

BARBARA ORAMUS-KASPRZYK, ANDRZEJ LASZCZKA, EDWARD WIERZCHOŚ

Oznaczanie stężenia fruktozy w nasieniu samców zwierząt gospodarskich metodą antronową

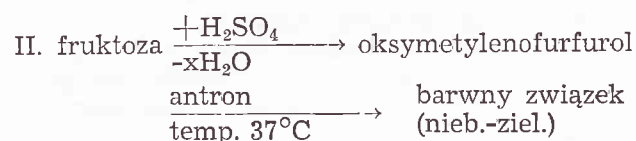
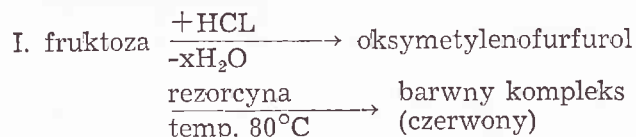
Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasielenia Zwierząt
Instytutu Zootechniki w Balicach k. Krakowa

Fizykochemiczne metody badania jakości nasienia polegają na oznaczaniu cech związanych z fizjologiczną funkcją dodatkowych gruczołów płciowych. Zdolność tych gruczołów do tworzenia fruktozy odzwierciedla bowiem dokładnie stopień aktywności męskich hormonów płciowych (8, 9, 12). Z tego też względu fruktoza należy do grupy cech powszechnie badanych przy ocenie jakości nasienia.

Do najczęściej stosowanych metod oznaczania stężenia fruktozy należy próba rezorcynowa (6, 10, 11, 12, 17, 19, 22, 25), która cieszy się opinią metody dość swoistej, lecz dającej słabo odtwarzalne wyniki (18, 21, 23).

Obecnie coraz częściej stosowana jest metoda antronowa, która prowadzona w temperaturze pokojowej (z tzw. zimnym antronem) pozwala na oznaczanie fruktozy w obecności glukozy i innych węglowodanów bez obawy udziału ich w reakcji (3, 4, 15, 18, 24).

Mechanizmy reakcji w obu metodach są podobne do siebie, jakkolwiek do tej pory nie są one dokładnie poznane (5, 13). Prawdopodobnie w obu przypadkach fruktoza pod wpływem kwasu ulega odwodnieniu i z odpowiednim odczynnikiem tworzy barwny związek (2, 20). Proces ten na ogólnym schemacie można przedstawić w następujący sposób:



Zabarwienie roztworu jest wprost proporcjonalne do zawartości fruktozy. Wykorzystując prawo Lamberta-Beera w prosty i szybki sposób można oznaczyć stężenie fruktozy klasycznymi metodami kolorymetrycznymi.

Celem pracy było porównanie wyników oznaczania stężenia fruktozy metodą antronową z wynikami oznaczania metodą rezorcynową, w odniesieniu do tego samego badanego materiału tj. nasienia buhajów, tryków i knurów.

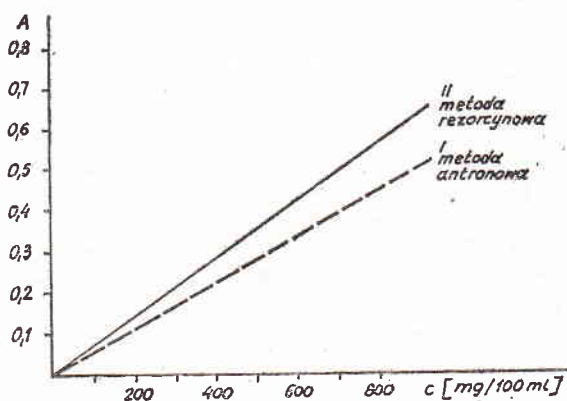
Materiał i metody

Do określenia stężenia fruktozy w osoczach nasienia buhaja i tryka zastosowano metodę rezorcynową w modyfikacji Pereza (6, 17) oraz Manna (1) odnośnie osocza nasienia knura. Przed wprowadzeniem metody antronowej van Handela w modyfikacji Nixona (15) przeprowadzono szereg prób dla ustalenia odpowiednich stężeń stosowanych odczynników w mie-

szaninie reakcyjnej w celu dobrania najlepszego zakresu pomiarów. Zakłada się bowiem, że wartość absorpcji winna mieścić się w granicach 0,1—0,8, przy czym największą dokładność uzyskuje się dla absorpcji w pobliżu 0,4 (14).

Oznaczenia w większości prób prowadzono w osoczach świeżo pobranego nasienia, bezpośrednio po odwirowaniu plemników. Przed określeniem stężenia fruktozy w obu metodach przeprowadzono proces odbiałczenia (18). Stosując metodę antronową do 1 ml wody destylowanej, 1 ml 1,2% NaOH i 1 ml 5% ZnSO₄ dodawano 0,05 ml badanego osocza. Tak otrzymaną mieszaninę odwirowywano i klarowny przesącz poddawano właściwemu oznaczeniu: 0,5 ml odbiałzonego osocza dodawano do 3 ml roztworu antronowego i inkubowanego przez okres 30 min. w temp. 37°C. Ekstynkcje badanych roztworów mierzono na spektrometrze typu Carl Zeiss przy długości fali 600 nm.

Wartości ekstynkcji służyły do odczytywania stężenia fruktozy z wcześniej przygotowanych krzywych wzorcowych. Sporządzano je oddzielnie dla metody antronowej i rezorcynowej opierając się na roztworach wzorcowych zawierających 100, 200, 300, 400, 500, 600 i 800 mg fruktozy — 100 ml roztworu (rys. 1).



Ryc. 1. Krzywe wzorcowe fruktozy

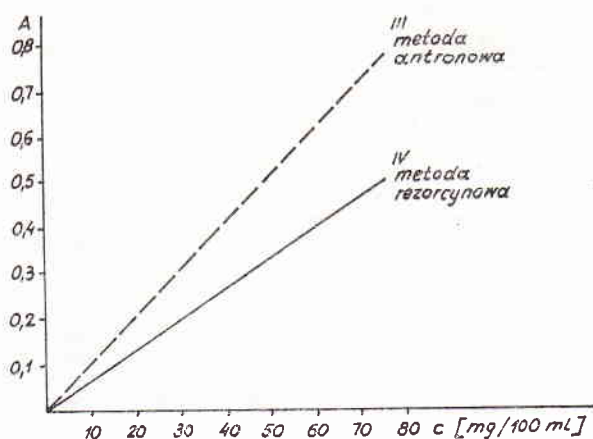
W osoczach nasienia knura przeprowadzono niewielką ilość pomiarów (17) — postępowano tu podobnie, stosując jedynie inne objętości odczynników ze względu na mniejsze stężenie fruktozy (1). W celu odbiałczenia i usunięcia plemników przed oznaczaniem metodą antronową do mieszaniny 1 ml wody destylowanej, 1 ml 0,3 n Ba(OH)₂ i 1 ml 5% ZnSO₄ dodawano 2 ml badanego nasienia. Po odwirowaniu przesącz poddawano barwnym reakcjom. Stężenie fruktozy w badanych próbach odczytywano z odpowiednio wykreślonych krzywych wzorcowych sporządzonych z roztworów o stężeniu 10, 20, 30, 40 i 50 mg fruktozy w 100 ml roztworu (rys. 2).

W celu pełniejszego porównania obu metod wykonano badania mające na celu obliczenie % odzysku (24), gdzie:

$$\% \text{ odzysku} = \frac{\text{próba wzbogacona} - \text{próba pierwotna}}{\text{ilość dodana}} \times 100\%$$

Pomiary przeprowadzono dla 16 prób osocza nasienia buhaja i tryka o znanym stężeniu fruktozy, do któ-

rych dodawano roztwór wzorcowy o stężeniu 300 lub 400 mg/100 ml.



Ryc. 2. Krzywe wzorcowe fruktozy

Wyniki i omówienie

Wyniki pomiarów przeprowadzonych w osoczu nasienia buhajów, tryków i knurów przedstawiono w tab. 1. Średnie stężenie fruktozy oznaczanej metodą antronaową wynosi 394 mg/100 ml roztworu dla buhajów i 472 mg/100 ml dla tryków, natomiast oznaczane metodą rezorcynową odpowiednio 361 i 435 mg/100 ml. W większości przypadków (76 na 90 badanych ejakulatów) przy stosowaniu do oznaczeń antronu uzyskano wyniki wyższe średnio o 35 mg/100 ml, co stanowi około 8% średniego stężenia fruktozy w nasieniu buhajów i tryków. W przypadku oznaczeń fruktozy w nasieniu knura średnie stężenie określane metodą antronaową wynosi 14,2 mg/100 ml roztworu, podczas gdy przy próbie rezorcynowej 14,7 mg/100 ml. Wyniki otrzymane metodą antronaową są tu nieznacznie wyższe od wyników uzyskanych przy zastosowaniu rezorcyny.

Tab. 1. Średnie stężenie fruktozy w osoczu nasienia oznaczanej metodą antronaową (\bar{C}_A) i rezorcynową (\bar{C}_R)

	n	\bar{C}_A	\bar{C}_R	$\Delta \bar{C} = \bar{C}_A - \bar{C}_R $
Buhaje	58	394	361	33
Tryki	32	472	435	37
Knury	17	14,2	14,7	-0,5

Przy badaniach mających na celu określenie procentowego odzysku dla danej metody nie wykonywano pomiarów na czystych roztworach fruktozy, aby nie podwyższać sztucznie wyników, gdyż w rzeczywistości sprowadza się to do sprawdzenia krzywej wzorcowej. Wyniki pomiarów przedstawiono w tab. 2. Średni procent odzysku fruktozy dla metody antronaowej 92,7% oraz 84,5% dla metody rezorcynowej, czyli około 8% wyższy przy stosowaniu antronu.

Przedstawione wyniki potwierdzają ogólnie panującą opinię o przewadze metody antronaowej nad metodą rezorcynową (4, 15, 18, 24). Pod względem postępowania obie metody są podobne — opierają się na wywołaniu barwnej reakcji odpowiedniego odczynnika z fruktozą, a następnie oznaczeniu kolorymetrycznym. Stosuje się przy tym tę samą aparaturę, a więc i błąd pomiaru wynikający z dokładności aparatu można przyjąć za jednakowy. Tak więc występujące różnice mogą wynikać głównie z czułości samej reakcji barwnej, a dokładniej z możliwości wykrycia barwnych zmian roztworu równoległe ze śladowymi różnicami zawartości fruktozy. W niniejszej pracy, w przypadku metody antronaowej w przeważającej większości uzyskano wyniki wyższe, co może wynikać z większej czułości barwnej reakcji fruktozy z antronem. Podobnie van Handel (4) oznaczając stężenie fruktozy w płynach biologicznych otrzymał wyższą średnią dla metody antronaowej 78 mg/100 ml i 72 mg/100 ml dla metody rezorcynowej. Wyniki pomiarów procentowego odzysku fruktozy (24) również wskazują na większą dokładność metody antronaowej. Metoda ta charakteryzuje się także oszczędnością badanego materiału — do oznaczania stężenia fruktozy wystarcza połowa objętości koniecznej przy metodzie rezorcynowej.

Tab. 2. Procent odzysku fruktozy z prób o znanym stężeniu, wzbogaconych o 300 i 400 mg/100 ml fruktozy

Metoda	Próba pierwotna	Próba wzbogacona o 300 mg/100 ml	Procent odzysku	Próba wzbogacona o 400 mg/100 ml	Procent odzysku
Antronaowa	450	720	90,0	835	95,3
	390	696	102,0	760	92,5
	750	1000	83,3	1117	91,8
	520	800	93,3	890	92,5
Rezorcynowa	430	660	76,7	790	90,0
	350	600	83,3	715	91,3
	745	1000	85,0	1060	78,8
	500	750	83,3	850	87,5

Porównując obie metody pod względem stopnia trudności wykonania, metoda antronaowa wydaje się być prostsza i łatwiejsza. W obu wypadkach stosuje się stężone kwasy (80% H_2SO_4 , 30% HCl), jednak należy podkreślić, że przy metodzie rezorcynowej reakcję barwną przeprowadza się w środowisku kwasu solnego w temperaturze 80—85°C, co powoduje wydzielanie znacznych ilości gryzących par chlorowodoru. Stosowanie natomiast kwasu siarkowego w temperaturze zbliżonej do pokojowej w przypadku metody antronaowej, pozwala na stworzenie mniej uciążliwych warunków pracy.

Jako dodatkową zaletę metody antronaowej wymienia się możliwość uniknięcia odbiałczania badanego materiału (3). Stwierdzono bowiem, że gotowanie próby z wodorotlenkiem jest zbędne, gdy zastosuje się mniej stężony roztwór antronu i inkubację przeprowadzi się przy 37°C. Uniknięcie konieczności odbiałczania badanego materiału znacznie upraszcza i podwyższa dokładność metody, gdyż wówczas zmniejsza się ilość czynności laboratoryjnych (odmierzenia, wirowania) oraz pozwala na uniknięcie nieswo-

istej adsorpcji fruktozy na wytrąconych białkach. W efekcie zmniejsza się błąd techniczny. Założeniem niniejszej pracy było jednak zbadanie obu metod przeprowadzonych w podobnych warunkach tak, aby uchwycone ewentualne różnice wynikały głównie z czułości samej reakcji barwnej fruktozy z odpowiednim odczynnikiem. Dlatego też proces odbiałczania przeprowadzano w obu metodach.

Wymienione wyżej zalety metody antronywej wskazują na możliwość wprowadzania jej w miejsce dotychczas powszechnie stosowanej metody rezorcynowej do oznaczania stężenia fruktozy w osoczu nasienia buhajów i tryków. Ogólnie można ją scharakteryzować jako metodę:

- 1) prostszą i łatwiejszą w wykonaniu,
- 2) dokładniejszą w ocenie zawartości fruktozy,
- 3) zużywającą mniejszą ilość badanego materiału biologicznego.

Piśmiennictwo

1. Bieleński W.: Rozród Zwierząt. PWRiL, 1972.
 2. Bjornesjo K. B.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 7, 141, 1955.
 3. Davidson W. D., Sackner M. A.: *J. Lab. Clin. Med.* 62, 351, 1963.
 4. Van Handel E.: *Anal. Biochem.* 19, 193, 1967.
 5. Karlson P.: *Zarys biochemii.* PWN, 1971.
 6. Kastyał L., Kosmaczewska A.: *Zesz. Probl. Postęp. Nauk Roln.*, 176, 73, 1976.
 7. Korycki S., Jaśkowski L.: *Pol. Arch. Wet.*, 13, 259, 1970.
 8. Mann T.: *Biochem. J.* 39, 458, 1945.
 9. Mann T.: *Biochem. J.* 40, 481, 1946.
 10. Mann T.: *Lancet* 254, 446, 1948.
 11. Mann T.: *J. Agr. Sci.* 38, 323, 1948.
 12. Mann T.: *Biochemia nasienia.* PWRiL, 1958.
 13. Mejbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I.: *Kurs praktyczny z biochemii.* PWN, 1966.
 14. Minczewska J., Marczenko Z.: *Chemia analityczna.* PWN, 1965.
 15. Nixon D. A.: *Clin. chim. Acta* 26, 167, 1969.
 16. Pater K.: *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 31, 173, 1961.
 17. Perez N., Reane J. P.: *C. r. Acad. France*, 43, 268, 1957.
 18. Richterich R.: *Chemia kliniczna.* PZWL, 1971.
 19. Roe J. R.: *Biol. Chem.* 107, 15, 1934.
 20. Roe J. H., Goldstein N. P.: *J. biol. Chem.* 178, 839, 1949.
 21. Roe J. H., Epstein J. H., Goldstein N. P.: *J. biol. Chem.* 178, 839, 1949.
 22. Rzeźnik K.: *Zesz. Probl. Post. Roln.* 124, 225, 1971.
 23. Schreiner G. E.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 117, 1950.
 24. Siedlecka-Binder Z.: *Fruktoza w płynach ustrojowych.* Praca dokt. UJ, 1972.
 25. Teter J.: *Zaburzenia hormonalne u mężczyzn.* PZWL, 1964.
- Adres autora: mgr Barbara Oramus-Kasprzyk, ul. 18 Stycznia 36/15, 30-045 Kraków.

Орамус-Каспшик Б., Ляцка А., Вежхось Э. — **Определение концентрации фруктозы в семени самцов домашних животных антроновым методом.**

Цель работы состояла в описании и сравнении двух различных способов определения концентрации фруктозы: резорцинового метода, применяемого до сих пор исследовании плазмы семени домашних животных, и антронового метода, все чаще вводимого при исследованиях фруктозы в биологическом материале.

Измерения проводили в плазме семени быков, баранов и хряков. Проверляли точность обоих методов через подсчет процентной рекуперации фруктозы. Концентрация фруктозы, определяемая антроновым методом, составляла в среднем 394 мг/100 мл раствора для быков и 472 мг/100 мл для баранов, определяемая же резорциновым методом — соответственно 361 и 435 мг/100 мл. В большинстве случаев при применении антрона результаты были выше в среднем на 35 мг/100 мл. Результаты измерений фруктозы в семени хряка антроновым методом были незначительно ниже результатов, полученных при применении резорцина. Средняя величина процентной рекуперации фруктозы была выше на 8% при применении антрона.

Из полученных результатов делается вывод, что антроновый метод проще и точнее резорцинового.

Oramus-Kasprzyk B., Laszczka A., Wierchoś E. — **Estimation of fructose concentration in the farm animal semen using anthrone method.**

The purpose of the work was to compare the following methods of determining fructose concentrations: a — resorcinol method widely used in the examination of plasma of farm animals, b — anthrone method which is more and more frequently applied for fructose determination in biological materials. Measurements were done in the bull, ram and boar semen plasma. The accuracy of the both methods was checked up by calculating the percentage of fructose recovered. Fructose concentrations by the use of the anthrone method was on an average 394 mg in the bull semen plasma and 472 mg in the ram per 100 ml of solution examined. Instead the data obtained with the resorcinol method were 361 and 435 mg/100 ml respectively. In most cases the averages received by anthrone method were at 35 mg/100 ml solution greater. The fructose measurements in the semen plasma of boars using the resorcinol method were insignificantly lower than those found by means of anthrone method. The average value of fructose recovered with anthrone method was 8 per cent more than that with the resorcinol method. The findings indicate that the anthrone method is simpler and of greater accuracy than the resorcinol one.

SCOTT F. W.: **Wirosobójcze środki dezynfekcyjne a wirusy kocię. (Virucidal disinfectants and feline viruses).** *Am. J. vet. Res.* 41, 410-414, 1980 (3).

Przebadano działanie wirusobójcze 35 powszechnie stosowanych środków odkażających (antyseptyki, aseptyki, sanizatory i detergenty) w stosunku do wirusa zapalenia nosa i tchawicy kotów, kaliciwirusa kocięgo oraz wirusa panleukopenii. Wirusy eksponowano na działanie preparatów przez okres 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie ekspozycji określano stopień inaktywacji wirusów na hodowlach komórek kota. Z badanych preparatów 22 wywierały działanie wirusobójcze na wirus zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy, 11 na kaliciwirus i jedynie trzy na wirus panleukopenii. Najwyższe spektrum działania oraz najsilniejsze działanie wirusobójcze wykazywał 0,175% roztwór podchlorynu sodowego.

G.

ALLEY M. R., WELLS P. W., SMITH W. D., GARDNER A. C.: **Rozmieszczenie immunoglobulin w układzie oddechowym owcy. (The distribution of immunoglobulins in the respiratory tract of sheep).** *Vet. Pathol.* 17, 372-380, 1980 (3).

U nowo narodzonych jagniąt przed podaniem siary IgM stanowi główną klasę immunoglobulin wykrywalną metodą immunodiffuzji i metodą immunoperoxidazową w gruczołach jamy nosowej i oskrzeli. Po karmieniu siarą we wszystkich tkankach układu oddechowego dominują immunoglobuliny klasy IgG. U dorosłych owiec w śluzówce nosa występuje prawie identyczna liczba komórek zawierających IgG i IgA, natomiast w śluzówce oskrzeli stwierdza się około 2,5, zaś w płucach około 2 razy więcej komórek zawierających IgA. Liczba komórek zawierających IgA przewyższa ponad trzykrotnie liczbę komórek zawierających IgM.

G.