

## BADANIA PORÓWNAWCZE NAD OKREŚLANIEM RÓŻNYMI METODAMI ZAWARTOŚCI FRUKTOZY W NASIENIU TRYKÓW

*Lesław Kastyak, Anna Kosmaczewska*

Zakład Zoohigieny Instytutu Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt AR-T  
w Olsztynie

Kierownik Zakładu: doc. dr Lesław Kastyak

Spośród wielu metod służących do oceny jakości nasienia określanie zawartości fruktozy i indeksu fruktolizy posiada bardzo istotne znaczenie. Stężenie fruktozy jest, między innymi, wskaźnikiem aktywności hormonalnej jąder [13], a z drugiej strony zawartość fruktozy w nasieniu zbyt duża lub zbyt mała wskazuje na pewne nieprawidłowości w składzie chemicznym nasienia. Na przykład Kastyak i Strzeżek [10] wykazali, prowadząc badania na nasieniu normalnym i patologicznym, że tryki posiadały w nasieniu patologicznym prawie trzykrotnie niższą ilość fruktozy.

Zawartość fruktozy w nasieniu uzależniona jest od szeregu czynników, a między innymi od: stężenia testosteronu [5], wielkości gruczołów dodatkowych [13], poziomu glikozy we krwi [13], stanu odżywiania zwierzęcia [12], częstości pobierania ejakulatów [8], pory roku [8], temperatury [6], wieku zwierzęcia [9].

Ilość fruktozy w nasieniu wpływa na lepszą lub gorszą jego zdolność do zamrażania [17].

Oprócz określenia zawartości fruktozy w nasieniu, ważne jest również obliczenie indeksu fruktolizy, który jest miernikiem szybkości przemiany materii zachodzącej w nasieniu, a tym samym wskaźnikiem jego jakości [11].

Jak wykazało szereg autorów [2, 3, 4, 7, 13], istnieje dość znaczna współzależność między indeksem fruktolizy a zdolnością zapłodniającą nasienia. Hopwood i wsp. [7], prowadząc badania nad zależnością między indeksem fruktolizy a płodnością buhajów, stwierdzili wysoko istotną korelację ( $0,604 \pm 0,084$ ). Salisbury wykazał, że współczynnik ten wynosi 0,62, natomiast Gassner 0,83 [cyt. za Eible — 4].

Obecnie spotkać się można z różnymi metodami określania zawartości fruktozy, które różnią się zastosowaniem odmiennych odczynników chemicznych, a także różnymi stopniami rozcieńczenia nasienia. Mann [11] na przykład podaje, aby stosować 0,1 ml nasienia, 1,9 ml wody destylowanej oraz po 1 ml 0,1 n NaOH, 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ZnSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; Eible [4] — 0,1 ml nasienia, 3,9 ml wody destylowanej i po 2 ml 0,4<sup>0</sup>/<sub>0</sub> NaOH i 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, zaś Perez [14] — 0,1 ml nasienia, 2,9 ml wody destylowanej i po 0,5 ml 0,1 n NaOH i 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; Tulczyński [18] — 0,5 ml nasienia, 7,5 ml wody destylowanej i po 1 ml 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O i 0,5 n NaOH. Niektórzy autorzy proponują różne stężenia rezorcyny, na przykład Mann [11] — 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, a Kulka [15] — 0,05 procent. Jeszcze inne proporcje rozcieńczeń podaje Boryczkò [1] przy zastosowaniu oznaczania fruktozy metodą szacunkową.

W piśmiennictwie wyrażany jest również pogląd [15], że metoda Manna, ze względu na dużą wrażliwość na wahania temperatury i czas ogrzewania, cechuje się znacznymi odchyleniami wyników, wobec czego zwiększa się procent błędu. Natomiast metoda Kulki uważana jest za bardziej obiektywną i dającą minimum błędu.

Celem niniejszej pracy jest zatem przeprowadzenie badań porównawczych nad określaniem zawartości fruktozy w nasieniu tryków przy zastosowaniu trzech metod: Manna, Kulki i Eibla, jak również stwierdzenie, czy różne stężenia rezorcyny i siarczanu cynku, a także okresy przechowywania prób wpływają na ewentualne zmiany odczytów kolorymetrycznych w zawartości fruktozy.

#### MATERIAŁ I METODYKA

Badania porównawcze określania zawartości fruktozy prowadzono na nasieniu tryków rasy polskiej owcy długowłnistej, jak również na czystej fruktozie produkcji belgijskiej. Doświadczenie podzielono na cztery etapy. W pierwszym etapie porównywano trzy metody określania zawartości fruktozy według — Manna [11], Kulki [15] i Eibla [4]. W drugim etapie badano wpływ stężenia rezorcyny (0,1 i 0,05<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) na wyniki odczytów kolorymetrycznych przy określaniu zawartości fruktozy. W trzecim etapie określano wpływ różnych stężeń siarczanu cynku (2, 4, 6, 8 i 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) na kształtowanie się zawartości fruktozy. W czwartym etapie badano wpływ długości przechowywania prób w temperaturze około 4°C na zmiany odczytów kolorymetrycznych przy określaniu zawartości fruktozy (bezpośrednio po wykonaniu analiz, a następnie po 12, 24, 36 i 48 godzinach). Badania niniejsze prowadzono na specjalnie sporządzonych standardach fruktozy o różnych stężeniach (400, 200, 100, 50 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>), jak również na nasieniu tryków.

Określanie zawartości fruktozy prowadzono następująco: mikropipetą pobierano 0,1 ml nasienia (przy wszystkich metodach), które wlewano do probówek zawierających wodę destylowaną w ilości 1,9 ml (przy metodzie Manna i Kulki) oraz 3,9 ml — przy metodzie Eibla. Następnie do każdej probówki dodawano 1 ml 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> siarczanu cynku i 1 ml 0,4<sup>0</sup>/<sub>0</sub> NaOH (przy metodzie Manna i Kulki) oraz po 2 ml tych odczynników przy metodzie Eibla. W tym stadium zawartość probówek pozostawiano przez całą noc w temperaturze około 4°C. Po czym mieszaninę tę ogrzewano przez około 2 min w łaźni wodnej z gotującą wodą i filtrowano przez sączek. Z przesączu pobierano 2 ml klarownego roztworu. Do każdej próby dodawano 2 ml 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu rezorcyny i 6 ml HCl przy metodzie Manna i Eibla, natomiast przy metodzie Kulki dodawano 3 ml roztworu I (0,05<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztwór rezorcyny w alkoholu absolutnym) i 3 ml roztworu II (0,216 g siarczanu żelazowo-amonowego rozpuszczonego w litrze stężonego HCl o ciężarze właściwym 1,18). Po dodaniu tych odczynników próby wstawiono do łaźni wodnej o temp. 80-85°C celem wywołania barwnej reakcji. Po 10 min próby oziębiano i prowadzono odczyty kolorymetryczne na kolorymetrze Lange model VII przy zastosowaniu filtru zielonego. Faktyczne wyniki zawartości fruktozy określano z krzywej wzorcowej sporządzonej z roztworów standardowych. Celem obliczenia różnic między poszczególnymi metodami, jak również przy badaniu różnych stężeń stosowanych odczynników w poszczególnych etapach doświadczenia, obliczano średnie arytmetyczne, współczynniki zmienności i przeprowadzono analizę wariancji według Ruszczyca [16].

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych badań nad określaniem zawartości fruktozy metodą Manna, Kulki i Eibla przedstawiono w tabeli 1. Z danych tych wynika, że średnia zawartość fruktozy określana metodą Manna

Tabela 1

Zmiany w odczytach zawartości fruktozy określanej różnymi metodami

Miary statystyczne	Stosowane metody		
	Manna	Kulki	Eibla
n	30	30	30
$\bar{x}$ mg%	309,7	308,8	287,0
S	±5,3	±5,3	±4,7
V w %	1,71	1,72	1,63

wynosi 309,7 mg<sup>0</sup>/o; metodą Kulki 308,8 mg<sup>0</sup>/o, zaś metodą Eibla 287,0 mg<sup>0</sup>/o. Jak widać, zawartość fruktozy w nasieniu tryków określana metodą Manna była bardzo zbliżona do zawartości fruktozy określanej metodą Kulki. Metoda Eibla dawała nieco obniżone wyniki. Średnie odchylenie standardowe przy metodach Manna i Kulki jest jednakowe i wynosi  $\pm 5,3$ , natomiast przy metodzie Eibla jest nieco niższe i wynosi  $\pm 4,7$ . Przeprowadzona analiza wariancji nie wykazała statystycznie istotnej różnicy w zawartości fruktozy określanej tymi metodami.

Otrzymane wyniki w drugim etapie doświadczenia nad określaniem zawartości fruktozy przy zastosowaniu różnych stężeń rezorcyny przedstawiono w tabeli 2. Z danych tych wynika, że przy dodawaniu 0,1<sup>0</sup>/o

T a b e l a 2

Zmiany w odczytach zawartości fruktozy  
w zależności od różnych stężeń rezorcyny

Miary statystyczne	Stężenie rezorcyny	
	0,1%	0,05%
n	50	50
$\bar{x}$ mg%	256	259
S	$\pm 3,71$	$\pm 3,68$
V %	1,44	1,42

roztworu rezorcyny średnia zawartość fruktozy wynosiła 256 mg<sup>0</sup>/o, natomiast przy 0,05<sup>0</sup>/o zawartość ta wynosiła 259 mg<sup>0</sup>/o. Jest to różnica statystycznie nieistotna. W związku z tym stosowanie roztworu 0,1<sup>0</sup>/o lub 0,05<sup>0</sup>/o nie wpływa w sposób statystycznie istotny na wyniki odczytów. Warto podkreślić, że przy analizie 50 prób w 19 wypadkach wyniki były nieco wyższe przy zastosowaniu 0,05<sup>0</sup>/o roztworu w porównaniu do 0,01<sup>0</sup>/o roztworu rezorcyny, a w 16 były niższe, natomiast w pozostałych wypadkach były jednakowe.

Wyniki dotyczące trzeciego etapu doświadczenia, w którym określano wpływ różnych stężeń siarczanu cynku na zawartość fruktozy, ilustruje tabela 3. Z danych zawartych w niej widać, że średnia zawartość fruktozy przy 2<sup>0</sup>/o roztworze siarczanu cynku wynosiła 428 mg<sup>0</sup>/o; 4<sup>0</sup>/o — 425 mg<sup>0</sup>/o; 8<sup>0</sup>/o — 424 mg<sup>0</sup>/o, natomiast przy roztworze siarczanu cynku 6 i 10<sup>0</sup>/o była nieco wyższa i wynosiła 437 i 443 mg<sup>0</sup>/o. Różnice te są jednak statystycznie nieistotne.

W czwartym etapie doświadczenia przeprowadzono badania nad wpływem długości przechowywania standardowych prób fruktozy o stęże-

Tabela 3

Zmiany w odczytach zawartości fruktozy w zależności od różnych stężeń siarczanu cynku

Miary statystyczne	Stężenia siarczanu cynku				
	2%	4%	6%	8%	10%
n	56	56	56	56	56
$\bar{x}$ mg%	428	425	437	424	443
S V	±4,92	±5,21	±4,70	±5,24	±4,57
w %	1,14	1,22	1,07	1,21	1,03

niach 400, 200, 100 i 50 mg<sup>0</sup>/o na odczyty zawartości fruktozy przy zastosowaniu metody Manna i Kulki (tab. 4 i 5).

Z danych przedstawionych w tabeli 4 wynika, że przy stosowaniu metody Manna w próbach zawierających 400 mg<sup>0</sup>/o fruktozy różnica w odczytach w ciągu 48 godz przechowywania w temperaturze około 4°C wynosiła 7 jednostek (za jednostkę przyjęto umownie jedną kreskę wychylenia strzałki na podziałce galwanometru—kolorymetru), co w przeliczeniu z krzywej standardowej wynosi 70 mg<sup>0</sup>/o fruktozy. Taka sama różnica w jednostkach występowała przy badaniu prób zawierających 200 mg<sup>0</sup>/o fruktozy, lecz w przeliczeniu dawało to obniżenie odczytu zawartości fruktozy o 24 mg<sup>0</sup>/o. Natomiast przy zawartości fruktozy w próbach 100 i 50 mg<sup>0</sup>/o różnica ta wynosiła 4 jednostki, co w przeliczeniu dawało obniżenie wyników odczytów zawartości fruktozy o 24 i 16 mg<sup>0</sup>/o.

Przy badaniu metodą Kulki (tab. 5) nie stwierdzono zasadniczych zmian w odczytach zawartości fruktozy w czasie 48 godz przechowywania w temperaturze około 4°C, zaobserwowano nawet pewien wzrost wynoszący jedną jednostkę przy zawartości 400, 200 i 100 mg<sup>0</sup>/o fruktozy, co w przeliczeniu na faktyczną zawartość fruktozy wynosi 10, 8 i 4 mg<sup>0</sup>/o, natomiast przy zawartości fruktozy w próbce wynoszącej 50 mg<sup>0</sup>/o zaobserwowano minimalne obniżenie odczytu o jedną jednostkę, co w przeliczeniu na faktyczną zawartość fruktozy wynosi 4 mg<sup>0</sup>/o. Współczynniki zmienności wzrastały w miarę obniżania się stężenia fruktozy w próbce, tak przy określaniu metodą Manna, jak również Kulki. Wyniki dotyczące zmian w odczytach zawartości fruktozy w nasieniu tryków w czasie 48 godz przechowywania prób przy temp. około 4°C przedstawiono w tabeli 6.

Z danych tych wynika, że przy zastosowaniu metody Manna obserwuje się powolny spadek w odczytach zawartości fruktozy, który po

Tabela 4

Zmiany w odczytach prób standardowych fruktozy w czasie przechowywania określanych metodą Manna

Zawartość fruktozy w mg %	Czas przechowywania w temperaturze około 4 °C												Różnica w odczytach między wartością początkową a końcową	Prze- lenie na zawartość fruktozy w mg %								
	0				po 12 godz				po 24 godz						po 36 godz				po 48 godz			
	n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V			n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V
400	25	58	$\pm 1,8$	3,0	25	56	$\pm 1,3$	2,3	25	55	$\pm 1,3$	2,4	25	52	$\pm 2,4$	4,6	25	51	$\pm 2,2$	4,3	-7	-70
200	25	36	$\pm 1,3$	3,6	25	34	$\pm 1,2$	3,5	25	32	$\pm 1,2$	3,7	25	30	$\pm 1,2$	4,0	25	29	$\pm 1,3$	4,9	-7	-42
100	25	18	$\pm 2,5$	13,3	25	16	$\pm 2,0$	12,5	25	15	$\pm 1,6$	10,6	25	15	$\pm 1,4$	9,3	25	14	$\pm 1,1$	7,8	-4	-24
50	25	8	$\pm 2,5$	31,2	25	7	$\pm 1,8$	25,7	25	6	$\pm 1,3$	21,6	25	5	$\pm 1,4$	28,0	25	4	$\pm 1,1$	27,5	-4	-16

Zmiany w odczytach prób standardowych fruktozy w czasie przechowywania określanych metodą Kulki

Zawartość fruktozy w mg %	Czas przechowywania w temperaturze około 4 °C												Różnica w odczytach między wartością początkową a końcową	Przeliczenie na zawartość fruktozy w mg %								
	0			po 12 godz			po 24 godz			po 36 godz					po 48 godz							
	n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V			n	$\bar{x}$	S	V				
400	25	57	$\pm 4,3$	7,5	25	61	$\pm 3,9$	6,4	25	61	$\pm 4,0$	6,5	25	59	$\pm 3,8$	6,5	25	58	$\pm 3,7$	6,4	+1	+10
200	25	36	$\pm 4,1$	11,0	25	40	$\pm 5,2$	13,0	25	40	$\pm 4,5$	11,0	25	38	$\pm 3,8$	10,0	25	37	$\pm 3,8$	10,0	+1	+8
100	25	19	$\pm 4,3$	23,0	25	22	$\pm 3,8$	17,0	25	22	$\pm 3,5$	16,0	25	21	$\pm 3,3$	16,0	25	20	$\pm 3,6$	18,0	+1	+4
50	25	9	$\pm 4,3$	47,7	25	10	$\pm 3,6$	36,0	25	10	$\pm 3,4$	34,0	25	9	$\pm 2,8$	31,0	25	8	$\pm 3,5$	44,0	-1	-4

Tabela 6

Zmiany w odczytach zawartości fruktozy w nasieniu w czasie przechowywania prób określanych metodą Manna i Kulki

Stosowane metody	Czas przechowywania prób w temperaturze około 4 °C												Różnica między wartością końcową a początkową								
	0			po 12 godz			po 24 godz			po 36 godz				po 48 godz							
	n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V	n	$\bar{x}$	S	V		n	$\bar{x}$	S	V				
Manna	25	297	$\pm 4,3$	1,5	25	286	$\pm 4,5$	1,6	25	270	$\pm 5,0$	1,8	25	255	$\pm 5,2$	2,0	25	237	$\pm 4,9$	2,0	-60
Kulki	25	295	$\pm 5,2$	1,7	25	318	$\pm 5,4$	1,7	25	331	$\pm 5,8$	1,7	25	320	$\pm 5,6$	1,7	25	307	$\pm 5,0$	1,6	12

48 godz wynosi 60 mg<sup>0</sup>%, zaś przy metodzie Kulki następuje pewien ich wzrost wynoszący 12 mg<sup>0</sup>%. Bardzo charakterystycznym zjawiskiem jest fakt, że przy stosowaniu metody Kulki w odczytach zawartości fruktozy w czasie przechowywania 12 i 24 godz następuje większy ich wzrost w porównaniu do próby początkowej (0) niż przy odczytach prowadzonych po 36 i 48 godz przechowywania.

Należy podkreślić, że zmiany zachodzące w odczytach zawartości fruktozy przy przechowywaniu prób w czasie 48 godz i określaniu metodą Manna i Kulki były prawie identyczne tak przy stosowaniu prób standardowych fruktozy, jak i przy użyciu nasienia.

Reasumując powyższe badania można stwierdzić, że określanie zawartości fruktozy metodami podanymi przez Manna, Kulkę i Eibla daje bardzo zbliżone wyniki, a powstające różnice są statystycznie nieistotne. Przy prowadzeniu odczytów kolorymetrycznych po 24 czy też po 48 godz od momentu wykonania prób lepiej jest stosować metodę Kulki, gdyż nie wpływa ona na zmiany odczytów w zawartości fruktozy, co obserwuje się przy użyciu metody Manna. Użycie roztworu rezorcyny 0,05<sup>0</sup>% lub 0,1<sup>0</sup>% oraz różnych stężeń siarczanu cynku (2, 4, 6, 8, 10<sup>0</sup>%) nie powoduje istotnych zmian w odczytach zawartości fruktozy.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Boryczko Z.: *Medycyna Wet.* 1, 30, 1966.
2. Bielański W.: *Rozród zwierząt.* PWRiL, Warszawa 1972.
3. Ehlers M. H., Flerchinger F., Erb R. E.: *J. Dairy Sci.*, 36, 1020, 1953.
4. Eibl K.: *Lehrbuch der Rinderbesamung.* Berlin—Hamburg, 1959.
5. Gassner F. X., Hill H. J., Sulzberger L.: *Fert. Steril.*, 3, 121, 1952.
6. Glover T. D.: *J. Endocr.*, 13, 325, 1956.
7. Hopwood M. L., Rutherford E. R., Gassner F. X.: *J. Dairy Sci.*, 39, 51, 1956.
8. Kastyak L.: I Symp. Sekcji Niepłodności Pol. Tow. Gin. Lublin, Ref. 37, 229, 1963.
9. Kastyak L.: *Zesz. probl. Post. Nauk roln.*, 95, 203, 1970.
10. Kastyak L., Strzeżek J.: *Zesz. probl. Post. Nauk Roln.*, 95, 221, 1970.
11. Mann T.: *J. Agric. Sci.*, 38, 323, 1948.
12. Mann T., Walton A.: *J. Agric. Sci.*, 43, 343, 1953.
13. Mann T.: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract,* London—New York, 1964.
14. Parez N., Reoue J. P.: *C. r. Acad. France*, t. 43, 5, 268, 1957.
15. Pater K.: *Zesz. probl. Post. Nauk roln.*, 31, 173, 1961.
16. Ruszczyc Z.: *Metodyka doświadczalnictwa zootechnicznego.* PWRiL Warszawa, 1955.
17. Siemakov W. G.: *Wsiesojuznyj naucznoisledowatielskij Institut Żiwotnowodstwa (WIZ)*, 229, 322, 1966.
18. Tulczyński M.: *Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej.* Praca zbiorowa pod redakcją M. Tulczyńskiego. Warszawa, 1962.



*Леслав Кастыак, Анна Космачевска*

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ОПРЕДЕЛЕНИЕМ  
РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ СОДЕРЖАНИЯ ФРУКТОЗЫ В СЕМЕНИ БАРАНОВ

Резюме

В работе сделано сравнительные исследования над тремя основными методами определения содержания фруктозы: Манна, Кульки и Еибля, как тоже изучено, влияют ли разные концентрации резорцин и сульфата цинка а также периоды консервирования проб на изменения колориметрических отсчётов содержания фруктозы.

Полученные результаты доказывают, что:

1) определение содержания фруктозы методом Манна и Кульки даёт очень похожие результаты, в место этого при методе Эибля являются они немного меньшими,

2) употребление раствора 0,05% или 0,1% резорцины не вызывает существенных изменений в отсчётах содержания фруктозы,

3) разные концентрации сульфата цинка (2, 4, 6, 8 и 10%) не влияют на изменения отсчётов содержания фруктозы,

4) при применении метода Кульки время хранения проб до 48 часов в темп. около 4°C не влияет принципиально на изменения отсчётов в содержании фруктозы. Вместо того при методе Манна указано некоторое снижение в колориметрических отсчётах фруктозы во время хранения проб.

*Lesław Kastyak, Anna Kosmaczewska*

COMPARATIVE STUDIES ON THE DIFFERENT METHODS  
OF FRUCTOSE CONTENT ESTIMATION IN THE SEMEN OF RAMS

Summary

Comparative investigations on three basic methods Mann, Kulka and Eibel, on the estimation of fructose content were carried out in this paper, as well as the problem of the influence of different rezorcine and  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  concentrations and periods of sample preservation on changes in colorimetric readings of fructose content.

The obtained results showed that:

1) determination of fructose content following Mann and Kulka methods gave very similar results, whereas by Eibel method they were somewhat lower,

2) the use of 0.05% or 0.1% rezorcine solution did not cause significant changes in fructose content readings,

3) different  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  concentrations (2, 4, 6, 8 and 10%) have no influence on colorimetric readings of fructose content,

4) applying Kulka's method the time of sample preservation upto 48 hours in temperature about 4°C has no significant influence on changes in readings of fructose content. Whereas following Mann's method a certain decrease in colorimetric readings of fructose during sample preservation was found.

*Doc. dr Lesław Kastyak*  
*Instytut Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt*  
*Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie*  
*Zakład Zoohigieny*  
*Olsztyn-Kortowo*