

15. Kemona Z.: *Peł. pol.* 48, 12, 1973.
16. *Obtulowicz M.*: Zarys alergologii. AM Kraków, 1971.
17. *Rinkel H. J.*: Food allergy. Thomas, Springfield, 1951.
18. *Romański B.*: Alergologia dla internistów. PZWL, 1976.
19. *Rudzki E.*: Podstawy alergologii klinicznej. PZWL, 1970.
20. *Stanworth D. R.*: Immediate hypersensitivity. Am. Elsevier Comp. N. Y., 1973.
21. *Stintzing G., Zetterstr R.*: Acta Paediatr. Uppsala 68, 333, 1979.
22. *Urbach E.*: Klinik und Therapie der allergischen Krankheiten. W. Maudrich, Wien 1935.
23. *Walton G. S.*: Vet. Rec. 67, 709, 1967.
24. *Walton G. S.*: Vet. Rec. 83, 35, 1968.
25. *Walzer M.*: J. Immun. 17, 143, 1929.
26. *Waughan W. T., Black J. H.*: Practice of allergy. Kimpton, Lond., 1948.

Adres autora: dr Zbigniew Pomorski, Al. Kraśnicka 89/2, 20-718 Lublin.

JÓZEF FILAR, ELIGIUSZ MADEJ, STANISŁAW DACKA

## Prosta metoda oznaczania związków ketonowych i ich poziom we krwi krów zdrowych i z subkliniką ketozą

Z Kliniki Chorób Wewnętrznych Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego  
AR w Lublinie  
Z Instytutu Chemii UMCS w Lublinie

Wraz ze wzrostem zainteresowania w Polsce badaniami nad ketozą u krów oraz opracowaniem programów kontroli zdrowia dla stad krów mlecznych, powstało zapotrzebowanie na dokładne, a równocześnie proste metody (nadające się do badań masowych) oznaczania związków ketonowych (Zw. K.) w krwi (1, 4, 6, 11).

Ogólnie znane trudności w oznaczaniu całkowitej ilości Zw. K. (acetonu, acetoctanu i B-hydroksymaślanu) w postaci acetonu za pomocą metod chemicznych sprawiają, że ciągle opracowywane są nowe metody, bądź ich modyfikacje, zmierzające do zwiększenia dokładności oraz uproszczenia techniki oznaczania (2, 7, 14, 15). Mała dokładność niektórych metod wynika między innymi z niepełnej konwersji B-hydroksymaślanu do acetonu (2), co ma szczególne znaczenie przy oznaczaniu Zw. K. u krów, gdyż B-hydroksymaślan jest głównym związkiem ketonowym (stanowi około 85% sumy związków ketonowych) w krwi tych zwierząt (1).

Trudności techniczne ograniczające zastosowanie niektórych metod do badań masowych polegają głównie na konieczności przeprowadzenia acetoctanu i B-hydroksymaślanu w aceton oraz czasochłonnym oddestylowaniu lub oddyfundowaniu go w naczyniach mikrodyfuzyjnych lub Convaya. Wad tych pozbawione są metody enzymatyczne (1).

Trudności związane z importem enzymu, dehydrogenazy kwasu B-hydroksymasłowego, ograniczają jak dotychczas szersze ich wprowadzenie w Polsce.

Celem badań było:

— adaptacja i ocena metody zaproponowanej w 1970 r. przez Göschke, w której wyeliminowano destylację oraz dyfuzję acetonu,

— określenie za pomocą tej metody zawartości Zw. K. we krwi u krów zdrowych i z subkliniką ketozą.

### Materiał i metody

Zasada metody. Metoda służy do oznaczenia sumy związków ketonowych (acetonu, acetoctanu i B-hydroksymaślanu) w postaci acetonu. Zasada metody polega na przeprowadzeniu acetoctanu i B-hydroksymaślanu w obecności kwasu siarkowego i dwuchromianu potasu w temp. 110° i 140° C w aceton i jego barwnej reakcji z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną.

Odczynniki. Wszystkie odczynniki winny być dużej czystości (cz.d.a.).

1. Wodorotlenek baru (Ba(OH)<sub>2</sub>) — 0,1 M
2. Siarczan cynku (Zn SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) — 3,5%
3. Kwas siarkowy (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) — 6 M
4. Dwuchromian potasu (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) — 0, 35%
5. Siarczan sodu (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) — 5%
6. Chlorowodorek 2,4 — dwunitrofenylohydrazyny
7. Odczynnik wywołujący barwę. 0,2 g chlorowodoru 2,4 — dwunitrofenylohydrazyny rozpuścić w 100 ml 5 M kwasu siarkowego, a następnie wytrząsać 3-krotnie z czterochlorkiem węgla.
8. Czerochlorek węgla
9. Wodorotlenek sodu (NaOH) — 0,25 M
10. Aceton. Macierzysty roztwór wzorcowy acetonu oraz wzorcowe roztwory robocze przygotowane wg ogólnie przyjętych zasad w analityce laboratoryjnej. Dokładne stężenie acetonu w macierzystym roztworze należy określić metodą jodometryczną (14). Podstawowy sprzęt laboratoryjny. Probówki z korkiem na szlif o wysokości 22 cm i średnicy 1,5 cm, łaźnia olejowa z termoregulacją, wytrząsarką, pompa wodna, fotometr (Specol).

Postępowanie analityczne. Krew pobrać do probówek z heparyną. Bezpośrednio po pobraniu włożyć probówkę do termosu z lodem (zapobiega to spontanicznej dekarboksylacji acetoctanu do acetonu i jego stratom) i tak transportować.

Odbiałczanie. Do probówek wirówkowych (z korkiem na szlif) odmierzyć 11 ml bidestylowanej wody oraz 1 ml krwi, wymieszać, po czym dodać 4 ml wodorotlenku baru, a następnie 4 ml siarczanu cynku. Probówki zamknąć korkiem, a zawartość energicznie wymieszać, po czym wirować przez 5 min. przy 3000 obr/min.

Oznaczanie związków ketonowych. Do probówki z korkiem na szlif odmierzyć 2,5 ml supernatantu i dodać 0,5 ml M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wymieszać. Probówki zamknąć korkami posmarowanymi smarem Silikon i ogrzewać w łaźni olejowej w temp. 110°C przez 10 min (jest to etap dekarboksylacji acetoctanu do acetonu). Po wyjęciu z łaźni probówki oziębić w wodzie z lodem, po czym zawartość wymieszać przez kilkakrotnie odwrócenie probówki i dodać 0,5 ml 0,35% dwuchromianu potasu. Probówki zamknąć korkiem, zawartość wymieszać i ogrzewać w temp. 135–140°C przez 45 min (jest to etap utleniania B-hydroksymaślanu do acetonu). Po wyjęciu z łaźni probówki oziębić w wodzie z lodem, wymieszać, dodać 0,5 ml 5% siarczanu sodowego, 0,5 ml roztworu 2,4 — dwunitrofenylohydrazyny i 5 ml czterochlorku węgla. Umieścić probówki w wytrząsarce i wytrząsać przez 30 min., aby powstały 2,4-dwunitrofenylohydrazon przeszedł do czterochlorku węgla. Po oddzieleniu się

2 faz, odciągnąć fazę wodną, a do organicznej dodać 3 ml 0,25 M wodorotlenku sodowego i ponownie wytrząsać przez 3 min. Następnie odciągnąć fazę alkaliczną, a w fazie organicznej (czterochlorek węgla) zmierzyć ekstynkcję 2,4 — dwinitrofenylohydratonu acetonu przy długości fali 420 nm w kuwecie  $d = 1$  cm. Do każdej serii oznaczeń należy wprowadzić po dwie próby kontrolne (dodając zamiast krwi 1 ml wody redystylowanej) oraz 2 próby wzorcowe (dodając 1 ml wzorcowego roztworu roboczego) i przeprowadzić je przez cały tok analizy. Stężenie związków ketonowych w badanej próbce oblicza się według wzoru:  $mg \text{ acetonu we krwi} = K(E_B - E_S)$ , gdzie  $K$  jest średnim współczynnikiem kalibracji wyliczonym przy wyznaczaniu krzywej kalibracyjnej,  $E_B$  — ekstynkcją próby badanej, a  $E_S$  — próby ślepej. W badaniach własnych średni współczynnik kalibracji wyniósł 54,37.

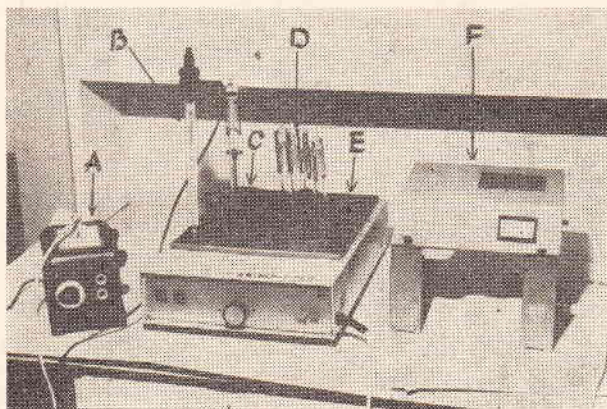
Modyfikacja metody. W celu przystosowania metody do naszych warunków i możliwości, wprowadzono (w porównaniu z oryginalną metodą) następujące zmiany:

a) zmniejszono ilość używanej do analizy krwi z 2 do 1 cm, w celu zmniejszenia wartości ekstynkcji w czasie odczytu (we krwi u krów w porównaniu z ludźmi, już w warunkach fizjologicznych, występuje większe stężenie związków ketonowych),

b) wprowadzono dodatkowe ochładzanie próbek strumieniem zimnego powietrza w celu niedopuszczenia do strat acetonu w czasie podgrzewania próby,

c) wobec braku w handlu próbek z zakręcanym korkiem (zalecanych w oryginalnej metodzie), dorobiono specjalnie próbki z korkiem na szlif i uchwyty do gumy (ryc. 1). W doświadczeniach własnych stwierdzono, że w tak uszczelnionych próbkach nie dochodzi do strat acetonu w czasie analizy,

d) skonstruowano specjalny zestaw do podgrzewania prób (ryc. 1), składający się z łaźni olejowej (adaptowano do tego celu łaźnię wodną), automatycznego wyłącznika prądu połączony z termometrem kontaktowym, 2 wentylatorów; zastosowanie takiego zestawu pozwala na równoczesne podgrzewanie 40 prób.



Ryc. 1. Zestaw do podgrzewania prób: A — automatyczny wyłącznik prądu, B — termometr kontaktowy, C — stelaż do próbek, D — próbki, E — łaźnia olejowa (110°C i 140°C), F — dmuchawa zimnego powietrza

Ocena metody. W ocenie metody posłużono się wyznaczeniem błędu metody, kontrolą dokładności poprzez tzw. próbę odzysku, porównaniem jej z metodą enzymatyczną oraz wyznaczeniem wartości prawidłowych u krów zdrowych. Przeprowadzono również oznaczenia Zw. K. we krwi u krów z subkliniczną ketozą. W celu wyznaczenia błędu metody wykonano 10 podwójnych oznaczeń poziomu Zw. K. w tej samej krwi. Błąd metody wyrażony wielkością współczynnika zmienności (stosunek odchylenia standardowego do średniej arytmetycznej wyrażony w %) wyniósł 7,96%.

Próbę odzysku dla acetonu przeprowadzono w ten sposób, że wykonano oznaczenia zawartości Zw. K. w 3 różnych próbkach krwi, do których dodano znane ilości acetonu oraz w tych samych próbkach bez dodatku acetonu. Na podstawie odpowiednich obliczeń stwierdzono, że odzysk wyniósł średnio 103,4% (wahania 99,65 — 107,6%). Istotnym elementem oceny było porównanie wyników oznaczeń Zw. K. w 3 próbkach krwi opisaną metodą z wynikami otrzymanymi przez oznaczenie w tych samych próbkach krwi poszczególnych Zw. K. tj. acetonu, acetoocetanu, B-hydroksymaślanu (tab. 1). Aceton oznaczono metodą chemiczną podaną przez Procasa (8), a acetoocetan i B-hydroksymaślan metodą enzymatyczną (1) uznaną za specyficzną i swoistą. Wyniki zestawione w tab. 1 wskazują na dużą zgodność otrzymanych danych.

Tab. 1. Porównanie wyników oznaczeń związków ketonowych w krwi za pomocą różnych metod (w mg/100 ml)

Nr próbki krwi	Poziom poszczególnych związków ketonowych			Suma zw. ketonowych w przeliczeniu na aceton	Poziom zw. ketonowych w przeliczeniu na aceton stwierdzony opisaną met.
	Aceton	Acetoocetan	$\beta$ -hydroksymaślan		
1	0,40	0,35	4,80	3,27	3,20
2	0,36	0,30	4,20	2,88	2,95
3	0,35	0,28	4,15	2,82	2,80

Objaśnienie: w celu przeliczenia zawartości acetoocetanu i B-hydroksymaślanu na aceton, należy pomnożyć otrzymane wyniki odpowiednio przez współczynnik 0,57 i 0,56.

## Wyniki i omówienie

Wyniki oznaczeń zawartości Zw. K. we krwi u 250 krów zdrowych oraz 44 z subkliniczną ketozą przedstawiono w tab. 2. Dla porównania w tabeli podano również wyniki zebrane z piśmiennictwa. Krowy zdrowe (100 w ostatnim okresie ciąży i 150 w okresie między 2 a 8 tyg. po porodzie) miały średnią roczną wydajność mleczną od 2600 do 5000 kg mleka. Krowy od nich pobierano dwa razy w roku — w jesieni (X, XI) i na wiosnę (III, IV, V).

Tab. 2. Poziom sumy związków ketonowych w postaci acetonu w krwi krów na podstawie piśmiennictwa oraz badań własnych

Grupa krów	Liczba krów	Poziom zw. ketonowych		Pozycja piśmiennictwa
		w mg/100 ml	w mmol/l	
Krowy zdrowe	23	4,46 ± 0,63	0,77 ± 0,11	5
	280	1,92 ± 0,78	0,33 ± 0,13	7
	98	2,42 ± 0,76	0,41 ± 0,13	12
	13	2,55 ± 0,69	0,44 ± 0,12	16
	250	3,16 ± 0,84	0,54 ± 0,14	
Krowy z subkl. ketozą	gosp. I 14	14,10 ± 4,11	2,43 ± 0,70	wyniki własne
	gosp. II 20	8,43 ± 2,62	1,45 ± 0,45	
	gosp. III 10	8,18 ± 2,51	1,41 ± 0,43	

Na podstawie danych tab. 2 wyliczono, że u krów zdrowych zakres tzw. normy oszacowanej (średnia  $\pm 2$  odchylenia standardowe) dla Zw. K. w badaniach własnych wynosi od 1,48 do 4,84 mg/100 ml. U krów tych stwierdzono równocześnie prawidłowy poziom glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych i ujemne wyniki badania moczu na zawartość Zw. K.

U krów z subkliniczną ketozą poziom Zw. K. uahał się od 5,45 do 20,1 mg/100 ml przy średniej wartości 14,1 (gosp. I), 8,43 (gosp. II) i 8,18 (gosp. III). U krów tych poza spadkiem wydaj-

ności mlecznej stwierdzono ketonurię, a we krwi podwyższony poziom wolnych kwasów tłuszczowych i spadek poziomu glukozy.

Opisana metoda oznaczania sumy Zw. K. w postaci acetonu we krwi bydła, spełnia warunki stawiane metodom rutynowym. Wyeliminowanie w tej metodzie kłopotliwej destylacji oraz czasochłonnego oddyfundowania acetonu, znacznie upraszcza postępowanie metodyczne, co umożliwia zastosowanie jej do seryjnych oznaczeń. Ma to duże znaczenie w medycynie weterynaryjnej, bowiem oznaczanie poziomu Zw. K. jest jednym z ważnych elementów programów kontroli zdrowia stad krów mlecznych i diagnostyki laboratoryjnej ketozy (3, 4, 6, 10, 12, 13, 14). W związku z tym wyłoniła się potrzeba opracowania wartości prawidłowych dla tego wskaźnika we krwi u krów zdrowych, zwłaszcza, że brak jest dotychczas w polskim piśmiennictwie prac dotyczących wartości granicznych dla poziomu Zw. K., które można przyjąć za świadczące o braku lub występowaniu zaburzeń przemiany materii typu subklinicznej ketozy u krów.

Biorąc pod uwagę górną granicę normy (4,84 mg/100 ml) i po uwzględnieniu błędu metody (7,96%) można przyjąć, że wartością graniczną, powyżej której poziom sumy Zw. K. w postaci acetonu będzie świadczył o istnieniu subklinicznej ketozy wynosi 5 mg/100 ml. Podobną wartość graniczną przyjmują również niekierujący autorzy zagranicą (9, 10, 12).

Za słusznością takiego poglądu przemawiają również wyniki uzyskane w 3 stadach (tab. 2), w których u krów mlecznych w okresie poporodowym (2—6 tygodni) stwierdzono zaburzenia metaboliczne typu subklinicznej ketozy na podstawie badań klinicznych i zespołu prób laboratoryjnych wchodzących w skład tzw. ogólnego testu zdrowia (4). U krów tych poziom Zw. K. we krwi wynosił powyżej 5 mg/100 ml.

### Wnioski

1. Opisana metoda oznaczania Zw. K. we krwi u krów jest stosunkowo łatwa do przeprowadzenia i nadaje się do oznaczeń rutynowych.

2. Wartość graniczna, powyżej której poziom Zw. K. w postaci acetonu świadczy o istnieniu zaburzeń przemiany materii typu subklinicznej ketozy u krów wynosi 5 mg/100 ml.

### Piśmiennictwo

1. Filar J.: *Medycyna Wet.* 35, 747, 1979.
2. Göschke H.: *Clin. Chim. Acta.* 28, 359, 1970.
3. Gürtler H.: *Mh. Vet.-Med.* 31, 481, 1976.
4. Madej E., Pinkiewicz E., Filar J., Stec A.: *Medycyna Wet.* 35, 402, 1979.
5. Malinowska A., Daszyńska F.: *Medycyna Wet.* 26, 433, 1970.
6. Mazurczak J.: *Prz. hod.* 45, 2, 1977.

7. Mehnert E.: *Arch. Exp. Vet. Med.* 24, 1269, 1970.
8. Procos J.: *Clin. Chem.* 7, 97, 1961.
9. Rosenberger J.: *Krankheiten des Rindes.* Parey, Berlin—Hamburg 1970.
10. Rossow N., Schäfer M., Le Minh Ch., Bethe W.: *Mh. Vet.-Med.* 29, 89, 1974.
11. Rutkowiak B.: *Medycyna Wet.* 35, 287, 1979.
12. Schäfer M.: *Mh. Vet.-Med.* 31, 262, 1976.
13. Schäfer M., Schwarzer E.: *Mh. Vet.-Med.* 26, 582, 1971.
14. Tomicki Z., Łazuka W., Joszt B.: *Medycyna Wet.* 35, 386, 1979.
15. Voigt J., Steger H.: *Arch. Tierernähr.* 17, 289, 1967.
16. Zahor-Honory D.: *Pol. Arch. wet.* 16, 231, 1973.

Adres autora: dr Józef Filar, Al. PKWN 30, 20-612 Lublin.

Филлар Ю., Мадей Э., Дацка С. — Простой метод определения кетоновых соединений и их уровень в крови здоровых коров и с субклиническим кетозом.

В работе показана большая пригодность модифицированного метода по Гешке для определения суммы кетоновых соединений в виде ацетона в крови коров. Уровень кетоновых соединений в крови, определенный описанным методом у 250 здоровых коров, составлял в среднем  $3,16 \pm 0,84$  мг/100 мл. У 44 коров с субклиническим кетозом этот уровень составлял  $5,45 \pm 20,1$  мг/100 мл. В качестве предельной величины для уровня кетоновых соединений, выше которой можно говорить о субклиническом кетозе, приняли уровень выше 5 мг/100 мл.

Filar J., Madej E., Dacka S. — A simple method of the determination of ketone compounds and their level in blood of normal cows and cows with subclinical ketosis.

In the studies was proved a great usefulness of the modified Goshke's method for the determination of the sum of ketone compounds in the form of acetone in blood of cows. The mean level of ketone compounds in blood of 250 normal cows determined according to the above method was  $3.16 \pm 0.84$  mg/100 ml. In blood of 44 cows with subclinical ketosis it ranged from 5.45 to 20.1 mg/100 ml. The level of ketone compounds in blood above 5.0 mg/100 ml was assessed as a terminal value. The level of these compounds above this value may point to subclinical ketosis.

RANDELL W. F., BRADLEY R. F.: Wpływ heksachloreтанu na wydajność mleczną krów zarażonych *Fasciola hepatica* w Północnej Florydzie. (Effects of hexachlorethane on the milk yields in dairy cows in North Florida infected with *Fasciola hepatica*). *Am. J. vet. Res.* 41, 262, 1980 (2)

U krów zarażonych motylicą wątrobową oceniono wpływ stosowania heksachloreтанu w dawkach terapeutycznych na wydajność mleczną. Istnienie zarażeń *F. hepatica* u krów potwierdzono badaniami pośmiertnym wątroby krów wybrakowanych oraz badaniami koproskopowymi. U krów leczonych wydajność mleczna dzienna w okresie 90-120 dni po leczeniu wzrosła o 5,0 kg po jednorazowym oraz o 4,0 kg po dwukrotnym stosowaniu heksachloreтанu. U krów nie leczonych oraz u krów wolnych od zarażenia nie notowano znacznego wzrostu dziennej wydajności mlecznej w porównaniu do poprzedniego okresu laktacji. Ponadto po jednorazowym zastosowaniu leku w dawce 90 g/zwierzę liczbajaj *F. hepatica* wydalanych z kałem obniżyła się o 73,0%, zaś po dwukrotnym stosowaniu leku w odstępie 2-3 miesięcy liczbajaj pasożyta w kale spadła o 91,2%.

G.