nm.

Odczynniki

1. 60% KOH
2. 10% roztwór waniliny w alkoholu metylowym (przygotowany na świeżo)
3. 1 n NaOH
4. 0,1 n J w KJ sporządzony przez rozpuszczenie 6,3425 g jodu krystalicznego i 9 g KJ cz.d.a w małej ilości wody i dopełniony wodą do objętości 500 ml
5. 1 n H₂SO₄
6. 1% skrobia
7. 0,1 n Na₂S₂O₃
8. Mieszanka odbiałczająca mleko i siarę: 10 g ZnSO₄, 10 g KOH uzupełnione wodą dest. do objętości 100 ml.

Schemat postępowania przy oznaczaniu acetonu w osoczu przedstawia tab. 1.

Tab. 1.

	B	S	S _{odcz.}
Osocze (ml)	1	1	—
KOH 60% (ml)	1	1	1
H ₂ O dest. (ml)	—	0,5	1
Wanilina 10% (ml)	0,5	—	0,5
Łażnia wodna 65°C — 20 min.			
H ₂ O dest. (ml)	5	5	5

Kolorymetrować natychmiast wobec wody dest. przy długości fali 490 nm, w kuwetach grubości 1 cm.

Przy każdym oznaczaniu zaleca się wykonanie kilku prób ślepych odczynnikowych, po dodaniu KOH nie należy przerwać oznaczania na dłużej niż 5 minut. Poziom ciał ketonowych w postaci acetonu, wzy rażony w mg w 100 ml osocza obliczono według wzoru: mg% acetonu w osoczu = $K(E_B - E_S - E_{S \text{ odcz.}})$, gdzie K jest średnim współczynnikiem kalibracji wyliczonym przy sporządzaniu krzywej kalibracyjnej, E_B jest ekstynkcją próby badanej, E_{S odcz.} jest ekstynkcją próby ślepej odczynnikowej, E_S jest ekstynkcją próby ślepej.

Tab. 2.

	1	2	3	4	S _{odcz.}
Roztwory standardowe (ml) *)	1	1	1	1	—
H ₂ O dest. (ml)	—	—	—	—	1
KOH 60% (ml)	1	1	1	1	1
Wanilina 10% (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Łażnia wodna 65°C — 20 min.					
H ₂ O dest. (ml)	5	5	5	5	5

Kolorymetrować natychmiast wobec S_{odcz.} przy długości fali 490 nm, w kuwetach grubości 1 cm.

Objaśnienie: *) = zawierające odpowiednio: 3,83 mg%, 7,66 mg%, 15,32 mg%, 22,98 mg% acetonu.

Do wykreślenia krzywej kalibracyjnej użyto roztworów acetonu o wzrastających stężeniach, otrzymanych ze standardów acetonu sporządzonego przez rozcieńczenie 5 ml acetonu cz.d.a. 495 ml wody destylowanej. W roztworze standardowym zawartość acetonu oznaczono jodometrycznie według ogólnie przyjętych zasad. Jodometryczne miareczkowanie acetonu przeprowadzono umieszczając w zlewce na 250 ml

5 ml standardu acetonu, 25 ml 1 n NaOH i stopniowo mieszając 50 ml roztworu J w KJ. Po 15 minutach dodano 30 ml 1 n H₂SO₄, 0,6 ml skrobi i miareczkowano 0,1 n Na₂S₂O₃ do odbarwienia. Zawartość acetonu w roztworze standardowym wyliczono uwzględniając zależność, że 1 ml 0,1 n J w KJ odpowiada 0,9675 mg acetonu, według wzoru: mg% acetonu = $50 \text{ ml} - X \text{ ml } 0,1 \text{ n Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(0,9675)20$

Używany roztwór standardowy zawierał 766,26 mg acetonu w 100 ml. Przygotowano rozcieńczenia standardu o zawartości 3,83 mg%, 7,66 mg%, 15,32 mg%, 22,98 mg% acetonu. Schemat postępowania przy sporządzaniu krzywej kalibracyjnej przedstawia tab. 2. Wyliczono średni współczynnik kalibracji $K = \frac{C}{E}$, gdzie C jest stężeniem acetonu, E odpowiadającą temu stężeniu ekstynkcją. W badaniach własnych współczynnik kalibracji przy odczytach na fotokolorymetrze Specol wynosił 22,96.

Tab. 3. Wyniki prób odzyskiwania acetonu przy oznaczaniu tego metabolitu w osoczu

Aceton w próbie wartości oczekiwane mg	Aceton — średnie wartości odzyskane mg	% odzysku	n
0,038	0,035	92,2	12

Wyniki i omówienie

Dokonano charakterystyki metody pod względem: dokładności, czułości i precyzji. Dokładność metody oceniono na podstawie przeprowadzonych prób odzysku (tab. 3). Fabinyi (cyt. za 8) ocenia czułość próby z waniliną na 0,00025% z błędem 5%. W badaniach własnych oznaczając poziom acetonu w osoczu wykrywano 0,01 mg tego metabolitu w próbie, co odpowiadało 1 mg w 100 ml osocza. Precyzję zakresu błędu oznaczono metodą kolejnych powtórzeń próby w osoczu (tab. 4). Jak widać metoda cechuje się dużą powtarzalnością, z odchyleniem standardowym równym 0,617, przy średniej 11,16.

Tab. 4. Ocena powtarzalności metody oznaczania acetonu w osoczu

	Parametr	Wartość
Średnia z powtórzeń i błąd średniej	$\bar{x} \pm m$	11,16 ± 0,1380
Suma wyników	$\sum x$	223,25
Suma kwadratów odchyłeń	$\sum (x - \bar{x})^2$	7,2463
Ilość powtórzeń	n	20
Odchylenie standardowe	δ	± 0,617

Aceton w siarze i mleku oznaczono po uprzednim odbiałczeniu. Zgodnie z wymogami reakcji odbiałcz musi zachować odczyn alkaliczny lub obojętny. Odbiałczanie siary i mleka taniną i kwasem sulfofalicylowym powodowało wzrost stężenia jonów wodorowych w próbie, podobnie nie dawało wyników zastosowanie podpuszczki, która wytrącała jedynie kazeinę. Odbiałczanie siary i mleka przeprowadzono przy użyciu mieszaniny składającej się

z 10 g $ZnSO_4$ i 10 g KOH uzupełnionej wodą destylowaną do objętości 100 ml. Pobrane mleko lub siarę rozcieńczono mieszaniną odbiałczającą w stosunku 1:1. Po wymieszaniu wirowano 10 minut przy 3000 obr./min. Supernatant po odciążeniu pokrywano warstwą parafiny. W celu wyeliminowania barwy, jaką wanilina może dawać z innymi składnikami mleka, wprowadzono dodatkową próbę nie zawierającą KOH, oznaczoną jako B_{KOH} . Tab. 5 zawiera schemat oznaczenia poziomu acetonu w mleku i siarze.

Tab. 5.

	B	S	B_{KOH}	$S_{odcz.}$
Mleko odbiałczone (ml)	1	1	1	—
KOH 60% (ml)	1	1	—	1
H_2O dest. (ml)	—	0,5	1	1
Wanilina 10% (ml)	0,5	—	0,5	0,5

Łażnia wodna 65°C — 20 min.

H_2O dest. (ml)	5	5	5	5
-------------------	---	---	---	---

Kolorymetrować natychmiast wobec wody przy długości fali 490 nm w kuwetach grubości 1 cm.

Zawartość ciał ketonowych w siarze i mleku w postaci acetonu wyrażona w mg w 100 ml siary lub mleka obliczano wg wzoru: $mg\% \text{ acetonu} = K(E_B - E_S - E_{BKOH})$, gdzie K jest średnim współczynnikiem kalibracji, wyliczonym przy sporządzaniu krzywej kalibracyjnej, E_B jest ekstynkcją próby badanej, E_S jest ekstynkcją próby ślepej, E_{BKOH} — ekstynkcją próby nie zawierającej KOH. Wyniki dotyczące prób odzysku przedstawia tab. 6. Wskazują one na wy-

Tab. 6. Wyniki prób odzyskiwania acetonu przy oznaczaniu tego metabolitu w siarze i mleku

Aceton w próbie wartości oczekiwane mg	Aceton w próbie średnie wartości odzyskane mg	% odzysku	n
0,014	0,017	119,1	12

stępowanie w mleku związków innych niż aceton, dających również pozytywne reakcje barwne z waniliną, takich jak: acetoctan czy betahydroksymaślan przekształcający się w acetoctan.

W tab. 7 ujęte zostały dane dotyczące precyzji metody. Jak widać, charakteryzuje się ona

Tab. 7. Ocena powtarzalności metody oznaczania acetonu w mleku

	Parametr	Wartość
Średnia z powtórzeń i błąd średniej	$\bar{x} \pm m$	$4,21 \pm 0,0913$
Suma wyników	$\sum x$	84,20
Suma kwadratów odchyień	$\sum (x - \bar{x})^2$	3,165
Ilość powtórzeń	n	20
Odchylenie standardowe	δ	0,408

dobrą powtarzalnością, przy odchyleniu standardowym 0,408, przy średniej z powtórzeń 4,21. Cechą odróżniającą metodę oznaczania ciał ketonowych w osoczu i mleku przy użyciu waniliny od stosowanych powszechnie w laboratoriach jest maksymalne uproszczenie jej wykonania, polegające na eliminacji odbiałczania materiału biologicznego (z wyjątkiem siary i mleka), destylacji acetonu bądź utleniania wszystkich ketonów krwi lub mleka — unika się w ten sposób niebezpieczeństwa przekształcenia ketonów krwi w inne związki niż aceton, co może nastąpić przy stosowaniu takich utleniaczy jak dwuchromiany. Dotychczasowe metody sprowadzają się do oznaczania tylko jednej frakcji ciał ketonowych: acetonu bądź acetoctanu, stąd średnie wartości fizjologicznego poziomu tych metabolitów we krwi i mleku spotykane w literaturze są nieco niższe (10, 15) niż otrzymane metodą z waniliną, którą jednocześnie określa się poziom dwóch frakcji ketonowych: acetonu i acetoctanu.

Wnioski

Przedstawiona metoda oznaczania stężenia związków ketonowych w osoczu, siarze i mleku z użyciem waniliny nadaje się do oznaczeń rutynowych, charakteryzuje się wysoką precyzją, dużą dokładnością i czułością.

Piśmiennictwo

- Adler J. H.: Cornell vet. 47, 354, 1957.
- Adler J. H., Roberts S. J., Steel R. G. D.: Cornell vet. 47, 101, 1957.
- Bahner H.: Biochem. Z. 223, 327, 1952.
- Behre J. A.: J. Lab. Clin. Med. 8, 770, 1928.
- Behre J. A.: J. Lab. Clin. Med. 13, 1155, 1928.
- Behre J. A., Benedict S. R.: J. Biol. Chem. 70, 437, 1926.
- James R. C., Chase G. R.: Diabetes 23, 474, 1974.
- Lange B.: Kolorimetrische Analyse, Verlag Chemie 6 MBH, 1956.
- Madonia J. P.: Amer. J. Clin. Path. 39, 206, 1963.
- Mehnert E.: Arch. Exp. Vet. Med. 24, 1269, 1970.
- Michaels G. D., Margen S., Liebert G., Kinsell L. W.: J. Clin. Invert. 30, 1483, 1951.
- Paterson A. B.: Vet. Jour. 101, 199, 1945.
- Ross S. G.: J. Lab. Clin. Med. 416, 908, 1931.
- Rothera A. C. H.: J. Physiol. 37, 491, 1908.
- Sampson J., Boley L. E.: Amer. J. vet. Res. 2, 327, 1945.
- Thin C., Robertson A.: Biochem. J. 51, 218, 1952.
- Thin C., Robertson A.: J. Comp. Pathol. Therap. 63, 184, 1953.

Adres autora: dr Barbara Majewska, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.

Маевска Б., Рыбчиньска Ю. — **Определение кетонных тел в форме ацетона в плазме крови, в молозиве и молоке крупного рогатого скота.**

Авторы разработали колориметрический метод количественного определения кетонных тел в плазме крови, в молозиве и в молоке крупного рогатого скота, основанный на реакции конденсации ванilина с ацетоном в алкалической среде. Метод характеризуют большая повторяемость, чувствительность и высокая точность; он является пригодным для рутинных исследований.

Majewska B., Rybczyńska J. — **The determination of ketones as acetone in plasma, colostrum and milk in the cow.**

A colorimetric quantitative method based on the condensation of vanillin and acetone in an alkaline medium was developed for the determination of the level of ketones in plasma, colostrum and milk in the cow. The method was characterized by a great repeatability, sensitivity and a high precision. It appeared very useful for routine determinations.