

3. Kondela K.: Weterinarstwi, 1966.
 4. Nenhaus W., Sir F.: Berl. Münch. Tierärztl. 1965.
 5. Patyk S.: Choroby inwazyjne zwierząt domowych, PWRiL, 1969.
 6. Ruosch W.: Schweiz. Arch. J. Tierheilk. 108, 125, 1966.
 7. Stefański W.: Parazytologia weterynaryjna, PWRiL, 1968.
 8. Stefański W., Zarnowski E., Sottys A.: Zarys parazytologicznych metod rozpoznawczych, PWRiL, 1946.
- Adres autora: lek. wet. Eligiusz Walkowiak, Białystok, ul. Pozioma 2, WIS przy Zakładach Mięsnych.

Вальковиак Э., Александровска И., Андрулевич Т., Ивановска Э., Кавелич М., Нетупский М., Смехович Я., Витык А., Зелиньски Э. — **Послеубойные померы, вызванные паразитами у крупного рогатого скота в Белостокском воеводстве.**

Исследовали 3 группы по 500 штук крупного рогатого скота: I — телата, II — молодеж, III — взрослый скот. В I группе чаще всего обнаруживали паразита *Dictyocaulus viviparus* (7,8%) в связи с чем подвергли конфискации 10 кг легких телят. Во II группе чаще всего находили паразита *Fasciola hepatica* (21,4%) но самые большие померы вызывал финноз. Общие померы в этой группе равнялись 12 472 зл. В III группе, взрослого скота, чаще всего появлялся паразит *Nematodirus* (20,6%), а самые большие померы были вызваны финнозом; померы в этой группе — 21 500 зл. Общие по-

слеубойные померы за 1 год в Белостокском Мясокомбинате по причине паразитов и вызванных ими изменений равнялись ок. 1 692 064 зл.

Walkowiak E., Aleksandrowska I., Andruliewicz T., Iwanowski E., Kawelicz M., Nietupski M., Smiechowicz J., Wityk A., Zieliński E. — **Post slaughter losses caused by parasites occurring in cattle in the Białystok voivodship.**

The examination has been carried out on three groups of cattle: I-calves, II-young cattle and III-adult cattle. The each group consisted of 500 animals originating from the Białystok voivodship. In the I group *Dictyocaulus viviparus* was one of the most prevalent parasites (7.8%). Consequently it was necessary to liquidate 10 kg of calf lungs. In the II group the liver fluke was the most often parasites observed (21.4%), but the heaviest losses were caused by cysticercosis. The general losses due to the above parasites in that group were 12 472 zł. In the adult cattle the most prevalent parasite was *Nematodirus* — 20.6%. All the same the greatest losses were caused by cysticercosis. The losses caused by the parasite reached 21 500 zł (III group). The post slaughter losses in cattle due to parasites were 1 692 064 zł per year in the Slaughter House in Białystok.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

ZBIGNIEW POMORSKI, JERZY TRUCHLIŃSKI

Oznaczanie histaminy w płynie żwacza przy użyciu elektroforezy wysokonapięciowej

Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Weterynarii
WSR w Lublinie

Kierownik: doc. dr E. PINKIEWICZ

Katedra Chemii Fizjologicznej Wydziału Weterynarii
WSR w Lublinie

Kierownik: doc. dr H. KRACZKOWSKI

Spśród licznych metod służących do oznaczania histaminy w płynach ustrojowych i tkankach tylko niektóre nadają się do oznaczania tego związku w płynie żwacza (12) a większość z nich stosuje się jedynie do oznaczeń jakościowych lub orientacyjnych ilościowych. Najczęściej stosowaną jest metoda biologiczna (1), oparta na zjawisku kurczenia się wyosobnionego wycinka jelita biodrowego świnki morskiej pod wpływem histaminy. Niedogodnością tej metody jest duży koszt, trudności techniczne w wykonaniu oraz fakt, że w przypadku małych stężeń histaminy w roztworze pewne substancje jak np. duże stężenie soli mogą hamować skurcze jelita. Metoda chromatograficznego rozdzielania histaminy (4) cechuje się dużą pracochłonnością — wymaga bowiem wielokrotnego rozwijania w rozpuszczalnikach.

Obecnie najczęściej stosowana bardzo czuła i specyficzna metoda fluorometrycznego oznaczania histaminy (6) wymaga zastosowania bardzo drogiego i trudno dostępnego na rynku krajowym fluorymetru. W dostępnym nam piśmiennictwie znaleźliśmy kilka prac (5, 7—12) dotyczących powstawania, przemian i oznacza-

nia histaminy w płynie żwacza, nie napotkaliśmy jednak takiej, w której oznaczania histaminy opierałoby się na elektroforetycznym jej wyosobnianiu.

Elektroforetyczny rozdział histaminy z mieszaniny aminokwasów przeprowadził Wroński (15). Badania swoje wykonał on wyłącznie na mieszaninie aminokwasów zawierającej dwuchlorowodorek histaminy z uwzględnieniem wpływu niektórych soli nieorganicznych na warunki elektroforetycznego rozdzielania.

Celem niniejszej pracy było zaadaptowanie metody do ekstrahowania histaminy z płynu żwacza, wybór odpowiedniego sposobu zagęszczania roztworu do nakraplania, dobór właściwego buforu i parametrów (napięcie, natężenie, temperatura, czas itp.) — czyli opracowanie odpowiednich warunków mających istotny wpływ na proces elektroforetycznego rozdzielania histaminy z płynu żwacza.

Oznaczenie zawartości histaminy przeprowadzono w roztworach wzorcowych o zawartości 1 µg w 1 µl i płynie żwacza zdrowej krowy stosując bufony o następującym składzie:

bufor o pH 5,7 — pirydyna, kw. octowy lodowaty, glicerol, woda, (100 : 10 : 10 : 880)

bufor o pH 5,2 — pirydyna, kw. octowy lodowaty, glicerol, woda, (25 : 15 : 10 : 950)

bufor o pH 1,9 — 2n kwas octowy, 0,6n kwas mrówkowy, (1 : 1)

bufor o pH 1,5 — kwas octowy lodowaty, kwas mrówkowy, woda, (200 : 60 : 740).

Elektroforezę wysokonapięciową (EWN) wykonano aparatem AEA produkcji Instytutu Technologii Mleczarstwa WSR w Olsztynie.

Materiał i metody

1. Ekstrakcja histaminy z płynu żwacza.

Treść żwacza pobierano sondą, sączono przez gazę i wirowano przez 5 min. przy 3000 obr./min. Wydzielenie histaminy przeprowadzano w taki sam sposób jak przy metodzie Shore (6) — 10 ml płynu żwacza wytrząsano z 1 ml 10 n HClO_4 przez 10 min., a następnie wirowano — 10 min przy 3000 obr./min. Supernatant zlewano do probówki w której znajdowało się 3 g NaCl i 1 ml 5 n NaOH, następnie dodawano 20 ml n-butanolu i wytrząsano przez 10 minut. Po odwirowaniu frakcję butanolową odciągano i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem w kolbce Cleysena (temp. 38–39°C). Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml wody redest. lub w 0,5 ml buforu.

2. Nanoszenie badanych roztworów i rozwijanie elektroforegramów.

Przygotowany roztwór nanoszono specjalnie dostosowanymi i wykalibrowanymi pipetkami, na wilgotny pasek bibuły Whatman Nr 3 o wymiarach 8×38 cm, w postaci cienkich kresek długości 1,5 cm. Linia startu znajdowała się na środku paska 1,5 cm od jego brzegu. Bibułę zwilżano odpowiednim buforem, a następnie stosując ustalony metodą prób stały nacisk, przepuszczano ją między dwoma walcami, co miało na celu utrzymanie równomiernej wilgotności.

Elektroforezę prowadzono stosując w zależności od użytego buforu odpowiednio ustalone parametry napięcia, czasu i temperatury. Przy dającym najlepsze wyniki buforze o pH 5,7 stosowano: napięcie 32V/cm długości, ok. 3 mA/cm szerokości, czas rozwijania 20 min. temp. od 11 do 12°C.

3. Suszenie elektroforegramów i wywoływanie (3, 13).

Rozwinięty elektroforegram umocowany był między dwiema szklanymi bagietkami w ten sposób by część paska na której znajdowała się histamina była na dole. Suszono strumieniem powietrza o temp. 35°–40°C aż do całkowitego odparowania buforu. Wywoływanie odbywało się przez zanurzenie paska w 0,5% acetonowym roztworze ninhydryny zawierającym 1% kwasu octowego a następnie przeciąganie go zgodnie z kierunkiem rozdziału histaminy. Po odparowaniu acetonu elektroforegram pozostawiono przez 30 min. w temp. 65°C. Uzyskiwano barwne plamy będące produktem reakcji ninhydryny z histaminą.

4. Oznaczanie jakościowe histaminy.

Identyfikację histaminy przeprowadzono następującymi metodami: I. tzw. „metoda świadka”: obok badanego roztworu nakraplano równolegle wzorcowy roztwór histaminy, lub dwuchlorowodorek histaminy (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) i po rozwinięciu elektroforegramu przeprowadzono identyfikację obu plam. II. Dodawaniem do badanego roztworu, histaminy wzorcowej i porównywaniu nasienia barwy frakcji histaminowej frakcją uzyskaną z tej samej ilości badanego roztworu nie zawierającego jednak dodatku histaminy wzorcowej. III. Użycie niżej podanych odczynników dających z histaminą reakcje barwne, lub powodujących jej świecenie w świetle UV 365 nm.

a) 0,5% acetonowy roztwór ninhydryny zawierający 1% kw. octowego.

b) 270 mg ninhydryny, 130 mg izatyny, 2 ml trójetanolaminy, ad 100 ml n-butanolu.

c) 0,2% roztwór ninhydryny w 95 ml metanolu + 5 ml 2-4-6 kollidyny.

d) 1,2 naftochinono 4-sulfonian sodowy.

e) Kwas sulfanilowy dwuazowany.

f) Odczynnik aldehydowy Erlicha.

5. Oznaczanie ilościowe histaminy.

Oznaczanie ilościowe wykonano wg zaadaptowanej metody ilościowego oznaczania aminokwasów podanej przez Zajcewą i wsp. (16). Polega ona na wycięciu barwnych plam i ich eluacji w 4 ml metanolu z azotanem miedzi (w 500 ml metanolu 0,2 ml nasyconego wodnego roztworu azotanu miedzi). Czas ekstrakowania 1,5–2 godz. Pomiaru były dokonywane przy użyciu spektrokolorymetru Spekol, przy długości fali 500 nm.

Stężenie histaminy wyliczono z krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla wodnego roztworu histaminy (stęż. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) od 1–10 μg . W celu sprawdzenia metody wykonano 10 oznaczeń zawartości histaminy w roztworze wzorcowym zawierającym 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, oraz wykonując 10 oznaczeń w płynie żwacza klinicznie zdrowej krowy.

Wyniki

Otrzymane wyniki zbliżone były do wyników otrzymanych przez innych autorów (5, 7–12) stosujących różne techniki ilościowego oznaczania histaminy w płynie żwacza. Dokładność otrzymanych wyników sprawdzono obliczając błąd max., odchylenie standardowe (δ), zmienność (V) oraz odzysk — które to wartości zestawione zostały w tab. 1.

Tab. 1.

Materiał	Jednostka	Rozrzut		δ	V	Błąd max.	Odzysk
		min.	max.				
Roztwór wzorcowy histaminy	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	9,7	10,1	0,207	2,07%	3,0%	—
Płyn żwacza	$\mu\text{g}/\text{ml}$	3,7	4,1	0,147	3,8%	5,6%	89%

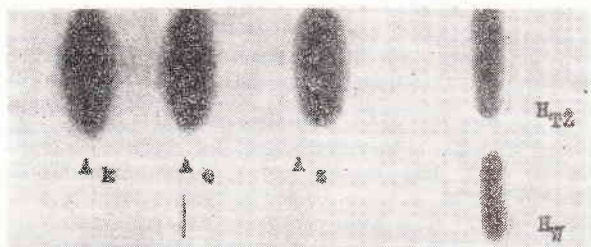
Omówienie

Przy przeprowadzaniu oznaczeń jakościowych i ilościowych histaminy w płynie żwacza, najlepsze wyniki otrzymano stosując bufor o pH 5,7, natomiast rozdziały w pozostałych buforach a zwłaszcza o pH 1,9 i 1,5 dały wyraźnie gorsze wyniki. Ponieważ brak było danych co do odczynnika z którym histamina dawałaby odpowiednio czułą reakcję barwną — potrzebną do ilościowego jej oznaczania, przeprowadzono próby z kilkoma odczynnikami służącymi do wykrywania amin (3) (podanymi w części doświadczalnej).

Nie stwierdzono jednak aby którykolwiek z nich był bardziej czuły w reakcji barwnej z histaminą niż ninhydryna. Badany płyn użyty po zagęszczeniu do nakraplania musi zawierać histaminę w stężeniu powyżej 1 μg w 10 μl roztworu. Ilość ta podyktowana jest czułością reakcji histaminy z ninhydryną, która to wg Wróńskiego (15) wynosi 0,1 $\mu\text{g}/10 \text{ mm}^2$. Osiągnięcie odpowiedniego stężenia histaminy w badanym płynie pociąga za sobą konieczność kilkunastokrotnego zagęszczania go. Dlatego też przy roztworach zawierających stosunkowo duże ilości jak np. płyn żwacza wystarczające jest 20-krotne zagęszczenie (w kolbce Clayse-

na), natomiast przy zagęszczaniu surowicy, lub krwi zawierającej bardzo małe jej ilości należałoby zastosować specjalną aparaturę jak np. zestaw Kundera-Danisch (14) dający możliwość wielokrotnego zagęszczania. Szybkość zagęszczania uzależniona jest od temperatury z tym, że w środowisku kwaśnym zapewniającym dużą trwałość histaminy może być użyta temp. 70°C (3), podczas gdy w środowisku obojętnym stosuje się temp. poniżej 40°C. Wykładnik jonowodorowy pH wywiera istotny wpływ na elektroforetyczny rozdział badanych substancji. Lepsze wyniki osiągnęto przy rozdziale z roztworów obojętnych niż kwaśnych. Temperatura rozdziału w naszym przypadku wyniosła 11°–12°C. Ponieważ rozdział aminokwasów nie był celem naszej pracy, czas analizy skrócono do 20 min., po którym to okresie histamina wyraźnie oddzieliła się, podczas gdy aminokwasy dopiero zaczęły się rozdzielać (widoczne dwie lub trzy frakcje ryc. 1).

Ryc. 1. Elektroforegram z rozdziału płynu żwacza



1. Ak — aminokwasy kwaśne, 3. Az — aminokwasy zasadowe, 5. H_w — histamina wzorcowa, 2. Ao — aminokwasy obojętne, 4. H_{T2} — histamina z treści żwacza

Przy wywoływaniu elektroforegramu stosowano ogrzewanie w temp. 65°C przez 30 min., lub wzorując się na badaniach Blauth-Opieńskiej i wsp. (2) (dotyczących wywoływania chromatogramów barwionych ninhydriną) pozostawiono je w ciemności na 12 godz. co było okresem czasu w pełni wystarczającym dla wystąpienia barwnych plam. Bufory sporządzone z dodatkiem glicerolu dawały większą zawartość frakcji histaminowej. Przy identyfikacji „met. świadka” zauważono, że histamina czysta użyta jako kontrola ułokowała się równolegle z plamą wydobywaną z badanego płynu, natomiast dwuchlorowodorek histaminy przesuwał się wolniej.

Wnioski

1. Opisana metoda może być stosowana do jakościowego i ilościowego oznaczania histaminy w płynie żwacza. Zaletami jej są: duża specyficzność rozdziału w polu elektroforetycznym, dokładność a jednocześnie łatwość wykonania.

2. Ujemną stroną metody jest konieczność wielokrotnego zagęszczania płynu w przypadkach małego stężenia histaminy co wymaga odpowiedniej aparatury i przedłuża czas analizy.

Piśmiennictwo

1. Barsoum G. S., Gaddum J. H.: J. Physiol. 1, 85, 1935.
2. Blaut-Opieńska J., Kowalska H., Pietrusiewicz M.: Acta Phys. Pol. 3, 492, 1959.
3. Clotten R., Clotten A.: Hohspannungselektrophorese. Georg Thieme Verlag. Stuttgart 1962.
4. Hinshaw L. B., Vick A. J., Carlson C. H., You-Ling Fan.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 379, 1960.
5. Sanford J.: Nature 199, 829, 1963.
6. Shore P. A., Burkhalter A., Cohn V. H.: J. of Pharm. 3, 127, 1959.
7. Sjøstad V., Stormorken H.: Nature 197, 907, 1963.
8. Sjøstad V.: Acta Physiol. Scand. 6, 71, 1967.
9. Sjøstad V.: Acta Vet. Scand. 8, 50, 1967.
10. Sjøstad V.: Acta Vet. Scand. 8, 157, 1967.
11. Sjøstad V.: Acta Vet. Scand. 8, 176, 1967.
12. Sjøstad V.: Acta Vet. Scand. 8, 136, 1967.
13. Stahl E.: Dünnschicht-chromatographie laboratoriums — handbuch. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York 1967.
14. Stec J.: Medycyna Wet. 25, 632, 1969.
15. Wroński A.: Chemia Anal. 11, 957, 1966.
16. Zajcewa G. N., Tiuleniewa N. P.: Laborat. Dielo 3, 24, 1958.

Adres autora: lek. wet. Zbigniew Pomorski, Lublin Al. PKWN 30b, Katedra Chorób Wewnętrznych WSR.

Поморски З., Трухлинский Е. — Определение гистамина в жидкости рубца при помощи высоковольтного электрофореза.

Гистамин из жидкости клинически здоровой коровы экстрагировали по приспособленному к этой задаче методу Shore. Исследованную жидкость концентрировали при помощи выпаривания в колбе Cleyden'a в 38—39°C. Электрофоретическое распределение проводили в аппарате АЕА отечественной продукции на фильтровальной бумаге Whatman 3 применяя пиридиновую буферную жидкость pH=5,7. Электроforeграммы окрашивали 0,5% нингидрином в ацетоне с 1% уксусной кислоты. Цветные фракции элюировали метанолом с добавкой водного раствора азотнокислой меди и определяли при помощи спектроколориметра „Spekol”. Концентрацию гистамина высчитывали из кривой полученной для водного раствора гистамина. Верность измерений проверяли методом регенерации а также высчитыванием максимальной ошибки (5,6%), стандартного отклонения (0,147) и изменчивости (3,8%).

Pomorski Z., Truchliński J. — The determination of histamine in the liquid content of rumen by means of high voltage electrophoresis.

The qualitative and quantitative determination of histamine in the liquid content of rumen of a clinical healthy cow has been done by means of high voltage electrophoresis. Histamine was extracted from the liquid content of rumen acc. to the modified method of Shore. The examined solution was concentrated in Cleyden's flask under lowered pressure (38—39°C). The electrophoretic separation was carried out on Whatman's paper No 3 in pyridine buffer at pH 5.7 by the use of AEA apparatus, Polish production. The electropherograms were stained with 0.5% ninhydrine solution in acetone with 1.0% of acetic acid. The stained fractions were eluted with methanol with water solution of copper nitrate, and determined spectrophotometrically on „Specol”. The concentration of histamine was calculated from a calibrated curve prepared for water solution of histamine. The accuracy of the results was checked on the strength of recovery test (89%), maximal error (5.6%), standard deviation (0.147) and lability (3.8%).