

혈청내 유리지방산의 비색정량법

김성훈·박항균·모기철·허린수
(경북대학교 농과대학)

I. 서론

유리지방산의 정량방법으로는 적정방법과 비색방법이 있는데 Davis⁴⁾, Dole^{5,6)}, Gorden 및 Cherkes⁹⁾, Goss 및 Lein⁸⁾은 적정방법으로 지방산을 정량하였다. 이들중 Dole^{5,6)}은 2-Phase Solvent mixture로써 지방산을 추출한 다음 alkali로 적정하였고 Goss 및 Lein⁸⁾은 Dole의 방법을 수정강화 하였다. 이방법은 정확성이 크고 쉽게 처리할수 있지만 0.001 ml 까지 정확히 읽을수 있는 특수제작한 microburette가 필요한데 이는 외국제품뿐으로 매우 섬세하여 파괴되기 쉬우므로 수입이 곤란하여 국내에서는 구입이 불가능한 상태이다. 한편, 비색방법에서 Ayers²⁾는 지질용매로써 지질을 추출하여 chloroform에 이행시켜 Copper nitrate를 처리하여 지방산의 구리염을 형성시켜 발색된 청색을 비색정량하였고 Calson 및 Wadström³⁾은 chloroform-methanol로써 지질을 추출하고 chloroform phase를 silic acid column에 통과시켜 지질중에 인지질을 분리 제거시킨 다음 다시 ion exchange column에 통과시켜 유리지방산을 분리하여 methyl ester화시키고 hydroxamic acid method로써 비색정량하였다. 嵒山¹⁾은 Ayers의 방법을 발전시켰고

Hlynczak⁷⁾는 지질을 chloroform으로 추출하여 Silic acid Column을 거쳐 인지질을 분리제거시켜서 지방산을 Dithizon으로 발색시켜 비색정하였다. 한편 Duncombe은 Cu가 Sodium-diethyldithiocarbamate와 반응하여 황갈색의 착염을 형성한다는 사실을 지방산의 정량에 발색제로 처음 도입했다.

김등¹⁵⁾은 Duncombe의 방법이 인지질에 의하여 많은 간섭을 받음을 발견하고 Zeolite를 써서 인지질을 제거하는 개정방법을 고안하였다. 위의 방법들은 시간의 낭비, 정확성, 조작의 복잡성 등으로 실제적용에 있어서 매우 불편하였다. 저자 등은 이들의 결점을 보완하여 비색계 또는 Spectrophotometer하나만 있으면 어느실험실에서나 또는 수의임상가들도 쉽게 정량할수 있는 종합된 정량방법을 고안하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

지질추출혼액 : Ether-ethanol (3:1) mixture
Solvent mixture : Isopropanol(40vol) + heptane (10Vol) + NH_4SO_4 (1 Vol)의 혼합용액
Toluene : 재증류 toluene
Heptane : 재증류 n-heptane

Copper reagent : 6.45g/dl농도의 Cupric nitrate (10Vol) triethanolamine의 1M 수용액 (9 Vol) 1M acetic acid용액 (1 Vol) 혼액.

발색시약 : 100mg의 Sodium - diethyldithiocarbamate를 n-Butanol에 녹여 총량이 100ml가 되게한다.

지방산 표준용액 : Stearic acid(일본시마규제품)의 28.45mg/dl에서 84.45mg/dl까지 각구분마다 4mg의 차이를 둔 15구분의 ether 용액.

2. 처리방법

처리방법은 4 단계로 완성되는바 첫째단계는 지방산 추출 과정이고 둘째단계는 인지질 제거 과정이고 셋째단계는 지방산에 구리염을 형성시키는 과정이며 넷째단계는 형성된 지방산의 구리염을 발색시켜 농도를 측정하는 단계이다. 혈청내의 지방산 추출은 Dole^{5,6)}의 방법에 의하여 Solvent mixture로써 지방산을 추출분리했다. 지방산과 함께 추출되어 나온 소량의 인지질 제거는 허등^{13,14)}의 방법에 따라서 냉각 Acetone 으로 철저히 제거하였다. 이 인지질은 분자내의 인산잔기에 구리염이 형성되어 지방산의 발색에 방해가 되므로 철저히 제거되어야 한다.

표준곡선 작성 : Stearic acid의 4mg 차이를 둔 28.45~84.45mg/dl까지 15구분으로된 표준용액을 써서 다음의 시료 처리방법과 동일한 방법으로 처리하여 표준곡선을 작성하고 각시료의 처리결과를 이 표준곡선에 대조하여 함량값을 환산하였다. Blank(맹검)는 toluene 3ml에 발색시약 0.2ml를 첨가 혼합하여 사용하였다.

지방산 추출 : 혈청내의 지방산 추출은 상법에 따라서 신선한 혈청 1ml에 지질추출혼액 5ml를 첨가하여 Voltex mixer에서 1분간 세게 진탕하고 3,000rpm에서 3분간 원심분리 시켜서 다른 시험관에 상층액을 분리하고 증발 건조시킨다음 Dole의 방법^{5,6)}에 따라서 Solvent mixture 5ml를 첨가하고 3ml의 heptane과 2

ml의 증류수를 첨가하여 혼합한 다음 3,000rpm에서 3분간 원심분리하여 상층의 heptane 층을 분리하였다.

인지질 제거 : 지방산을 추출한 heptane 용액에는 지방산과 소량의 인지질이 포함되어 있으므로 지방산만을 남기고 인지질을 완전히 제거해야 한다. 위의 지방산의 heptane용액을 증발시키고(증발이 더디면 aceto 2ml를 첨가하여 진행시키면 증발이 촉진된다) 3ml의 냉각 acetone을 첨가하여 진탕한후 3,000rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액을 다른 시험관에 완전히 옮기면 관저와 관벽에 인지질이 달라붙어 제거된다.

구리염 형성 : 시험관의 Acetone을 가열하여 증발시키고 toluene 3ml를 가하여 흔들여 지방산을 녹인다. 이 지방산의 toluene용액에 2ml의 Copper reagent를 첨가하여 Voltex mixer에서 충분히 혼합하고 3,000rpm에서 3분간 원심분리시켜 상층의 toluene층을 분리하여 분석에 사용하였다.

발색 및 농도측정 : 지방산의 구리염이 함유되어 있는 상층의 toluene용액 3ml를 다른 시험관에 취하고 발색제 0.2ml를 첨가 혼합하여 발색한 황갈색을 HITACHI MODEL No. 200-20 double beam spectro-photometer 로 440nm에서 흡광도를 측정했다.

3. 혈액시료

본 실험에 사용한 혈청시료는 최근에 도입된 육우들의 혈청과 경북 도축장 및 도계장에서 채취한 혈청을 시료로 사용하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 회수실험

이실험은 이미 여러번 되풀이 분석하여 유리 지방산 농도가 잘알려진 혈청 시료 0.5ml에 지방산 Source로써 77.347mg/dl농도의 stearic

acid용액 0.5ml (0.387mg)를 첨가하여 최종용량을 1ml로 조정할것을 본 방법으로 정량할때에 어느정도의 지방산이 회수되는가를 시험한 것이다. 그 결과는 표 1에서 보는바와 같이 9개의 평균값이 102.64%로써 높은 회수율을 보이므로 정확성이 컸다.

2. 재생실험

같은 조건하에서 동일시료에 대한 분석치는 몇번을 되풀이 하여도 항상 같은 값이어야 하는바 이런 사실을 확인하는 실험이 재생성 실험으로써 본실험에서 사용한 혈청시료는 육우 수십마리의 혈청을 합동(pooling)으로 하여 12회 되풀이 분석하였다. 그결과는 표 2에서 보는바와 같이 평균유리 지방산 농도가 10.33mg/dl, 표준편차±0.464mg/dl에 4.492%의 변이율을 보였을 뿐이었다.

실제 분석실험 : 본 방법을 사용하여 금년에 외국으로 부터 수입된 육우의 혈청내 유리지방산 함량과 대구시내 도축장에서 채취한 한우의 혈청내 유리 지방산 함량 및 도계장에서 채취한 닭 혈청내 유리지방산의 함량을 분석한 결과는 각각 표 3, 4 및 5와 같이 10.04±0.435mg/dl, 20.01±1.028mg/dl 및 37.01±0.392mg/dl이었다. 수입육우의 혈청내 유리지방산 함량은 다른학자¹⁾가 보고한 7mg/dl (3~12mg/dl)에 잘 일치한다 하겠으나 도축우의 혈청내 유리지방산 함량은 매우 높은 편이며 한편 도계의 혈청내 유리지방산 함량은 37.01±0.392mg/dl로써 정상치인 6.85mg/dl^{11,15)}보다는 물론 훨씬 많으며 산란중인 암닭 혈청내 함량(24.3mg/dl)^{11,15)}보다도 많은 함량을 보였다. 이처럼 수입육우 혈청내의 유리지방산 함량이 정상치에 일치하는데도 불구하고 도살중에 있는 동물의 혈청내 함량치가 높은것은 도살중에 일어나는 여러가지 흥분과 최후 발작적인 심한 근육운동에 기인하는 epinephrine과다 분비가 지방조직에 대하여 작용한 결과 과량의 지방산이 동원 유리된 것으로 생각된다. 그러므로 본 방법에 의하여 유리지

방산을 분석할 경우 회수율(102.64%)과 재생성(변이계수=4.49%)이 모두 양호하며 특히 본 방법을 사용하여 실제로 정상육우에 대하여 그 혈청내의 유리지방산 함량을 분석한 결과가 다른 학자들이 보고한 정상치에 잘 일치하는 것으로 보아 신빙성이 있는 방법이라고 생각된다.

유리지방산의 정량분석에는 간편성과 정확성이 요구되는바 이런 점을 고려하여 보강한것이 본 방법이다. 다른 분석방법들은 순수한 지방산 추출을 위하여 거의다 Column chromatography를 도입하거나 또는 그 유사방법(Zeolite 추출)을 사용하여 복잡성과 시간낭비(12~24시간 소요)를 배제하지 못하였다. 본 방법의 특징은 이런 단점을 간편하게 보완하여 지방산 추출에 Dole^{5,6)}의 2-phase system인 Solvent mixture를 도입하였으며 이 과정에서 혼입된 소량의 인지질을 철저히 제거하기 위하여 냉각acetone을 처리하였다. 인지질의 혼입은 그만큼 높은 함량으로 오차를 나타낸다. 거의 모든 방법에서 지방산 함유 용액을 chloroform으로 처리하고 있으나 이 용매는 비중 차이로 하층에 위치하므로 상층의 모든 용매를 철저히 제거해야만 지방산 함유의 Chloroform용액을 사용할수 있다. 주로 이 과정은 지방산에 구리염을 형성시키는 과정인 바, 상층에는 청색의 Copper nitrate수용액이 위치하므로 이것의 철저히 제거 여부가 지방산 정량의 정확성을 결정짓는다. 거의 모든 오차는 이 과정에서 일어나기 쉽다. 본 방법은 이 과정을 개량하기 위하여 Chloroform대신에 toluene을 도입하였다.여러가지의 유기 용매를 시험한 결과 toluene만이 지방산의 구리염을 용해시키고 나머지의 용매들은 불용성 또는 불완전 용해성 또는 인접한 용매 층과의 혼합등으로 합당하지 못하였다. 따라서 본 방법에 의하여 혈액의 유리지방산을 정량할때에 혈액에 Solvent mixture로써 지방산을 추출하고 냉각acetone으로 처리하여 혼입된 소량의 인지질을 완전히 제거한 다음 용매를 증발시키고 toluene으로 용매를 대치한 다음 구리

용액 (Copper nitrate 수용액)을 첨가하여 지방산에 구리염을 형성시키고 나서 toluene 일정량을 취하여 발색제로서 처리하면 매우 간편하게

정량할수 있다. 따라서 본 방법은 임상가를 위시한 최신 고가 장비를 갖추지 못한 실험실에서 이용하기에 적합한 방법이라고 할수 있다.

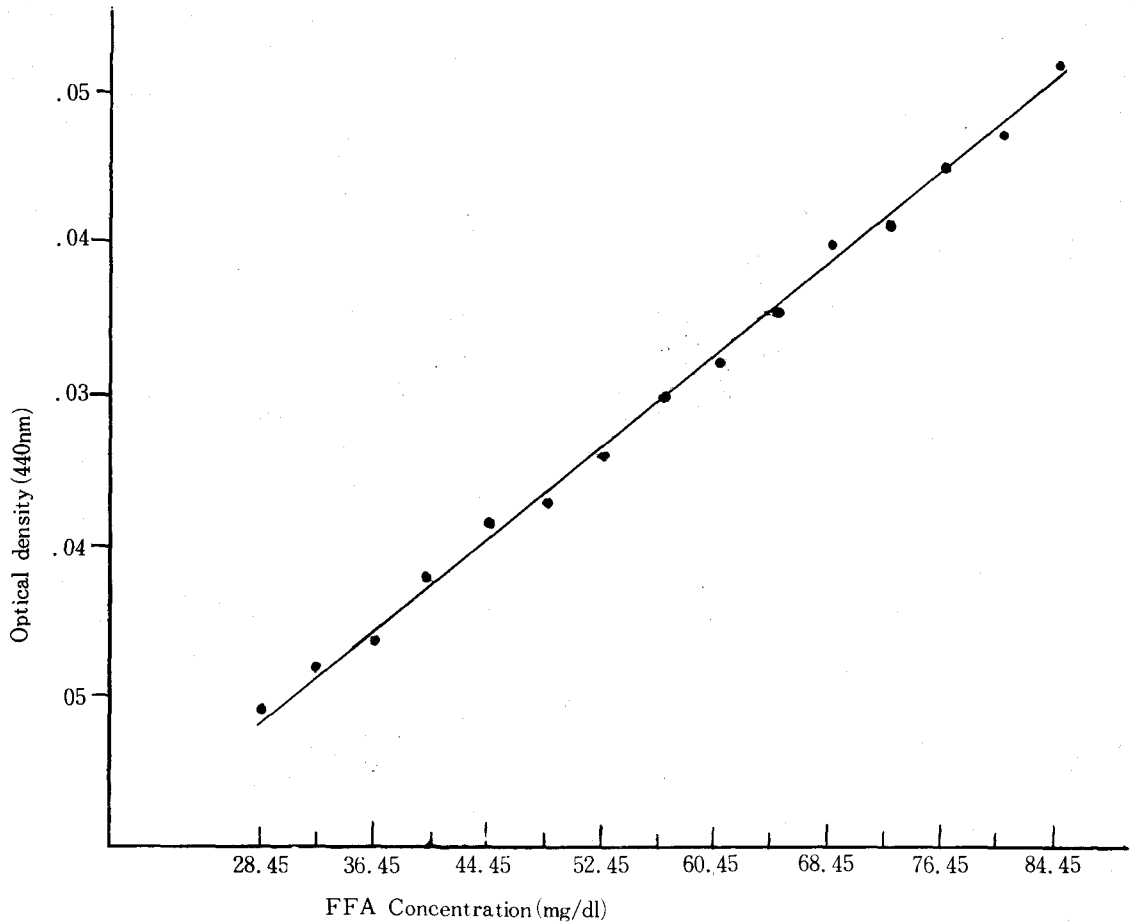


Table 1. Recoveries of Plasma Free Fatty Acids

Sample	FFA Cone. of Sample (mg/dl)	FFA Added to Sample (0.5ml)	Expected Cone. of FFA (mg/dl)	FFA Cone. Found (mg/dl)	Recovery rate (%)
B	10.36 (0.052) **	0.387mg	43.9	43.40	98.86
D	14.23 (0.071)	0.387	45.8	46.50	101.53
G	10.02 (0.055)	0.387	44.2	45.06	101.94
H	10.24 (0.051)	0.387	43.8	44.00	100.45
I	10.58 (0.053)	0.387	44.0	44.42	100.95
K	6.83 (0.034)	0.387	42.1	42.78	101.61
P	11.38 (0.057)	0.387	44.4	46.62	105.00
Q	8.88 (0.044)	0.387	43.1	46.71	108.37
U	11.95 (0.060)	0.387	44.7	46.95	105.04
Mean					102.64

* Final volume adjusted to 1.0ml and the concentration of FFA added was 77.347mg/dl.

** The numbers of milligram in parentheses are FFA concentrations in mg/0.5ml of plasma.

Table 2. Repetitive Analysis for Plasma Free Fatty Acids (Pooled Plasma)

Plasma extraction No.	Optical density	Plasma FFA (mg/dl)
1	0.150	10.98
2	0.145	10.53
3	0.140	10.24
4	0.136	9.79
5	0.130	9.39
6	0.142	10.36
7	0.148	10.81
8	0.138	9.84
9	0.143	10.58
10	0.140	10.24
11	0.146	10.70
12	0.145	10.53
Mean		10.33
Standard deviation		0.464
Coefficient of variability (%)		4.492

Table 3. Free Fatty Acid Concentration in Blood Plasma of Lately Imported Beef Cattles

Individual No.	FFA Concentraion (mg/dl)	Individual No.	FFA Concentraion (mg/dl)
6	9.67	F	10.92
7	11.95	G	10.92
8	8.54	H	10.24
9	10.47	I	10.58
10	7.17	J	9.39
11	12.52	K	6.83
12	9.67	L	7.52
13	7.40	M	12.29
14	7.97	N	12.52
15	12.75	O	7.40
16	10.24	P	11.38
17	8.76	Q	8.88
18	6.26	R	4.55
19	17.29	S	8.88
20	19.00	T	9.67
A	9.22	U	11.95
B	10.36	V	8.19
C	9.67	W	10.92
D	14.23	X	7.62
E	8.88	Z	9.10
Mean			10.04
Standard error			0.435

Table 4. Free Fatty Acid Concentration in Plasma of Slaughtering Beef Cattle

Individual No.	FFA Concentration (mg/dl)	Individual No.	FFA Concentration (mg/dl)
1	21.2	11	12.5
2	21.7	12	16.6
3	28.7	13	17.5
4	16.2	14	26.5
5	23.3	15	14.6
6	16.3	16	27.4
7	18.2	17	20.5
8	21.6	18	18.1
9	16.2	19	21.2
10	18.7		
mean			20.1
Standard error			1.0275

Table 5. Free Fatty Acid Concentration in Plasma of Slaughtering Fowl

Individual No.	FFA Concentration (mg/dl)	Individual No.	FFA Concentration (mg/dl)
1	37.27	6	38.69
2	37.55	7	37.27
3	38.12	8	34.71
4	37.84	9	36.99
5	36.42	10	35.28
mean			38.014
Standard error			0.392

IV. 결 론

과거의 시간 소요가 길고 복잡성을 지니며 고도의 기술을 요하는 지방산 분석방법보다 매우 간편하고 정확성이 큰 새로운 비색정량 방법을 고안하였다.

본 방법은 2-phase의 Solvent system을 도입하여 제반 혼합물에서 유리지방산을 추출하고 여기에 혼입되어 들어온 소량의 인지질을 냉각 acetone으로 처리하여 철저히 제거를 꾀하였다. 이용매를 증발시키고 toluene으로 대체하여 함유된 지방산에 Copper nitrate 수용액으로 처리하여 구리염을 형성시키고 이 지방산의 구리염을 함유한 toluene층을 일정량 분리하여 발색제로 발색 정량하였다.

본 방법에 의하여 정량할때에 그 정확성의 크기를 실험한 결과 회수율이 평균 102.64%, 재생성 실험에서 12회 되풀이 분석한 값이 평균

10.33mg/dl에 표준편차 0.464mg/dl, 변이계수가 4.49%였다. 또한 본 방법을 사용하여 실제로 동물의 혈청내 유리지방산 함량을 분석 실험한 결과는 최근에 수입된 육우의 혈청내 함량이 40마리 평균에서 10.04mg/dl 표준오차 \pm 0.435mg/dl (정상치 = 3~12mg/dl)로써 정상치에 잘 일치하나 도축장에서 얻은 한우 혈청과 도계장에서 얻은 백색 도계의 혈청내 함량은 각각 20.01 ± 1.03 mg/dl 및 37.01 ± 0.39 mg/dl였다. 이들은 모두 정상치 보다 훨씬 높은 함량을 보였는데 이는 도살시의 심한 흥분과 운동에 기인하는 과도의 지방산 동원이 원인인것 같다. 본 방법은 다른 과거의 방법에 비하여 비교적 간편한 방법이므로 저렴한 비색계나 또는 간단한 분광광도계(Spectrophotometer)만 갖춘 임상가 또는 실험실에서 충분히 할수 있는 것으로 생각된다.

Reference

1. Altman, P. L., and Ditter, D. S., *Biology Data Book*, Vol III, 2nd ed., Federation of America societies for Exper. Biol., Bethesda, Maryland, (1974), p1957.
2. Ayers, C. W., Estimation of the higher fatty acid C7-C18. *Anal. Chim. Acta.*, 15:77(1957)
3. Carlson, L. A., and Wadström, L. B., A colometric method of deter mining unesterified fatty acids in plasma. *J. Clinical and Labo. In estigation* 35:4(1958)
4. Davis, B. D., The estimation of small amounts of fatty acid in the presence of polyoxyethylene sorbitan partial fatty acid ester(Tween") and of serum proteins. *Arch. Biochem.*, 15:351(1947).
5. Dole, V. P., A relation between non-esterified fatty acid in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.*, 35:150(1956).
6. Dole, V. P., and Meinertz, H., Microdetermination of long-chain fatty acid in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, 235:2595(1960)
7. Duncombe, W. G., The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochem. J.*, 88:7(1963)
8. Gorden, R. S., JR., and Cherkes, A., Unesterified fatty acid in human blood plasma. *J. Clin. Invest.*, 35: 206 (1956)
9. Goss, J. E., and Lein, A., Microtitration of free fatty acid in plasma. *Clin. Chem.*, 13:36(1967)
10. Hlynczak, A. J., Sysa, J., Toczyski, T., and Horbaczewicz, A., Chromatographische mikromethode der quantitativen colorimatriscchen bestimmung hoherer fettsauren mittels dithizon. *Biochem. Z.*, 334:357(1961)
11. Sturkie, P. D.; *A man Physiology*. 3rd ed., Springer-Verlag. New York, (1976)p257-258.
12. 岩山陽治, 高級脂肪酸の 新比色定量法, 日本藥學雜誌, 79, 552 (1959)
13. 허린수, 김영홍 : 혈장유리불포화지방산의 비색정량법. 경북대논문집. 29:537 (1980)
14. 허린수, 모기철, 박항균, 김영홍 : 혈장유리불포화지방산의 비색정량법에 대한 개정방법, 한국축산학회지. 24 : 27 (1982)
15. 김한섭, 방석운, 이기녕 : 혈장유리지산의 비색측정법. 서울대학교논문집, 의약계. 19 : 1 (1968)

A Simple Colorimetric Method of Determining Free Fatty Acids in Serum.

Sung Hoon Kim, D.V.M., Hang Kyun Park, D.V.M, Ph.D.,
Ki Choul Mo, D.V.M, Ph.D., Rhin Sou Huh, D.V.M, Ph.D.

College of Agriculture, Gyoungbook National University

Abstract

The present paper describes a simple colorimetric determination method of serum or plasma free fatty acids in various animal for those who are in the laboratories unequipped with high-cost newer analysing equipments and for those clinicians with low-cost and simple colorimeter or spectrophotometer.

The procedure is based principally on the following steps: First step is that the samples of sera or plasma are treated with two-phase solvent mixture to extract fatty acids. At next step, the fatty acid extract is added with chilled acetone to eliminate completely the interfering substance, phospholipids, out from the extract. Then the fatty acids are dissolved in toluene after the decanted acetone has evaporated to dryness. Copper salts of the fatty acids are then formed by treating by treating copper nitrate solution into the fatty acid toluene solution. In this step, fatty

acid chloroform solution that almost all of former methods used is disadvantageous, for supernatant aqueous copper solution must be removed completely from lower chloroform phase in which failure in complete removal of supernatant aqueous copper phase would result in erroneous fatty acid value. Substitution of toluene relieved the disadvantage; for toluene is resided in upper layer and copper salts of fatty acids easily dissolved in the solvent, while almost all of the other solvents were not. Finally, like former methods, yellowish brown color is measured colorimetrically developed by adding color reagent.

In reliability test of the proposed method recovery and reproductibility test were 102.64%, and 4.49% (coefficient of variance), respectively. Free fatty acid concentration in sera of lately imported beef cattle (10.04 0.43mg/dl = mean of 40 cattle ± standard error) was accorded well with normal value cattle (3 ~ 12mg/dl), when analysed practically by proposed method.

図 書 案 内

James/the Merck Veterinary Manual 5th ed 1,680pp 1979	W12,000	態各哲夫外 / 豚病学(生理, 疾病, 飼養) 1,035pp 1977. 10 近代出版	W25,000
William C. Miller/Black's Veterinary Dictionary 8th ed 1,015pp 1967	W15,000	其田三夫外訳 / 牛の臨床検査診断 510pp 1981. 8 近代出版	W20,000
A. D. Leman/Diseases of Swine 5th ed 832pp 1981. 10WA	W18,000	尾形学外 / 新版家畜微生物学 第5刷 288pp 1981. 4. 朝倉書店	W10,000
M. S. Hofstad/Diseases of Poultry 7th ed 949pp 1978 I. S. U. F	W25,000	星修三外 / 家畜臨床繁殖学 319pp 1977. 10	W12,000
Ewald Berge/Veterinary Opeative Surgery 2nd ed 411pp 1977 M. B. Co.	W 8,000	印井和哉外 訳 / 臨床獣医学(Ⅰ, Ⅱ) 初版 1,254pp 1981. 7 文永堂()	W40,000
V. Stoss/J. H. Dufty/Hand Book of Bovine Obsterics 208 pp 1980 W. W. E.	W 8,000	笹原二郎外 / 獣医伝染病学 第1版 630pp 1979. 3 近代出版	W18,000
William R. Fenner/Quick Reference to Veterinary Medicine 1st ed 592pp 1982 J. B. L. Co.	W10,000	清水亀王次外 / 乳牛乳房炎 157pp 1976 明文書房	W 3,000
S. W. Douglas/Principles of Veterinary Radiogra- phy 2nd ed 266 pp 1979 B. T. L.	W 8,000	森谷信行訳 / 中国獣医針灸産法(馬針編) 103pp 1976 文永堂	W 8,000
J. R. obert, Dunoan/Veterinary Laboratory Medicine 1st ed 234. pp 1977 IoWA	W 8,000	木全春生 / 家畜の鍼術治療法文献集 136pp	W 5,000
Esther Y. Brown/Textbook of Veterinary Histo- logy 2nd ed 460pp 1981 Lea F. P	W12,000	孫濟英金教準 / 最新家畜疾病学 初版 334pp 1982 先進文化社	W 6,000
Murray E. Fowler/Zoo and Wild Animal Medicine 951pp 1978 W. B. Co.	W30,000	孫奉煥 / 乳牛乳房炎の予防と治療 初版 1979 英才文化社	W 4,000
Howard W. Dunne/Diseases of Swine 4th ed 1,212pp 1975 IOWA	W25,000	趙忠鵬 / 獣医産科学 初版 1981	W35,000
Joseph S. Spinelli/Drugs in Veterinary Practice 438pp 1978 C. V. M. Co.	W10,000	松原哲舟外 / 獣医X線読影の実際 初版 319pp 1974 医歯薬出版	W 4,500
Andrew Wilson/Practical Meat Inspection 3rd ed 271pp 1980 B. S. P	W 7,000	尾崎久雄外 / 魚類薬理学(1. サルファ剤) 165pp 1978 緑書房	W 3,800
PRMC/British Pharmacopoeia (Veterinary) 1st ed 171pp index 34pp 1977	W 7,000	宮本三七郎外 / 家畜有毒植物学 672pp 1970 文胎堂 永	W20,000
Dwight G. Benneet/FORMULARY (Colorado St- ate University Veterinary Teaching Hospital)	W 1,500	刈米達外 / 有毒植物・有毒キノコ 初版 109pp 1979 廣川書店	W16,000
中村良一外 / 臨床獣医ハンドブック(増訂改版) 1,360pp 1977 養賢堂	W15,000	其田三夫訳 / 獣医血液学(全3巻) 医歯薬出版	W185,000
大森常良外 / 牛病学 1,231pp 1980. 11 近代出版	W38,000	田中享一 / 原色版家畜血液図説 チクタン出版	W130,000
		渡辺昭三 / 畜産公害対策全書(畜種別糞尿処理) 初版 B. 5 判 380pp 1980 鶏卵肉情報	W20,000

農 耕 社 TEL. 612-6387
422-2096