

щие близнецы имели несколько более высокий уровень PBI чем имеющие единичные ягнята, но разницы не были существенные. У всех овец наблюдали между 7 и 91 днем лактации существенное понижение уровня PBI.

Kalinowska C., Podgórski W. — **The mutual relationship between the PBI level in blood serum and milk production in sheep.**

It was suggested by the increase of milk secretion and the new sprout of wool under the influence of tyroxine given to sheep that there exists the mutual relationship between the normal physiological thyroid gland activity and some of the useful features of sheep. In order to prove that relationship the level was investigated of iodine conjugated with protein

in the blood serum of 35 nursing mothers, and their milk production and the new yearly sprout of wool. In the investigated sheep the significant positive correlation between the PBI level in the seventh day of lactation and the milk production was found, while the negative correlation appeared in them between the PBI level and the body weight after parturition and the yearly wool production. In the 91-st day of lactation the above mentioned correlations did not appear except for the negative correlations between the PBI level in the blood serum and the wool production.

The mothers with twins had the slightly higher PBI level than those with single young ones, but the differences were insignificant. In all the sheep the significant decrease of PBI level in the blood serum was noticed between the 7-th and 91-st day of lactation.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

TEODOR JUSZKIEWICZ, BARBARA STEFANIAKOWA

Identyfikacja i ilościowe oznaczanie aflatoksyn w orzeszkach ziemnych, śrucie arachidowej i mieszankach paszowych

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: prof. dr T. JUSZKIEWICZ

Szereg osób i instytucji naukowych zwracało się do nas ostatnimi czasy z prośbą o pomoc w oznaczaniu ilościowym aflatoksyn. Większość z nich gorąco nas namawiała do opublikowania na łamach krajowego piśmiennictwa metod, które stosowane są do tych oznaczeń w naszym Zakładzie. Czynimy to wyjaśniając jednocześnie, że jest to do pewnego stopnia kompilacja metod już opublikowanych w połączeniu z modyfikacjami wynikającymi z naszego doświadczenia. Metody poniższe są stosowane przez nas z powodzeniem od dwóch lat i zostały wielokrotnie sprawdzone i zalecone do stosowania w Zakładach Higieny Weterynaryjnej.

Toksyny produkowane przez grzyby (pleśnie) z gatunku *Aspergillus flavus* należą do związków o znacznej toksyczności i właściwościach karcynogennych. Dla związków tych, które są obecnie ściśle już chemicznie oznaczone, przyjęła się powszechnie nazwa aflatoksyn. Spośród czterech najczęściej występujących aflatoksyn (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) najbardziej toksyczną i w największej ilości produkowaną przez *A. flavus* jest aflatoksyna B_1 . Dlatego praktycznie większość metod sprowadza się do oznaczania tylko tej toksyny. W zasadzie jednak pozostanie aflatoksyny można oznaczać postępując w analogiczny sposób jak przy B_1 . Trzeba mieć tylko wzorce tych toksyn lub stabilizowaną śrutę wzorcową o znacznej zawartości aflatoksyn.

Metody wykrywania i oznaczania aflatoksyn można podzielić na dwie zasadnicze grupy: metody biologiczne i metody chemiczne. Spośród metod biologicznych najszersze dotychczas zastosowanie znalazła próba na 1-

dniowych kaczętach (10). Do tej próby, podobnie jak do innych metod biologicznych, używany materiał biologiczny (kaczęta) musi być jednorodny. Kaczęta 1-dniowe dzieli się na kilka grup i podaje ekstrakty z badanego materiału we wzrastających stężeniach. Ekstrakty wprowadza się *per os* sondą 2 razy dziennie po 1 ml przez tydzień. Przy wyższych stężeniach aflatoksyn część kacząt pada, a pozostałe przy życiu zabija się po tygodniu. U padłych i zabitych kacząt obserwuje się charakterystyczne zmiany w preparatach histologicznych wątroby i na ich podstawie określa się poziom aflatoksyny. Metoda może służyć jako próba jakościowa a przy odpowiednim opracowaniu również jako ilościowa.

Prócz opisanej próby znane są jeszcze próby biologiczne na zarodkach kurzych (12) i kulturach tkankowych *in vitro* (4), oraz na narybku pstrąga (6). Wykonanie prób tych napotyka w praktyce na szereg trudności i dlatego nie znalazły one szerszego zastosowania.

W praktyce laboratoryjnej powszechnie przyjęły się ostatnio próby chemiczne, które w podanym poniżej opisie są względnie proste i cechują się dużą dokładnością oraz czułością.

Po stwierdzeniu, że aflatoksyny fluoryzują w świetle UV opracowano szereg metod wykorzystujących tę właściwość. Początkowo zastosowano chromatografię bibułową i obserwowano świecenie plam w świetle lampy fluorescencyjnej na bibule (2). Bardziej dogodną okazała się jednak chromatografia cienkowarstwowa. Opracowano metody rozwijania chromatogramu na warstwie tlenku glinu obojętnego (1) i żelu krzemionkowym (3, 7). Chromatogramy na tlenku glinu okazały się mniej

przydatne, ponieważ Rf było labilne, jak również wszystkie aflatoksyne wędrowały w fazie ruchomej razem i świeciła tylko jedna plamka. W dodatku fluorescencja na tlenku glinu jest mniej intensywna niż na żelu krzemionkowym.

Najbardziej przydatną okazała się metoda stosowana obecnie rutynowo a polegająca na rozwijaniu chromatogramów na płytkach szklanych pokrytych żelazem krzemionkowym G*) w fazie ruchomej 3% metanolu w chloroformie. W tym układzie można dokonać rozdzielania na aflatoksyne B₁, G₁, B₂, G₂, przy czym Rf aflatoksyne B₁ wynosi około 0,5 a G₁ — 0,37. Chromatogramy odczytuje się w świetle lampy UV. Zawartość aflatoksyne w ekstraktach można ocenić przez porównanie intensywności fluorescencji plamek badanych z fluorescencją plamek wzorcowych, lub też bez wzorca metodą kolejnych rozcieńczeń, znajdując takie graniczne rozcieńczenie przy którym gołym okiem można jeszcze dostrzec fluorescencję plamki (np. 0,001 µg aflatoksyne B₁).

W przypadku analizowania śruty na zawartość aflatoksyne, sporządza się ekstrakt chloroformowy, który bezpośrednio nakłada się na płytkę do rozwinięcia chromatogramu. Jeżeli bada się orzechy ziemne procedura wymaga odtłuszczenia zmielonych orzechów w aparacie Soxleta eterem naftowym, a następnie wykonania ekstrakcji aflatoksyn na gorąco metanolem lub chloroformem. Tak uzyskane ekstrakty odparowuje się do sucha, rozpuszcza w niewielkiej ilości chloroformu i nanosi na płytki.

W przypadku analizowania mieszanki paszowej z dodatkiem śruty arachidowej, ze względu na olbrzymią ilość zanieczyszczeń, ekstrakt chloroformowy z paszy poddaje się wstępnemu oczyszczeniu przepuszczając go przez kolumnę z żelazem krzemionkowym 0,05—0,2 (9). Zanieczyszczenia usuwa się z kolumny eterem etylowym i dalej eluuje się aflatoksyne 3% metanolem w chloroformie. Eluat z kolumny odparowuje się, rozpuszcza w chloroformie i nanosi na płytki. Intensywność fluorescencji plamek na płytce można również odczytać za pomocą przyrządu zwanego densytometrem. Jest to oczywiście obiektywniejsza metoda niż ocena przy pomocy oka.

Dla bardziej dokładnych i obiektywnych oznaczeń aflatoksyn stosuje się metodę spektrofotometryczną (8). Jest to metoda obiektywna i dokładna ale wymaga ona zawartości kilku mikrogramów aflatoksyne w próbce. Metoda ta polega na chromatograficznym rozwinięciu pasma ekstraktu w fazie ruchomej, zeszkrobaniu plamy, ekstrakcji aflatoksyne z żelu redestylowanym metanolem i oznaczeniu ekstynkcji przy długości fali 363 mµ.

I. Oznaczenie aflatoksyne w śrucie z orzechów arachidowych

Odczynniki

1. Chloroform cz.d.a., redestylowany,
2. Żel krzemionkowy G (Silica Gel G — Merc lub inny),
3. Metanol cz. d. a.
4. Siarczan sodu bezw. (wysuszony),
5. Bibuła filtracyjna (Whatman 41).

Aparatura i szkło laboratoryjne

1. Wstrząsarka,
2. Zestaw do chromatografii cienkowarstwowej,
3. Lampa analityczna UV (365 mµ), typ L6/58 Famed 1 albo inna,
5. Butla z azotem (pożądana).

5. Butla z azotem (pożądana).

A. Przygotowanie płytek do chromatografii

Płytki umyć kolejno w roztworze detergentu, roztworze alkalicznym, potem w kwaśnym i po dokładnym wypłukaniu wodą destylowaną przemycić alkoholem etylowym. Sporządzić zawiesinę żelu krzemionkowego w następujący sposób: do moździerza wsypać 30 g żelu i dodając powoli 60 ml wody dokładnie rozetrzeć. Natychmiast przelać zawiesinę do aplikatora i pokryć płytki tak, aby ta czynność nie trwała dłużej niż 2 minuty. Taka ilość zawiesiny wystarcza na pokrycie pięciu płytek 20×20 cm warstwą o grubości 0,4 mm. Płytki pozostawić przez 30 minut do przeschnięcia w temperaturze pokojowej. Potem umieścić płytki w suszarce, włączając ją aby stopniowo ogrzewała się do temp. 100°C i trzymać w tej temperaturze przez godzinę. Po upływie godziny wyłączyć suszarkę i pozostawić płytki do ostygnięcia. Przechowywać płytki w eksykatorze nad środkiem suszącym. Prawidłowo przechowywane płytki nie tracą wartości do czterech tygodni.

B. Sporządzenie wzorców

Za wzorec służyć może stabilizowana śruta arachidowa o dokładnie oznaczonej zawartości aflatoksyne (np. śruta wzorcowa Rossetti zawierająca 8 ppm aflatoksyne B₁). Ze śrutą wzorcową postępuje się według opisu w p. I CD.

W przypadku posiadania aflatoksyne krystalicznej B₁, należy ją rozpuścić w chloroformie (lub benzenie) sporządzając roztwór macierzysty o stężeniu 10 µg/ml. Następnie do pięciu kolbek miarowych (10 ml) dać kolejno 0,4 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml i 3,0 ml roztworu macierzystego i uzupełnić odpowiednio chloroformem (lub benzenem) do 10 ml. Roztwory te należy nanosić na płytki w ilości 10 µl (odpowiadają plamkom 1, 2, 3, 4, 5 wg tabeli 1), fluorescencję ich plamek można łatwo odróżnić a naniesione ilości aflatoksyne wynoszą w poszczególnych plamkach odpowiednio: 0,004 µg, 0,005 µg, 0,010 µg, 0,020 µg i 0,030 µg aflatoksyne B₁.

Wzorce chloroformowe należy przechowywać w lodówce w naczyniach bardzo szczelnie zamkniętych. Wzorce są trwałe przy właściwym przechowywaniu w ciemnym i chłodnym miejscu. Wzorce benzenowe są mniej lotne i przez to jest większa pewność, że ich objętość nie zmienia się.

C. Ekstrakcja aflatoksyne ze śruty

Przygotować oddzielnie: 25 g śruty (dokładnie rozdrobionej), 25 ml wody i 50 ml chloroformu. Wsypać odważkę śruty do słoika, zalać wodą i wymieszać bardzo dokładnie łyżką tak, aby cała zawartość była równomiernie zwilżona. Wlać chloroform, szczelnie zamknąć słoik, w pozycji poziomej wstawić do wstrząsarki i ekstrahować przez 30 minut. Przygotować sączek z bibuły filtracyjnej, wsypać na sączek łyżeczkę bezwodnego siarczanu sodowego i przesączyć przez to wyciśnięty łyżką ekstrakt śruty (przesącz powinien być klarowny); 1 ml takiego ekstraktu odpowiada 0,5 g śruty.

D. Oznaczanie zawartości aflatoksyne

W zależności od stężenia aflatoksyne w śrucie, ekstrakt należy rozcieńczyć, zagęścić lub posługiwać się ekstraktem wyjściowym kierując się zasadą po-

*) Z dodatkiem gipsu.

Tab. 1. Szacowanie skażenia aflatoksyną B₁ śruty arachidowej lub mieszanki paszowej (ekstrakt 25 g/50 ml) przy nakładaniu 10 μl ekstraktu na płytkę. Śruta wzorcowa Rossetti zawierająca 8 ppm aflatoksyny B₁; lampka analityczna UV, Famed

Śruta	Numer plamki				
	1	2	3	4	5*
Wzorcowa (Rossetti) objętość wyjściowa (ml), którą trzeba rozcieńczyć do obj. 8,0 ml otrzymane rozcieńczenie (X)	0,8	1,0	2,0	4,0	6,0
	10	8	4	2	1,33
Badana: zawartość aflatoks. B ₁ w ekstrakcie niezagęsz- czonym (ppm)	0,8	1,0	2,0	4,0	6,0
Badana: zawartość aflatoks. B ₁ w ekstrakcie zagęszczo- nym 10-krotnie (ppm)	0,08**	0,1	0,2	0,4	0,6

* Jeżeli ekstrakt nierozcieńczony ze śruty badanej daje intensywniejszą fluorescencję niż plamka nr 5, należy rozcieńczyć go, porównać ze standardami i wykonać odpowiednie przeliczenie.

** Jeżeli wymagana jest większa dokładność oznaczenia niż 0,03 ppm, ekstrakt należy zagęścić 100-krotnie, aby dojść do granicznej czułości 0,003 ppm.

daną w tabeli 1. W tabeli tej opracowanej dla wzorcowej śruty Rossetti podany jest również sposób rozcieńczania ekstraktu ze śruty. Oprócz ekstraktów ze śruty badanej, należy w taki sam sposób przygotować ekstrakt ze śruty wzorcowej.

Na uprzednio przygotowaną płytkę z żelem krzemionkowym nanieść w odstępach 1–2 cm po 10 μl pięć roztworów standardowych i ekstraktów badane. W przypadku posiadania mikropipet o różnej pojemności można użyć standardu o tym samym stężeniu stosując różne jego objętości (np. 1, 3, 5, 10 μl). Plamki nanosić w odległości 1,5–2 cm od bocznej i dolnej krawędzi płytki. Przy nakładaniu plamek na płytkę należy uważać aby mikropipetą nie uszkodzić warstwy żelu i suszyć plamkę w trakcie namieszania małym strumieniem azotu z butli. Nakładane na płytkę chloroformowe ekstrakty aflatoksyny nie powinny zawierać metanolu, bo w takim przypadku aflatoksyna rozmieszcza się na powierzchni całej plamki. Aby uniknąć błędów przy nakładaniu plamek należy u góry płytki zaznaczyć jaki ekstrakt odpowiada danej plamce.

Należy wcześniej przygotować komorę chromatograficzną, do której trzeba wlać na wysokość 1 cm fazę ruchomą: 3% metanol w chloroformie. Dla równomiernego i szybkiego wysycenia komory umieścić pod kątem prostym arkusz bibuły, przykryć komorę pokrywą, wstrząsnąć kilkakrotnie i pozostawić na 30 minut. Potem wstawić płytkę z żelem dla rozwinięcia chromatogramu. Rozwijać w ciemnym pomieszczeniu na wysokość 10 cm od linii startu (około 20 minut). Natychmiast po wyjęciu płytki zaznaczyć czoło fazy ruchomej. Płytkę wysuszyć na powietrzu (5 minut) i oglądać chromatogram pod lampą UV w ciemni, zawsze w tej samej odległości od źródła promieniowania. Identyfikować aflatoksynę z ekstraktów badanych za pomocą R_f i barwy fluorescencji w porównaniu z plamkami standardu. R_f dla aflatoksyny B₁ fluoryzującej niebiesko w świetle UV wynosi około 0,5 i może się nieco różnić w zależności od warunków rozwijania chromatogramu. Aflatoksyna G₁ fluoryzuje zielono i jej R_f wynosi około 0,37. W przypadku kiedy nie nastąpiło dobre oddzielenie się plamek aflatoksyny B₁ od G₁ można umieścić ponownie w komorze i rozwijać chromatogram jeszcze raz jak wyżej. Porównać intensywność fluorescencji plamek aflatoksyny B₁ z ekstraktów badanych z plamkami standardowymi i oszaco-

wać poziom aflatoksyny w śrucie posługując się tabelą 1.

Można również określić poziom aflatoksyny B₁ w śrucie nie posługując się roztworem standardowym a stosując metodę kolejnych rozcieńczeń ekstraktu badanego. Ekstrakt śruty badanej rozcieńczyć kolejno dwukrotnie tak aby po naniesieniu roztworów na płytkę stwierdzić, które rozcieńczenie daje jeszcze widzialną plamkę.

Dla przykiadu podaje się, że w ciemni na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym G (Kieselgel G, Merck) o grubości warstwy 0,4 mm i aktywowanych w temp. 100°C przez 1 godz., można w promieniach analitycznej lampy kwarcowej (typ L 6/58 —prod. Famed 1, Łódź) zaobserwować jeszcze fluorescencję 0,001 μg aflatoksyny B₁. Znając graniczne rozcieńczenie ekstraktu badanego można wyliczyć poziom aflatoksyny B₁ w ekstrakcie wyjściowym i zawartość aflatoksyny w przeliczeniu na jednostkę ciężaru śruty badanej.

II. Oznaczanie aflatoksyny w orzechach arachidowych

Odczynniki:

1. Eter naftowy (frakcja o temp. wrzenia 40–60°C)
2. Gilzy ekstrakcyjne
- 3–7. Pozostałe pozycje jak w p. I.

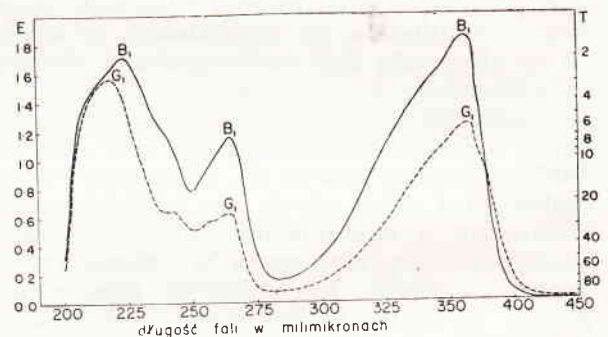
Aparatura i szkło laboratoryjne

1. Młynek laboratoryjny
2. Aparaty Soxleta pojem. 150 ml.
3. Łaźnia wodna
- 4–6. Pozostałe pozycje jak w p. I.

A. Ekstrakcja tłuszczów

Przygotować oddzielnie: 25 g zmieszanych orzeszków i 250 ml eteru naftowego.

Drobno zmielone orzeszki przynieść do gilzy ekstrakcyjnej i umieścić ją w ekstraktorze. Do kolby wlać eter naftowy, wrzucić parę porcelanek i ustawić aparat Soxleta na łaźni wodnej. Temperaturę łaźni uregulować tak aby częstotliwość syfonowania wynosiła 10 cykli na godz. Ekstrahować przez 6 godzin. Ekstrakt eterowy odrzucić, gilzę wraz z zawartością suszyć ponad 30 minut w temperaturze 65°C.



Rys. 1. Widmo absorpcyjne w nadfiolecie roztworów metanolowych aflatoksyn B₁ i G₁ (otrzymanych z hodowli płynnej *Aspergillus flavus*). Spektrofotometr Unicam SP 800, szczelina 0,02 mm, kiuwety 1,0 cm.

B. Ekstrahowanie aflatoksyny na gorąco

Wysuszoną gilzę z odtłuszczonymi orzeszkami umieścić ponownie w czystym aparacie Soxleta i ekstrahować aflatoksynę 200 ml chloroformu przez 6 godzin z szybkością 6 cykli na godzinę. Ekstrakt chloroformowy odparować prawie do sucha na łaźni wodnej. W celu przyspieszenia odparowywania można na naczynie z ekstraktem skierować strumień azotu. Pozostałość rozpuszczać stopniowo w 5 ml chloroformu (zagęszczenie 10x). Po dokładnym wymieszaniu osuszyć ekstrakt przesączając go przez bezwodny siarczan sodu. Oznaczyć zawartość aflatoksyny jak w p. ID. Jeżeli ostateczny ekstrakt jest zbyt zanieczyszczony, lub wymaga dalszego zagęszczenia (np. 100x) należy przed nałożeniem go na płyt-

kę oczyścić na kolumnie jak w przypadku oznaczania w paszy.

III. Oznaczanie aflatoksyny w mieszankach paszowych

Odczynniki

1. Eter etylowy cz.d.a.

2. Żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej, 100 mesh

3—6. Pozostałe pozycje jak w p. I.

Aparatura i szkło laboratoryjne

1. Kolumny chromatograficzne szklane o średnicy 3 cm i długości 15 cm

2—5. Pozostałe pozycje jak w p. I.

A. Ekstrakcja aflatoksyny

Przygotować oddzielnie: 25 g mieszanki paszowej, 25 ml wody i 50 ml chloroformu. Ekstrakcję przeprowadzić jak w punkcie IC; 1 ml ekstraktu = 0,5 g mieszanki.

B. Oczyszczenie ekstraktu na kolumnie

Na dnie kolumny umieścić mały zwitek waty, wsypać bezw. Na_2SO_4 tyle, aby powstała warstwa grubości 2 cm, następnie dodać 10 g żelu krzemionkowego o średnicy 0,05—0,2 mm (około 100 mesh). Wyrównać warstwę postukując lekko w kolumnę. Żel krzemionkowy pokryć ponownie warstwą bezw. Na_2SO_4 (2 cm) i zakryć zawartość kolumny watą.

Na tak przygotowaną suchą kolumnę nałożyć 5 ml surowego ekstraktu z mieszanki paszowej. W górnej części wypełnienia kolumny tworzy się zielonobrunatny pierścień. Przemyc kolumnę 150 ml eteru etylowego, dolewając eter porcjami tak, aby zachować ciągłość przepływu. Obserwuje się wędrowanie warstwy zanieczyszczeń, a spływający eter ma ciemno-zielone zabarwienie. Frakcję eterową zbierać do kolby ssawkowej, a w końcowej fazie osuszyć kolumnę pod próżnią. Przesącz eterowy odrzucić. Dołączyć suchą kolbę ssawkową i eluować aflatoksyny z kolumny 150 ml 3% metanolu w chloroformie, zachowując ciągłość przepływu. Kiedy eluat przestanie samorzutnie wypływać z kolumny resztę fazy ruchomej odsączyć pod próżnią. Przesącz z kolumny powinien być klarowny. Jeżeli pomimo oczyszczenia ekstraktu surowego na kolumnie (przez wymywanie eterem etylowym) pozostają zanieczyszczenia, które utrudniają identyfikację aflatoksyny na płytce, należy ekstrakt oczyścić powtórnie na kolumnie używając do eluacji zanieczyszczeń n-heksanu lub eteru naftowego wolnego od związków aromatycznych.

C. Oznaczanie aflatoksyny w oczyszczonym ekstrakcie

Przesącz z kolumny odparować do sucha na łaźni wodnej. Suchą pozostałość rozpuścić w 5 ml chloroformu. Uzyskuje się w ten sposób wyjściowe stężenie aflatoksyny, jak w surowym ekstrakcie. Tak oczyszczony ekstrakt należy nakładać bezpośrednio na płytkę z żelem krzemionkowym i oszacować zawartość aflatoksyny jak w punkcie ID (patrz tabela 1). Dla porównania można nałożyć też plamkę z surowego ekstraktu, (II A), w którym stężenie aflatoksyny równa się stężeniu w ekstrakcie oczyszczonym. W przypadku niskiej zawartości aflatoksyny w mieszanke należy ekstrakcję przeprowadzić z większej odważki (np. 100 g mieszanki + 100 ml wody + 200 ml chloroformu). Zaleca się 50 ml surowego ekstraktu zagęścić 10-krotnie i następnie nanieść na kolumnę. Po oczyszczeniu i odparowaniu jak w p. IIIB i C rozpuścić pozostałość w 5 ml chloroformu i nakładać na płytkę. Uzyskuje się w ten sposób ekstrakt 10-krotnie zagęszczony. Jeżeli zagęszczenie 10-krotne okaże się niewystarczające, należy suchą pozostałość rozpuścić w 0,5 ml chloroformu. Wtedy czułość analizy obniży się do 0,008 ppm.

IV. Spektrofotometryczna metoda oznaczania aflatoksyn

Odczynniki — jak w p. I.

Aparatura i szkło laboratoryjne

1. Spektrofotometr

2. Lejki Schotta G 5

3—7. Pozostałe pozycje jak w p. I.

A. Ekstrakcja aflatoksyny

Ekstrakcję ze śruty lub orzeszków prowadzi się jak w p. IC i IIAB tak, aby 1 ml ekstraktu odpowiadał 0,5 g badanego materiału. W przypadku niższej zawartości aflatoksyny (poniżej 8 ppm), oszacowanej wstępnie na chromatogramie cienkowarstwowym, ekstrakt należy zagęścić i uwzględnić to w przeliczeniach.

B. Sporządzenie chromatogramu

Na płytkę o wymiarach 20 × 20 cm pokrytą warstwą żelu G o grubości 0,4 mm, nałożyć pasmo 2 ml ekstraktu (odpowiada 1 g badanej śruty) o długości około 15 cm, susząc strumieniem azotu. Umieścić płytkę w nasyconej komorze z fazą ruchomą — 3% metanolu w chloroformie. Rozwijać chromatogram w ciemni przez 30 minut, wyciągnąć płytkę z komory, pozostawić do przeschnięcia na 5—10 minut i rozwijać chromatogram po raz drugi przez 30 minut.

Płytkę umieścić pod lampą analityczną i w odległości 7—9 cm od linii startu obrysować igłą pasmo aflatoksyny B_1 o długości około 15 cm i szerokości 1,6—1,8 cm. Jeśli oznacza się również inne aflatoksyny, np. G_1 , należy zaznaczyć położenie ich pasma w promieniach lampy analitycznej. W przypadku ekstraktów ze śruty, w linii czoła występuje intensywna zielona fluorescencja tłuszczów, którą łatwo odróżnić od aflatoksyn.

C. Oznaczanie zawartości aflatoksyny

Obrysowane pasma zeszkobać dokładnie i przesypać żel z zaadsorbowaną aflatoksyną do lejka Schotta. Małymi porcjami metanolu z pipety przemyc żel na lejkę ze spiekanego szkła tak, aby wyekstrahować aflatoksynę zużywając łącznie 5 ml metanolu. Zbierać ekstrakt do kalibrowanej probówki umieszczonej w kolbie ssawkowej. Ostatnią porcję metanolu zebrać pod zmniejszonym ciśnieniem. Metanolem ekstrakt przenieść do kiuwety o grubości 1 cm i odczytywać ekstynkcję próby przy fali 363 i 420 m μ . Aparat wyzerować za pomocą redestylowanego metanolu.

D. Obliczenie zawartości aflatoksyn

$$\frac{D \times M \times 10^6}{E \times 200} = \text{stężenie aflatoksyny (ppm)}$$

D — poprawiona ekstynkcja dla 363 m μ ($D_{363} - D_{420}$)

M — ciężar cząsteczkowy aflatoksyny

E — molarny współczynnik absorpcji

Wartości E (dla roztworów metanолоwych) i M dla czterech aflatoksyn wynoszą (8):

Aflatoksyna	E	M
B_1	22 000	312
B_2	23 400	314
G_1	18 700	328
G_2	21 000	330

U w a g i o g ó l n e

1. Opisane metody są proste i dają wysoką powtarzalność wyników jeżeli stosuje się starannie przechowywane odczynniki wysokiej czystości, dobrze umyte szkło i zapewni się dokładność wykonania analizy.

2. Jeżeli po rozwinięciu chromatogramu istnieją trudności ze zidentyfikowaniem aflatoksyny B_1 można zastosować następujący test. Płytkę spryskać 5% roztworem kwasu siarkowego, wysuszyć i oglądać w świetle UV. Plamki aflatoksyny B_1 , które świeciły niebiesko przed spryskaniem, świecą zielono.

3. Poleca się następujący sposób mycia szkła laboratoryjnego. Szkło umyć najpierw dokładnie roztworem detergentu, zanurzyć na kilka godzin w alkalicznym roztworze (NaOH lub Na_2CO_3), spłukać dokładnie wodą i zanurzyć w kwasie siarkowym lub solnym, następnie 6-krotnie płukać wodą bieżącą i 3-krotnie wodą destylowaną.

4. Ze względu na wysoką toksyczność aflatoksyn i możliwość ich wchłaniania się różnymi drogami, należy zachować daleko idące środki ostrożności zarówno podczas wykonywania analizy jak i mycia szkła.

5. Sprzęt i naczynia dezynfekować należy 5—6% roztworem podchlorynu sodowego (NaOCl , Natrium hypochlorosum) pokrywając całą skażoną powierzchnię. Kontakt powierzchni z roztworem musi trwać przynajmniej 30 sekund; dla pewności sprawdzić lampą UV skuteczność odkażania. W przypadku związków, które nie mieszają się z wodą, poleca się najpierw odkażać podchlorynem, a następnie zakwasić 6 N kwasem solnym. Szkło laboratoryjne wystarcza umyć jak podano w p. 3 albo chromianką. Do dezynfekcji rąk można stosować również 5% roztwór podchlo-

rynu sodowego a dla osób wrażliwych na ten związek poleca się mieszaninę w równych ilościach 1% roztworu nadboranu sodowego (NaBO_2 , H_2O_2 , $3\text{H}_2\text{O}$; Natrium perboricum) i 1% roztworu wodorowęglanu sodowego (NaHCO_3 , Natrium hydrocarbonicum). Przy przypadkowym napiciu się roztworu aflatoksyny powyżej podaną mieszaninę można użyć do płukania jamy ustnej.

Piśmiennictwo

1. Broadbent J. H., Cornelius J. A., Shone G.: Analyst 88, 214, 1963.
2. Coomes T. J., Sanders J. C.: Analyst 88, 209, 1963.
3. Coomes T. J., Crowther P. C., Francis B. J., Stevens L.: Analyst 90, 492, 1965.
4. Daniel M. R.: Brit. J. Exp. Path. 46, 183, 1965.
5. Eppley R. M.: J.A.O.A.C. 49, 1218, 1966.
6. Halver J. E.: Aflatoxicosis and Rainbow Trout Hepatoma. str. 209. Mycotoxins in Foodstuffs ed. G. N. Wogan, MIT Press, Cambridge, Mass., 1964.
7. Lee W. V.: Analyst 90, 305, 1965.
8. Nibney J., Nesbitt B. F.: Analyst 90, 155, 1965.
9. Pons W. A., Cucullu A. F., Lee L. S., Robertson J. A., Franz A. O., Goldblatt L. A.: J.A.O.A.C. 49, 554, 1966.
10. Report of the Inter-Departmental Working Party on Groundnut Toxicity Research (Method 1), London, 1962.
11. Trager W. T., Stoloff L., Campbell A. D.: J.A.O.A.C. 47, 993, 1964.
12. Verrett M. J., Martiac J. P., McLaughlin J.: J.A.O.A.C. 47, 1003, 1964.
13. Wogan G. N.: Bact. Rev. 30, 460, 1965.

Adres autora: prof. dr Teodor Juszkiewicz, Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

NOTATY Z PRAKTYKI

JAN SZYMCZAK

Boniewo

OBSERWACJE WŁASNE NAD WYSTĘPOWANIEM ROZPOZNAWANIEM I LECZENIEM ŻÓLTACZKI POPORODOWEJ U KRÓW

W dniu 26.7.1966 r. zostałem wezwany do chorej krowy — własność pracownika C.N.O.S. — w miejscowości S. Ze względu na dużą ilość zgłoszeń w tym dniu, zgłoszenie załatwiono następnego dnia. Okazało się, że w dn. 26.7.66 r. wypadek ten załatwił lekarz z sąsiedniego rejonu — o czym mnie nie powiadomiono — stwierdzając pourazowe zapalenie czepca.

Właściciel zwierzęcia stwierdził, że krowa już jest chora od czterech dni. Początkowo wystąpił u niej obrzęk wymienia. Wezwany technik wet. zastosował maść penicylinową w tubach do strzyków oraz maść kamforową do rozcierań wymienia. Takie leczenie nie poprawiło stanu zdrowia krowy, a ponadto krowa straciła apetyt. Właściciel telefonicznie wezwał lekarza z sąsiedniego rejonu, który zbadał krowę, udzielił pomocy i zalecił obserwację. Obiecał przyjechać i przeprowadzić operację na obecność ciała obcego gdyby nie nastąpiła poprawa u krowy. Poprawy rzeczywiście nie było. Zbierając dalej wywiad dowiedziałem się, że krowa wycieliła się przed 18 dniami, poród był normalny, okres poporodowy bez powikłań (łożysko odeszło samo w kilka godzin po porodzie), apetyt zachowany, wydajność mleka dobra. W okresie choroby zauważono, że oddawany mocz miał barwę ciemno-brunatną. Stan zwierzęcia był od dłuższego czasu karmiona zielonym słonecznikiem

ciętym na sieczkę (tak samo zresztą jak pozostałe bydło w oborze).

Stan obecny: Krowa czarno-biała, 6 lat zbudowana dobrze, miernie odżywna, średnio utrzymana. Temp. wewnętrzna 38,8 stopni C, tętno 90 uderzeń na minutę, oddechy 32/min. Krowa smutna, nie reaguje na otoczenie, oddechy utrudnione, brak apetytu, brak żujki. przy nawracaniu wyraźnie chwiejna. Widoczne błony śluzowe zażółcone. Zażółceniem objęte są partie skóry na wymieniu i po przysródkowej stronie ud. Temperatura skóry nierównomiernie rozmieszczona, zwacz miernie wypełniony, dostępne badaniu węzły chłonne bez odchylenia od normy. Przy opukiwaniu pole stłumienia wątrobowego powiększone. Ruchy żwacza zwolnione i ledwo słyszalne. Próbnny upust krwi wykazał, że krew jest rozwodniona, nie krzepnie, a wylana na piasek wsiąka w niego bez reszty.

Rozpoznanie: krwimocz poporodowy. W leczeniu zastosowano: 1) Ferrodex 10 — (i.m.), 2) Calcium borogluconatum 1 but. (i.v.), 3) Calphosan 1 but. (i.v.), 4) Glucosum 20% — 500 — (i.v.), 5) Cardimid 10,— (i.m.). Ze względu na ciężki stan krowy w dniu 28.7.66 r. ponownie podano: 1) Ferrodex 10—2) Coff. n. benz. 20,— 3) Ceromangan 20,— 4) Calc. borogluconatum 1 but. Przy ponownym podawaniu leków krowa już była weselsza, zaczęła przeżuwać, mocz stał się jaśniejszy, zaczęła trochę jeść.

Jak wynikało z meldunków — w ciągu 7 dni krowa wróciła do zdrowia i dawała mleko w takiej ilości jak przed zachorowaniem.

W podobny sposób na przestrzeni od 1962 r. do 1968 r. leczyłem z pomyślnym skutkiem 7 sztuk krów. Osmą krowę — mimo leczenie — zmuszony byłem skierować do uboju z konieczności. Dwie następne ze względu na zbyt późne wezwanie — wystąpiło już zaleganie — bez leczenia skierowałem do uboju z konieczności. Wszystkie wypadki tego scho-