

49. Schweinberg F. B., Sylvester E. M.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 527, 1953.
50. Shigemori O.: Jap. J. vet. Res. 14, 131, 1966.
51. Skjelkvale R., Uemura T.: J. appl. Bact. 42, 355, 1977.
52. Skjelkvale R., Uemura T.: J. appl. Bact. 43, 281, 1977.
53. Smith L. D.S.: The Growth of Clostridium perfringens in Food, str. 68. Int. Symp. on the Microbiology of Semipreserved meat, Prague 1970.
54. Smith L. D.S.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Ed. Ch. C. Thomas, USA 1975.
55. Smith L. D.S., Holdeman L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria, Ch. C. Thomas, USA 1968.
56. Stark R. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 4, 89, 1971.
57. Stark R. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 6, 662, 1972.
58. Sugitani A., Takamatsu S.: Jap. Publ. Hlth. J. 8, 661, 1961.
59. Sutton R. G. A.: J. Hyg., Camb. 64, 65, 1965.
60. Sutton R. G. A., Hobbs B. C.: J. Hyg., Camb. 66, 135, 1968.
61. Taylor C. E. D., Coetzee E. F. C.: Mon. Bull. Minist. Hlth. 25, 142, 1966.
62. Testas P., Wyplosz J., Vivier J., Chanzy M.: Nouv. Presse Med. 1, 2087, 1972.
63. Tsai C., Torres — Anjel M. J., Riemann H. P.: J. Formosan med. Ass. 73, 501, 1974.
64. Uemura T.: J. appl. Bact. 44, 411, 1978.
65. Uemura T., Genigeorgis C., Riemann H. P., Franti C. E.: Infect Immun. 9, 470, 1974.
66. Uemura T., Sakaguchi G., Riemann P.: Appl. Microbiol. 26, 381, 1973.
67. Uemura T., Skjelkvale R.: Acta path. microbiol. scand. 84, 414, 1976.
68. Willis A. T.: Clostridia of Wound Infection, Butterworth and Company, London 1969.
69. Yasukawa A., Okada Y., Kitashe T., Miyamoto S.: J. Fed Hyg. Soc. Jap. 18, 313, 1975.
70. Zeissler J.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I 154, 200, 1949.
71. Zeissler J., Rassfeld — Sternberg L.: Br. med. J. 12, 267, 1949.

Adres autorów: ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

ZOFIA PORADZISZ, JANINA SAWICKA

Przydatność metody toluidynowej do oznaczania zawartości laktozy w mleku krów

Z Zespołu Przetwórstwa i Oceny Surowców Zwierzęcych Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej AR w Krakowie

Oznaczanie zawartości laktozy w mleku krów jest często wykonywane w laboratoriach przemysłu mleczarskiego oraz spożywczego, a ostatnio znalazło również zastosowanie w diagnostyce stanów zapalnych wymienia. Poziom laktozy w mleku jest zdaniem Rennera (7) miernikiem stanu zdrowotnego wymienia i można go stosować jako test diagnostyczny.

Stosowana dotychczas do oznaczania zawartości laktozy w mleku redukccyjna metoda Bertranda (6) jest bardzo czasochłonna i dość kosztowna ze względu na duże zużycie odczynników. Analizatory automatyczne typu IRMA, Mini-IRMA lub Milko-Scan z powodu wysokiej ceny nie są jeszcze w naszych laboratoriach powszechnie dostępne. W związku z tym istnieje potrzeba wprowadzenia szybkiej, dostatecznie dokładnej i taniej metody oznaczania zawartości laktozy w mleku krowim.

Warunki te spełniają metody fotometryczne. Są one oparte o pomiary ekstynkcji barwnego produktu kondensacji glukozy z o-toluidyną w środowisku kwasu octowego lodowatego. Reakcję kondensacji z pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi, z których najodpowiedniejszą okazała się o-toluidyna, wykorzystali do oznaczania zawartości glukozy w płynach ustrojowych Ek i Hultman (2) oraz Hultman (3). Metodę tę stosuje się do dziś w laboratoriach klinicznych (1, 4, 5).

Steiger i Schulze (8) przystosowali tę metodę do oznaczania laktozy w małych próbkach mleka np. u loch i drobnych zwierząt laboratoryjnych, po zhydrolizowaniu laktozy do glukozy.

Praca niniejsza miała na celu zbadanie możliwości zastosowania metody toluidynowej do seryjnych oznaczeń zawartości laktozy w mleku krów oraz sprawdzenia jej dokładności i powtarzalności.

Materiał i metody

W 170 próbkach pełnego mleka krowiego oznaczono zawartość laktozy równolegle metodą redukccyjną Bertranda i metodą toluidynową. W 85 próbkach (wariant A) stosowano metodę toluidynową według Steigera i Schulze (8), a w pozostałych 85 (wariant B) zwiększono 5-krotnie ilość mleka oraz wszystkich stosowanych odczynników. W wariacie B chodziło o zwiększenie dokładności oznaczania laktozy. Większa ilość mleka powinna dać zmniejszenie się błędów pomiaru oraz czasu wykonania oznaczenia, gdyż łatwiej jest odmierzyć większą próbkę do analizy. Przy badaniu mleka krów zwiększenie próbki nie odgrywa większej roli. W opisie metody podano w nawiasach zmodyfikowane ilości mleka i odczynników w metodzie określonej jako wariant B.

Do próbek wirówkowych zawierających po 1,0 ml (lub 5,0 ml) 3% w/v *) kwasu trójchlorooctowego odmierzano mikropipetą po 0,02 ml (lub 0,1 ml) mleka i po wymieszaniu odwirowywano strącone białko. Do oznaczenia zawartości laktozy używano 0,5 ml klarownego płynu znad osadu. Do ślepej próby użyto 1,0 ml (lub 5,0 ml) kwasu trójchlorooctowego i 0,02 ml (lub 0,1 ml) wody destylowanej, a do kontrolnej 1,0 ml (lub 5,0 ml) kwasu trójchlorooctowego i 0,02 (lub 0,1 ml) 5% roztworu chemicznie czystej laktozy, wysuszonej w temperaturze +105°C, w 0,2% wodnym roztworze kwasu benzooesowego.

Dalszy tok postępowania jest dla obu wariantów jednakowy: do wysokich próbek laboratoryjnych pojemności 15 — 20 ml odmierzano po 3,5 ml odczynnika toluidynowego i po 0,5 ml klarownego płynu znad osadu po odwirowaniu z kwasem trójchlorooctowym.

Odczynnik toluidynowy sporządzano w następujący sposób: w 940 ml kwasu octowego lodowatego rozpuszczono 1,5 g tiomocznika i dodano 60 ml o-toluidyny. Wszystkie stosowane odczynniki muszą być cz. d. a., szczególną uwagę należy zwrócić na czystość i świeżość o-toluidyny.

Po wymieszaniu obu składników wstawiono próbki do łaźni wodnej o temperaturze wrzenia, w której pozostawiono je przez 10 min. Następnie schładzano próbki w wodzie z lodem, przenoszone do statywów i po upływie 20 min. oznaczano ekstynk-

*) 3 g kwasu trójchlorooctowego w 10 ml roztworu.

cję przy pomocy spektrofotometru Spekol bez przystawki, przy długości fali 635 mμ w kiuwecie o grubości 1 cm.

Procentową zawartość laktozy w mleku obliczono w/g wzoru:

$$\% \text{ laktozy} = \frac{\text{Ex próbki badanej} \times 5}{\text{Ex próbki wzorcowej}}$$

Powtarzalność metody sprawdzano wykonując po 20 równoległych oznaczeń dla trzech próbek mleka. Dla uzyskanych wyników obliczono średnie, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności.

Dla obu wariantów doświadczenia obliczono współczynnik korelacji pomiędzy zawartością laktozy oznaczoną metodą Bertranda i toluidynową.

Wyniki

Średnia zawartość laktozy w 170 próbkach mleka oznaczona metodą Bertranda wynosiła 4,68%, a metodą toluidynową 4,60%. Metoda Bertranda dała wyniki wyższe o 0,08%.

Tab. 1. Wyniki oznaczeń trzech próbek mleka (n=20)

Nr próby	\bar{x}	$\pm s$	v
1	5,09%	$\pm 0,07$	1,38%
2	4,68%	$\pm 0,05$	1,11%
3	4,53%	$\pm 0,08$	1,79%

Objaśnienia: \bar{x} = średnia, $\pm s$ = odchylenie standardowe, v = współczynnik zmienności.

Współczynnik korelacji pomiędzy oznaczeniami zawartości laktozy uzyskanymi metodą Bertranda i metodą toluidynową wynosi dla wariantu A $r = +0,874 \pm 0,014$, a dla wariantu B $r = +0,930 \pm 0,015$. Przez pięciokrotne zwiększenie próbki mleka uzyskano więc zwiększenie wartości współczynnika korelacji o 0,056.

Wysoka wartość współczynnika korelacji pozwala na stwierdzenie, że metodę toluidynową można z powodzeniem zastosować w praktyce laboratoryjnej zamiast pracochłonnej metody redukcyjnej Bertranda. Jest ona znacznie tańsza, ponieważ zużycie odczynników, które są dostępne w kraju, jest niewielkie. Należy jednak zwracać uwagę na czystość odczynników i świeżość roztworów. Rozpoczynając badania metodą toluidynową należy ją sprawdzić metodą redukcyjną Bertranda oraz kontrolować nią każdorazowo przygotowywany wzorcowy roztwór laktozy.

Wnioski

1. Wysoka współzależność wyników uzyskanych metodą toluidynową oraz metodą Bertranda wskazuje na pełną przydatność metody toluidynowej do seryjnych oznaczeń zawartości laktozy w mleku krowim.

2. Niska wartość współczynnika zmienności wskazuje na dużą dokładność i powtarzalność metody toluidynowej.

3. Zwiększenie analizowanych próbek mleka do 0,1 ml zwiększa dokładność i szybkość oznaczeń.

Piśmiennictwo

1. Dubowski K. M.: Clin. Chem. 8, 215, 1962.
2. Ek J., Hultman E.: Nature 181, 780, 1958.
3. Hultman E.: Nature 183, 108, 1959.
4. Hyvärinen A., Nikkila B. A.: Clin. Chim. Acta 7, 140, 1962.
5. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice. PZWL 1963.
6. PN-37-A/66107. Mleko. Oznaczanie zawartości laktozy.
7. Renner E.: Arch. Lebensmittelhyg. 26, 163, 1975.
8. Steiger M., Schulze J.: Arch. Tierernhrung 20, 297, 1970.

Adres autora: mgr Zofia Poradzisz, ul. Koniewa 57 m. 54, 30-147 Kraków.

Порадзиш З., Савицкая Я. — Пригодность толuidинового метода для определения содержания лактозы в коровьем молоке.

Провели исследования по применению толuidинового метода определения глюкозы в органических жидкостях для определения содержания гидролизованной лактозы в коровьем молоке. Сравнивали процентное содержание лактозы в 170 пробах молока, определенное восстановительным методом Бертана и толuidиновым методом, и подсчитали коэффициент корреляции между величинами, полученными обоими методами. Для определения влияния величины пробы на точность результатов определили содержание лактозы толuidиновым методом в двух вариантах (по 85 проб в каждом), подвергая анализу по 0,02 и 0,1 мл молока. Рост величины пробы увеличил точность определений, выражающуюся в росте коэффициента корреляции с $0,874 \pm 0,014$ до $0,930 \pm 0,015$. Низкое значение коэффициента изменчивости указывает на большую точность и повторяемость толuidинового метода.

Poradzisz Z., Sawicka J. — The usefulness of toluidine method for determining lactose content in cow milk.

The examinations were performed to use toluidine method applied for determining of glucose in tissue fluids for lactose content estimation in milk. The per cent content of lactose in 170 samples of milk was established by means of Bertrand's and toluidine methods. The content of lactose was calculated on the basis of two kinds of samples, i.e. 0.02 and 0.1 ml in 85 milk specimens. The increased size of samples resulted in higher accuracy: correlation index was changed from $0,874 \pm 0,14$ to $0,930 \pm 0,015$. The data obtained point to high accuracy and repeatability of the toluidine method.

WILLIAMS J. M., SMITH G. L., MURDOCK F. M.: Immunogenność bakteryny *Haemophilus somnus* u bydła. (Immunogenicity of *Haemophilus somnus* bacterin in cattle). Amer. J. vet. Res. 39, 1756—1762, 1973 (11).

Haemophilus somnus wywołuje u bydła meningoencephalitis lub posocznice. Właściwości immunogenne szczepionki opartej o *H. somnus* przebadano na cielętach szczepionych domięśniowo, jednorazowo lub dwukrotnie w odstępie 14 dni. Szczepione sztuki zakażono dożylnie zjadliwym szczepem po 22, 30 lub 95 dniach lub do cisterna cerebellomedullaris po 14, 32, 94 lub 111 dniach po szczepieniu. Wszystkie cielęta szczepione były odporne na zakażenie dożylnie między 22 i 95 dniem po szczepieniu. U 88% cieląt szczepionych dwukrotnie i zakażonych do cisterna cerebellomedullaris, między 14—111 dniem po szczepieniu występowała solidna odporność. W ocenie odporności poszczepiennej bardzo przydatny okazał się odczyn precipitacji dyfuzyjnej w żelu z rozpuszczalnym antygenem *H. somnus*. Wszystkie cielęta, których surowice w tym odczynie wytwarzały dwa prządku precipitacyjne były odporne.

G.