

R. Gondko, M. Adamska, Z. Helszer, A. Zgierski

BEZPOŚREDNIE OZNACZENIE FOSFORU
W ZWIĄZKACH LIPIDOWYCH HEMOLIMFY I SUROWICY RAKÓW

W hemolimfie i surowicy dwu gatunków raków *Astacus leptodactylus* i *Orconectes limosus* oznaczono zawartość fosforu lipidowego, wykorzystując w tym celu bezpośrednią metodę Raheja oraz metodę Bartletta. W postępowaniu analitycznym obu metod wprowadzono zmiany, które uprościły tok oznaczenia. Gatunek rodzimy *Astacus leptodactylus* charakteryzował się znacznie wyższą zawartością (ok. 5x) fosforu lipidowego.

Wstęp

Ograniczenie wielkości badanych prób do mikroilości jest obecnie powszechną zasadą nowych opracowań analitycznych. Dotyczy to w szczególności trudno dostępnego materiału biologicznego. Tym samym proponowane rozwiązania analityczne musi charakteryzować zwiększona czułość i precyzja. Do dyspozycji mamy obecnie różne metody, w których ilość materiału do oznaczeń nie przekracza 0,05 ml płynu czy kilku mikrogramów osadu [2, 3, 5, 6, 8, 9]. W pracy niniejszej użyto dwóch metod do oznaczania fosforu lipidowego w hemolimfie i surowicy raków. Metodę Raheja [7] pozwalającą na bezpośrednie oznaczenie fosforu, z pominięciem mineralizacji materiału organicznego, porównano z powszechnie używaną do oznaczeń fosforu nieorganicznego metodą Bartletta [1].

W obu przypadkach w stosunku do oryginalnego postępowania wprowadzone zostały niewielkie zmiany, co usprawniało i zwiększyło czułość oznaczenia.

Materiał i metody

Analizie poddano hemolimfę i surowicę dwu gatunków raków: *Astacus leptodactylus* i *Orconectes limosus*. Związki lipidowe ekstrahowano na gorąco za pomocą mieszaniny chloroform-metanol 2 : 1 [4]. W tym celu do próbki zawierającej 3 ml mieszaniny ekstrakcyjnej dodawano 0,05 lub 0,1 ml hemolimfy. Roztwór w próbce ogrzewano do wrzenia na łaźni wodnej. Energiczne mieszanie zapobiega przegrzaniu cieczy. Ciecz po odwirowaniu rozdzielono w równych ilościach do kolbki Kjeldahla (metoda Bartletts) oraz do próbki (metoda Raheja). Ekstrakcję powtórzono, a w połączonych roztworach po odparowaniu do sucha oznaczono zawartość fosforu.

Surowicę otrzymywano przez wykrzepienie hemolimfy i odwirowanie skrzepu.

a. Metoda Bartlette

Warunkiem uzyskania powtarzalnych wyników jest utrzymanie odpowiedniej kwasowości w momencie redukcji czterotrójmolibdenianofosforanu amonu do błękitu molibdenowego. W naszym postępowaniu zarówno do mineralizacji jak i uzyskania odpowiedniej kwasowości używano tylko 5 M H_2SO_4 . Stosowano ponadto wskaźnik p-nitrofenol, a całość próbki zmniejszono do objętości 5 ml.

Do kolbki Kjeldahla zawierającej badaną próbę dodawano 1,8 ml 5 M H_2SO_4 i na łaźni piaskowej przez 3 h prowadzono mineralizację. Kontynuowano spalanie przez 1,5 h po dodaniu 5 kropli H_2O_2 . Po ostudzeniu do kolbki wprowadzono kroplę p-nitrofenolu, a próbę zobojętniono stężonym amoniakiem do pojawienia się lekko żółtego zabarwienia. Następnie dodawano 0,5 ml 5 M H_2SO_4 oraz 0,2 ml 5% molibdenianu amonu i 0,2 ml eikonogenu (odczynnik Fiske-Subbarowa). Całość uzupełniono wodą do 5 ml. Wywołanie barwy niebieskiej następowało w trakcie gotowania na łaźni wodnej przez 10 min. Wartości absorbancji odczytywano na spektrofotometrze Pye-Unicam przy 690 nm.

Przygotowanie eikonogenu: 12 g $Na_2S_2O_5$ (pirosiarczyn sodu), 0,25 g eikonogenu ($C_{10}H_8NNaO_4 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$), 1,2 g Na_2SO_3 (siarczyn sodu), uzupełnić do 100 ml wodą destylowaną.

b. Metoda Raheja

W metodzie Raheja oznaczenie fosforu w związkach lipidowych następuje bezpośrednio z pominięciem etapu ich mineralizacji. Reagując z odczynnikiem kompleksującym fosfor tworzy połączenie barwne, którego natężenie mierzymy przy 710 nm. Również w tej metodzie zmniejszono objętość próbki (2,5 ml).

Do probówki zawierającej osad związków lipidowych dodaje się 0,4 ml chloroformu o 0,1 ml odczynnika kompleksującego D. Równolegle należy sporządzić próbę kontrolną (0,4 ml chloroformu + 0,1 ml odczynnika kompleksującego). Probówki następnie umieszcza się we wrzącej łaźni wodnej na okres 1-1,5 min. Po ostudzeniu próbę uzupełnia się do 2,5 ml chloroformem, łagodnie mieszając.

Po rozdzieleniu faz należy ostrożnie ściągnąć warstwę chloroformową pipetką i w razie konieczności odwirować. Odczytać wartość absorbancji przy 710 nm wobec próby kontrolnej.

Odczynnik kompleksujący D

Sporządzenie odczynnika kompleksującego należy dokonać w opisanej niżej kolejności. Odczynnik ten jest trwały przez 3 miesiące przy przechowywaniu w temp. 5°C w ciemnej butelce.

Roztwór A - rozpuścić 2 g molibdenianu amonu w 15 ml H₂O dest.

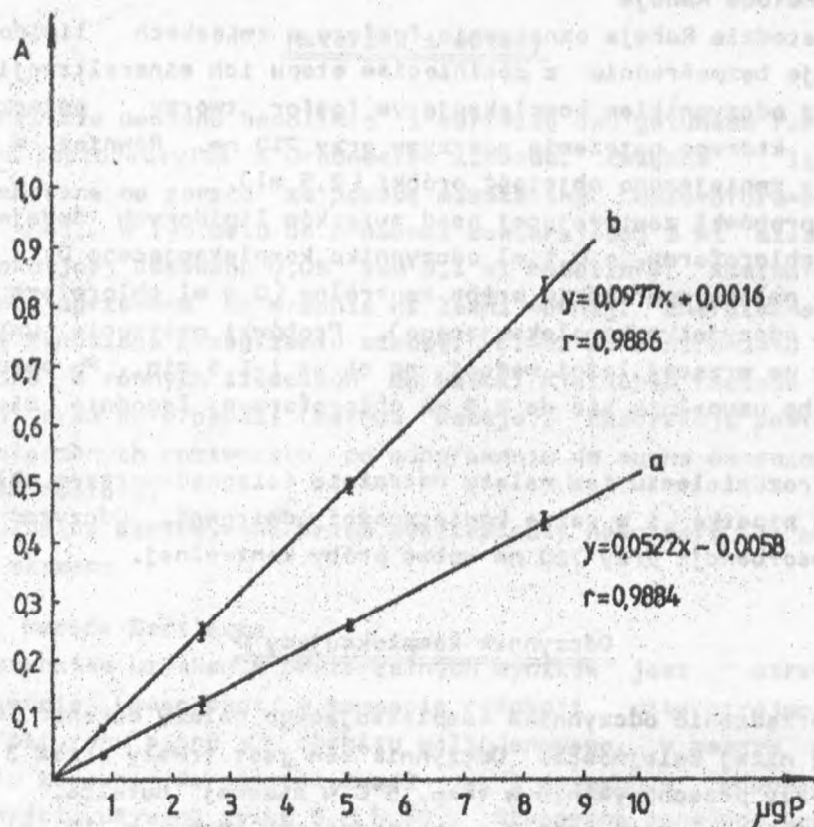
Roztwór B - mieszać przez 30 min. 5 ml stężonego kwasu solnego z 1,25 ml rtęci i 10 ml roztworu A, a następnie przesączyć.

Roztwór C - do pozostałych 5 ml roztworu A dodać ostrożnie 25 ml stężonego H₂SO₄ i połączyć z roztworem B.

Roztwór D - do 22,5 ml metanolu dodać 2,5 ml chloroformu, 10 ml H₂O i 12,5 ml roztworu C. Otrzymujemy w ten sposób barwny odczynnik kompleksujący.

Wykonanie krzywej wzorcowej

Krzywą wzorcową w zakresie 0,8-10 µg P w próbce sporządzono z roztworu wzorcowego fosfatydylocholiny (Sigma). Do wykreślenia krzywej z co najmniej 4 odpowiednich stężeń P wykorzystano metodę najmniejszych kwadratów (rys. 1).



Rys. 1. Krzywa wzorcowa do oznaczania fosforu
a) metodą Raheja; b) metodą Bartletta

Calibration curves for phosphorus determination
a) the method of Rahej; b) the method of Bartlett

Wyniki i dyskusja

W przypadku obydwu metod istniała wysoka korelacja pomiędzy użytymi stężeniami a wartościami absorbancji (rys. 1). Jednocześnie stwierdzono, że w stosowanych warunkach, tj. przy różnych końcowych objętościach roztworu, za pomocą metody Raheja możliwe jest oznaczenie około dwukrotnie mniejszej ilości fosforu w próbce. (Niepowodzeniem zakończyły się próby prowadzące do analogicznego zmniejszenia końcowej objętości roztworu w metodzie Bartletta, tj. do 2,5 ml).

Tabela 1

Zawartość fosforu lipidowego w hemolimfie
i surowicy *Orconectes limosus*

The content of lipid phosphorus
in *Orconectes limosus* hemolymph and serum

Płeć	Osobnik	Hemolimfa (mg/100 ml)		Surowica (mg/100 ml)	
		metody			
		Raheja	Bartletta	Raheja	Bartletta
♂	1	2,20	3,00	1,40	1,80
	2	2,96	2,90	1,82	1,80
	3	1,50	1,90	0,64	0,70
	4	1,92	1,90	0,72	0,70
	$\bar{x} \pm s$	2,15 $\pm$ 0,61	2,43 $\pm$ 0,61	1,15 $\pm$ 0,56	1,25 $\pm$ 0,64
	W	28%	25%	49%	51%
♀	1	1,20	1,40	0,94	0,80
	2	0,86	0,70	0,59	0,50
	3	1,48	1,50	1,31	1,20
	4	1,90	1,90	1,26	1,20
	$\bar{x} \pm s$	1,36 $\pm$ 0,44	1,38 $\pm$ 0,50	1,03 $\pm$ 0,33	0,93 $\pm$ 0,34
	W	32%	36%	32%	37%

Ilość próby (0,05 lub 0,1 ml hemolimfy i surowicy) brana do wykonania oznaczenia okazała się całkowicie wystarczająca w przypadku obu metod.

Tabela 1 prezentuje dane dotyczące pojedynczych osobników, u których oznaczono zawartość fosforu w hemolimfie i surowicy *Orconectes limosus*, równolegle metodą Raheja i metodą Bartletta. (Wartości średnie z 3 równoległych oznaczeń). Wysoka wartość współczynnika zmienności (W) uwarunkowana jest dużą zmiennością osobniczą.

Porównanie otrzymanych wyników za pomocą testu F wykazało, że obie metody są jednakowo odtwarzalne.

Takie samo postępowanie zastosowano dla osobników z gatunku *Astacus leptodactylus*, a uzyskane wartości zamieszczono w tab. 2.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że gatunek *Orconectes limosus* charakteryzuje się niskimi wartościami fosforu lipidowego w

Tabela 2

Zawartość fosforu lipidowego w hemolimfie
i surowicy *Astacus leptodactylus*

The content of lipid phosphorus
in *Astacus leptodactylus* hemolymph and serum

Płeć	Liczba osobników	Hemolimfa (mg/100 ml)		Surowica (mg/100 ml)	
		metody			
		Raheja	Bartlettta	Raheja	Bartlettta
♂	n = 7				
	$\bar{x} \pm s$	11,34 $\pm$ 5,17	11,56 $\pm$ 3,60	8,68 $\pm$ 1,21	8,50 $\pm$ 0,92
	W	46%	31%	14%	11%
♀	n = 4				
	$\bar{x} \pm s$	8,05 $\pm$ 1,14	8,70 $\pm$ 0,96	6,07 $\pm$ 1,04	6,68 $\pm$ 1,52
	W	14%	11%	17%	23%

hemolimfie i surowicy w porównaniu z *Astacus leptodactylus*. Zjawisko to zaobserwowano w przypadku obu płci. Obecność tak znacznych różnic między obu gatunkami jest niezrozumiała. Być może ma to związek ze sposobem odżywiania tych zwierząt. Gatunek *Orconectes limosus* był znacznie dłużej przetrzymywany w warunkach stresowych (głodzenie).

Z uzyskanych danych wynika, że obie metody mogą być stosowane przy oznaczaniu fosforu organicznego. Ze względu jednak na fakt, że metoda Raheja pozwala uniknąć czasochłonnego i kłopotliwego procesu mineralizacji próbek, jest ona w tym wypadku bardziej użyteczna i godna zalecenia.

LITERATURA

- [1] Bartlett G. R., J. Biol. Chem. 234, 466 (1959).
- [2] Fiske C. H., Subbarow V., J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- [3] Filipowicz B., Gniazdowski M.,

- Więckowski W., Biul. Woj. Akad. Med. III, 145 (1960).
- [4] Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H., J. Biol. Chem. 226, 497 (1957).
- [5] Krajewski T., Urbanek H., Zesz. Nauk. Uł, Ser. II, 31, (1961).
- [6] Lowry R. R., Tinsley I. J., Lipids 9, (1974).
- [7] Raheja R. K., Kaur C., Singh A., Bhatia I. S., J. Lipid. Res. 14, 695 (1973).
- [8] Waskowski R., Kosticki B., J. Lipid. Res. 9, 396 (1968).
- [9] Zgirski A., Pol. Tyg. Lek. 5, 171 (1965).

Laboratorium Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Łódzkiego

R. Gondko, M. Adamska, Z. Helzer, A. Zgirski

DIRECT DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN LIPID COMPOUNDS OF CRAYFISH HEMOLYMPH AND SERUM

The content of lipid phosphorus was determined in the hemolymph and serum of two crayfish species: *Astacus leptodactylus* and *Orconectes limosus*. Two methods of estimation were employed in parallel: the method of Raheja enabling direct determination of phosphorus without mineralization and the method of Bartlett for determination of inorganic phosphorus. Slight modifications were introduced into both procedures, enhancing reproducibility and, indirectly, sensitivity.

Orconectes limosus was found to have a much lower content of lipid phosphorus than *Astacus leptodactylus*, both in hemolymph (2.15 vs 11.34 mg%) and in serum (1.15 vs. 8.68 mg%).