

## OZNACZANIE FRUKTOZY W NASIENIU BUHAJÓW I TRYKÓW METODĄ R. KULKI

KRYSTYNA PATER

Katedra Fizjologii Zwierząt WSR Kraków  
Kierownik: prof. dr Z. Ewy

Od czasu wykrycia fruktozy w nasieniu zwierząt przez Manna (1954) badania nad oznaczaniem jej poziomu w spermie, nad miejscem powstawania i przemianami, jakim podlega od chwili, w której nasienie znajdzie się poza organizmem samca, są przedmiotem stałego zainteresowania.

Znaczenie fruktozy, która jest wytwarzana przez gruczoły dodatkowe, przede wszystkim zaś przez gruczoły pęcherzykowe, polega na dostarczaniu plemnikom energii wyzwalanej w czasie fruktolizy. Sekrecja fruktozy przez gruczoły pęcherzykowe odbywa się w toku normalnej produkcji męskich hormonów płciowych i jest wskaźnikiem aktywności hormonalnej jąder. Wskaźnik fruktolizy nasienia, czyli zużycie fruktozy przez  $10^9$  plemników w ciągu jednej godziny w temperaturze  $+37^\circ\text{C}$  może być uważany za miarę jakości nasienia. Plemniki nieżywe nie zużywają fruktozy. Choć istnieją liczne metody oznaczania fruktozy we krwi, to jednak do oznaczania jej w nasieniu posługiwano się dotąd jedynie metodą opisaną przez Manna (1946), a opartą na metodzie Ro'e'go (1934) wykrywania fruktozy we krwi. Ze względu na dużą wrażliwość na wahania temperatury i czas ogrzewania, wymienioną metodę cechują znaczne odchylenia wyników, wskutek czego zwiększa się % błędu.

Kulka opracował w 1956 r. metodę kolorymetrycznego oznaczania ketoheksoz i ketopentoz we krwi, posługując się reakcją rezorcynową. Przez zmodyfikowanie składu odczynników i toku analizy osiągnął w porównaniu z metodą Ro'e'go zmniejszenie błędu do minimum. Zalety metody Kulki zachęciły do zastosowania jej przy oznaczaniu fruktozy w nasieniu buhajów i tryków.

Do wykonania oznaczania potrzebne są następujące odczynniki:

- 1) roztwór I — 0,05-procentowy roztwór rezorcyny w alkoholu absolutnym;
- 2) roztwór II — 0,216 g siarczanu żelazowo-amonowego rozpuszcza się w 1 l stężonego kwasu solnego o c. wł. 1,18;

3) 0,1-normalny wodorotlenek sodowy;

4) 2-procentowy siarczan cynkowy;

5) bufor fosforanowy, pH 7,4 (konieczny przy oznaczaniu współczynnika fruktolizy). 0,125 Molarny roztwór  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (4,477 g fosforanu rozpuszcza się w małej ilości wody destylowanej i dopełnia nią do 100 ml objętości); pH roztworu doprowadza się do 7,4 za pomocą 0,1 normalnego kwasu solnego;

6) macierzysty standard fruktozy zawiera 100 mg fruktozy w 100 ml roztworu.

7) rozcieńczony standard fruktozy — zawiera 5 mg fruktozy w 100 ml roztworu; otrzymuje się przez pobranie 5 ml z macierzystego standardu fruktozy i dopełnienie wodą destylowaną do 100 ml.

**Postępowanie.** 1. Pobrane nasienie rozcieńcza się w stosunku 2:1 buforem fosforanowym i miesza dokładnie (np. 0,2 ml spermy i 0,1 ml buforu); z mieszaniny pobiera się 0,1 ml do probówki i dopełnia się wodą do 2 ml objętości, a następnie odbiałcza za pomocą 1 ml roztworu 2-procentowego siarczanu cynkowego i 1 ml 0,1 n wodorotlenku sodowego. Po zmieszaniu zawartości probówki przeprowadza się denaturację cieplną w łaźni wodnej w temperaturze  $100^\circ\text{C}$  w ciągu 1 minuty, po czym osad zostaje odsączony.

2. Z odbiałczonych roztworów pobiera się po 2 ml do probówek z doszlifowanym korkiem. Jeżeli poziom fruktozy w nasieniu jest wysoki, pobiera się po 1 ml roztworu odbiałczonego i dopełnia do 2 ml wodą. Następnie wprowadza się 3 ml roztworu I oraz 3 ml roztworu II. Probówki zatyka się korkami i zawartość ich miesza dokładnie, a następnie umieszcza w łaźni wodnej o temperaturze  $80^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ . Każdorazowo wykonuje się jednocześnie próbę kontrolną: do 2 ml wody dodaje się pozostałe odczynniki. Po upływie 40 minut probówki przenosi się do łaźni wodnej z lodem (ok.  $0^\circ\text{C}$ ) w celu szybkiego oziębienia i przerwania reakcji rozwijania barwy.

3. Badane roztwory po wywołaniu barwy przybierają kolor brunatno-różowy, którego natężenie ustalono posługując się fotometrem Pulfricha przy długości fali 480 m $\mu$  wobec ślepej próby przy użyciu kiuwety o grubości warstwy 1 cm. Z pomiarów ekstynkcji poszczególnych próbek wyliczano zawartość fruktozy z krzywej wzorcowej. Krzywą wzorcową otrzymuje się za pomocą badania w fotometrze próbek standardowego roztworu fruktozy. W tym celu pobiera się próbki zawierające od 10 do 100  $\mu\text{g}$  fruktozy, czyli 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2,0 ml rozcieńczonego roztworu wymienionego cukru, które dopełnia się do 2 ml wodą destylowaną. Do każdej z próbek dodawano następnie roztworów I i II i postępowano w dalszym ciągu zgodnie z podaną wyżej metodyką. Barwne próbki standardu poddaje się badaniu w fotometrze i wykreśla krzywą wzorcową, zaznaczając na osi odciętych zawartość fruktozy w  $\mu\text{g}$ , a na osi rzędnych — ekstynkcję.

Obliczanie. Z krzywej wzorcowej wylicza się zawartość fruktozy w badanej próbce nasienia, czyli w 2 ml roztworu po odbiałczeniu. Należy uwzględnić również rozcieńczenie nasienia powstałe przez dodanie buforu oraz wprowadzenie odczynników odbiałczających. Zawartość fruktozy w 100 ml nasienia wylicza się ze wzoru:

$$x = \frac{a \cdot 100}{0,0333 \cdot 1000} \text{ [mg/100 ml]}$$

gdzie:

$x$  — oznacza zawartość fruktozy w mg w 100 ml nasienia,  $a$  — zawartość fruktozy w  $\mu\text{g}$  w próbce odczytaną z krzywej wzorcowej, mnożnik 100 — wprowadzono w celu przeliczenia wyników w odniesieniu do 100 ml nasienia, 0,0333 — współczynnik przeliczeniowy, odpowiadający ilości spermy wziętej do oznaczania, dzielnik 1000 wprowadzono w celu przeliczenia zawartości fruktozy z  $\mu\text{g}$  na mg.

Metoda Kulki pozwala na wykonanie dokładnych oznaczeń fruktozy we krwi, nawet w obecności innych ketoz. Przystosowana została do oznaczania fruktozy w nasieniu buhajów i daje zadowalające rezultaty, co jest ważne ze względu na konieczność pobierania do analizy małych próbek materiału. Do dodatnich stron metody należy zaliczyć także jej stabilność na wahania czasu ogrzewania przy wywoływaniu barwy. Przedłużenie czasu ogrzewania powyżej 40 minut nie powoduje większych zmian w ekstynkcji (przy temperaturze 80 °C), co jest specjalnie ważne przy dużej liczbie wykonywanych analiz. Zawartość fruktozy w próbce

T a b e l a 1

Sprawdzanie dokładności metody za pomocą próbki ze znaną ilością fruktozy

Fruktoza			
dodana do próbki	normalna zawartość w próbce	znaleziona	%
25	-	26	104
30	-	30	100
40	-	41	102
50	-	52	104
100	-	100	100
0	67	66	98,5
0	67	68	101,5
25	66	86	94,5
25	33	56	96,6
50	33	81	97,5
50	4	55	102
80	2	81	99

w granicach od 5 do 100  $\mu\text{g/ml}$  daje na wykresie linię prostą zgodnie z prawem Lamberta-Beera. Stabilność barwy przy zastosowaniu procedury proponowanej przez Kulkę wynosi 5 godzin przy przechowywaniu próbek w temperaturze pokojowej w przyćmionym świetle.

Dokładność metody ilustruje tabela 1, która przedstawia wyniki oznaczeń, dotyczących roztworów o znanej zawartości fruktozy (standardy), próbek spermy oraz próbek uzyskanych przez dodanie określonej ilości fruktozy do próbki odbiałzonego nasienia. W ostatniej rubryce podano w procentach wykrytą ilość fruktozy w porównaniu z rzeczywistą zawartością w danej próbce.

Metoda Kulki w zastosowaniu do oznaczeń fruktozy w nasieniu buhajów i tryków zasługuje ze wszech miar na polecenie ze względu na prostotę wykonania i dużą czułość (w granicach od 10 do 100 g fruktozy w próbce). Nadaje się ona także do oznaczania fruktozy w nasieniu innych zwierząt, lecz po wprowadzeniu pewnych modyfikacji w związku z różnicami w zawartości tego cukru w nasieniu poszczególnych gatunków.

#### PIŚMIENNICTWO

- Erb R. E. i wsp. (1956): J. Dairy Science. 39, 326.  
Kulka R. G. (1956): Biochem. J. 63, 542.  
Mann T. (1946): Biochem. J. 40, 481.  
Roe J. H. (1934): J. Biol. Chem. 107, 15.

К. П а т е р (Краков)

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗЫ В СЕМЕНИ БЫКОВ И БАРАНОВ МЕТОДОМ Р. КУЛЬКИ

#### Резюме

Метод Р. Кульки определения кетоз и кетопентоз в крови приспособлено к определению фруктозы в семени быков и баранов. После удаления белка из проб семени, содержание фруктоза определяется на основе колориметрической резорциновой реакции. Модификация состава реактивов и самого хода анализа, введенная Кулькой при применении к семени животных, дает хорошие результаты. Метод характеризуется значительной стабильностью по отношению к колебаниям времени и температуры нагревания при выявлении окраски, что вяжется с уменьшением погрешности анализа. Метод можно тоже применять для определения фруктозы в семени других животных после введения соответствующих модификаций, учитывающих незначительное количество сахара в семени некоторых быков.

K. Pater (Kraków)

FRUCTOSE DETERMINATION OF BULLS AND RAMS' SEMEN BY R. KULKA  
METHOD

Summary

R. G. Kulka method for ketoses and ketopentoses determination in blood has been adapted for fructose determination of bulls and rams' semen. After deproteinization of semen samples the fructose content is determined by colorimetric resorcinal test. The modification of reagents composition and of the course of analysis itself introduced by Kulka, as applied to animal semen gives satisfactory results. The method is characterized by a considerable stability with regard to the fluctuation of time and of heating temperature when developing colour, which is connected with the reduction of analysis error. The method may be also applied for fructose determination of semen in another animals after introducing adequate modifications considering small amount of the mentioned sugar in sperm of certain species.