

PŮVODNÉ OZNÁMENIA

POZNÁMKA K URČOVANIU TOTÁLNYCH FOSFOLIPIDOV*

T. R. NIEDERLAND, R. J. DZÚRIK, P. K. KOVÁCS, J. MACHOVÁ-KARFÍKOVÁ
Ústav pre všeobecnú a klinickú biochémiu Lekárskej fakulty Univerzity Komenského
v Bratislave

Fosfolipidy v prečistenom extrakte môžeme zisťovať viacerými spôsobmi, ktoré sme rozviedli v predchádzajúcej práci [1]. Tu sme došli aj k záveru, že pre zisťovanie fosfolipidov najlepšie sa hodia metódy založené na stanovení množstva fosforu.

Fosfor môžeme zisťovať viacerými spôsobmi. Z veľkého množstva metód v literatúre najopodstatnejšími sa nám ukázali tieto metódy:

1. metóda C. H. Fiskeho a Y. Subbarowa [2] v modifikácii C. P. Stewarta a E. B. Hendryho [3],
2. metóda O. H. Lowryho a spolupracovníkov [4],
3. metóda R. D. Bella a F. A. Doisyho [5] v modifikácii V. Jirgla [6],
4. metóda R. H. Tausskej a E. Shorra [7]. Táto metóda sa hodí len pre určovanie anorganických solí kyseliny fosforečnej. Vyskúšali sme ju jednak v originálnej úprave, jednak sme sa ju pokúsili upraviť aj pre určenie lipidickej kyseliny fosforečnej úpravou pH prostredia.

Metóda

S uvedenými metódami sme pracovali podľa návodov autorov. Metódu Lowryho a spolupracovníkov sme nepoužili v mikromodifikácii, ale v makromodifikácii. Túto možnosť uvádzajú aj autori pri prísnom zachovaní všetkých vzájomných pomerov reagensii.

Výsledky sme odčítali na Langeho fotometri M-IV, ktorého citlivosť sme zvýšili pripojeným zrkadlovým galvanometrom. Použili sme filter 625 m μ .

Vyhodnocovali sme:

1. *rozptyl metodiky*, ktorý sme vyjadrili smerodajnou odchýlkou;
2. *percento spät získanej kyseliny fosforečnej*. Upustili sme od pridávania lecitínu, pretože ani najčistejšie dnes izolovateľné lecitínové preparácie získané chromatograficky nie sú homogénne a nezodpovedajú teda stechiometrickým pomerom [8]. Okrem toho aj pridávanie lecitínu je určitým zjednodušením;
3. *jednotlivé metódy* sme porovnali na tom istom extrakte. V tomto prípade sme porovnávali aj metódu určovania fosfolipidov stanovením ich masných kyselín [9]. Masné kyseliny sme zisťovali metódou E. Kaiserovej a B. M. Kagana [10];

* Prednesené na I. celoštátnom pracovnom sjazde lekárskeho chemikov v Plzni v máji 1955.

4. *vztah prírastku extinkcie ku zmene koncentrácie kyseliny fosforečnej.* Je výhodné použiť toto kritérium pri kolorimetrických metódach. V niektorých prípadoch je síce obmedzované potrebami praxe, ktorá vyžaduje širšie pracovné rozpätie metódy. Pri vyšetrovaní fosfolipidov stačí však aj užší koncentračný rozsah použitia metód, a preto toto kritérium možno použiť.

Výsledky

Získané výsledky sú zhrnuté v tab. 1.

Tabuľka 1

metóda	I			II		III			IV
	n	M v γ fosforu	σ v γ fosforu	n	% späť získané- ho fosforu	n	% fos- folipidov	% vo vzťahu k Ste- wart- Hendr.	E/10 γ
Stewart- Hendry	10	13,5	0,226	15	100,5	5	2,80	100	0,31
Jirgl	10	12,8	0,306	15	102,0	5	2,83	101	0,10
Lowry a spol.	9	19,1	0,215	14	98,0	5	2,90	104	0,37
Taussky a a Shorr (orig.)	9	9,7	0,156	—	—	—	—	—	0,11
Taussky a Shorr (upravené)	8	13,1	0,452	—	—	—	—	—	—
Kaiser-Kagan	—	—	—	—	—	5	2,49	89	—

n = počet členov

M = aritmetický priemer

σ = smerodajná odchýlka

% fosfolipidov je prepočítané násobením hodnoty fosforu koeficientom 25

1. *Rozptyl metódi:* Výsledky uvádzame v I. stĺpci tabuľky. Najvýhodnejšou sa nám ukázala metóda R. H. Tausskej a E. Shorra. Metóda O. H. Lowryho a spolupracovníkov a metóda E. B. Hendryho a C. P. Stewarta sú asi rovnocenné. Ostatné metódy sú horšie. Metóda R. H. Tausskej a E. Shorra je síce najvýhodnejšia pre stanovenie anorganických solí kyseliny fosforečnej, nehodí sa však na určenie lipidickej kyseliny fosforečnej, pretože silne kyslá reakcia prostredia, potrebná pre spaľovanie vzorky, ruší vznik farebnej reakcie. Preto sme sa pokúsili vzhľadom na malý pracovný rozptyl upraviť reakciu prostredia neutralizáciou alebo tlmením octanom sodným. Ako z tabuľky vidieť, takto upravená metóda má zle reprodukovateľné výsledky. V ďalšom sme od jej vyhodnotenia upustili.

2. *Percento späť získanej kyseliny fosforečnej:* Výsledky zachycuje II. stĺpec tabuľky. Najvýhodnejšou sa ukázala metóda C. P. Stewarta a E. B. Hendryho.

3. *Vyšetrenie toho istého extraktu*: Výsledky sú zhrnuté v III. stĺpci tabuľky. Najnižšie výsledky dávala metóda určujúca fosfolipidy cez masťné kyseliny (11 % nižšie v porovnaní s metódou C. P. Stewarta a E. B. Hendryho). Tieto výsledky získané na pečeni kráľika sú veľmi blízke výsledkom Artomovým a Fishmanovým [11], ktorí na ich základe postavili požiadavku nového prepočítavacieho koeficienta. Ostatné metódy dávali vyššie výsledky, čo možno vysvetliť vplyvom iných látok. Je známe, že pri týchto metódach sú pre vznik nešpecifických a rušivých farebných reakcií väčšie predpoklady ako pri metóde Stewartovej a Hendryho [1, 12, 2].

4. *Porovnanie vzťahu $\Delta E/\Delta[P]$* : Výsledky podávame v IV. stĺpci tabuľky. Najvýhodnejšou sa javí metóda Lowryho a spolupracovníkov. Jej veľmi blízka je metóda Stewartova a Hendryho.

Súhrn

1. Porovnali sme metódy stanovenia totálnych fosfolipidov, ktoré na základe teoretických odôvodnení a výsledkov rozličných autorov sa ukázali najspoločnejšími.

2. Na základe použitých kritérií za najvhodnejšiu zo skúmaných metód na vyšetrovanie totálnych fosfolipidov v tkanivách považujeme metódu C. H. Fiskeho a Y. Subbarowa v modifikácii C. P. Stewarta a E. B. Hendryho.

3. Pre vyšetrenie solí kyseliny fosforečnej výhodnejšia je metóda R. H. Tausskej a E. Shorra.

4. Pri stanovení fosfolipidov v pečeni kráľika metódou založenou na určení množstva masťných kyselín dostali sme o 11 % nižšie výsledky než pri ich stanovení metódou založenou na určení množstva fosforu. Toto naše zistenie je v súhlase so zisteniami C. Artoma a V. H. Fishmana, získanými na pečeni krysy, a tieto ich zistenia dopĺňa.

Ďakujeme E. Pappovej za technickú spoluprácu.

ЗАМЕТКА К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОБЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ

Т. Р. НИЕДЕРЛАНД, Р. Я. ДЗУРИК, П. К. КОВАЧ, Я. МАХОВА-КАРФИКОВА
Институт общей и клинической биохимии Медицинского факультета университета
имени Коменского в Братиславе

Выводы

Мы сравнивали методы определения общих фосфолипидов, которые на основании теоретических обоснований и результатов разных авторов оказались достоверными.

2. На основании примененных критериев полагаем из испытанных методов за самый подходящий для исследования общих фосфолипидов в тканях метод Фiskeго и Суббарова, в модификации Стewарта и Хендри.

3. Для исследования солей фосфорной кислоты более выгодными методами являются методы Таусской и Шорра.

4. При сравнении методов исследования фосфолипидов, определением количества фосфора и определением количества жирных кислот, мы получили результаты на 11 % ниже, при исследовании печени кролика, что является согласованным с результатами Артрома и Фишмана и служит дополнением их результатов, полученных при исследовании печени крыс.

Поступило в редакцию 21. X. 1955 г.

BEMERKUNG ZUR BESTIMMUNG DER TOTALEN PHOSPHOLIPIDE

T. R. NIEDERLAND, R. J. DZÚRIK, P. K. KOVÁCS, J. MACHOVÁ-KARFÍKOVÁ
Institut für allgemeine und klinische Biochemie der Medizinischen Fakultät an der
Komenský-Universität in Bratislava

Zusammenfassung

1. Die Autoren verglichen die Methoden der Bestimmung der totalen Phospholipide, welches sich auf der Grundlage theoretischer Begründungen und Ergebnissen verschiedener Autoren als am verlässlichsten zu sein gezeigt haben.

2. Auf der Basis der benützten Kriterien aus den geprüften Methoden betrachten die Autoren als vorteilhafteste Methode zur Untersuchung der totalen Phospholipide in Geweben die Methode von Fiske und Subbarow, u. zw. in der Modifikation von Stewart und Hendry.

3. Für die Untersuchung von Salzen der Phosphorsäure ist die vorteilhafteste in dieser Methodik die Methode von Taussky und Shorr.

4. Durch Vergleich der Methoden der Feststellung von Phospholipiden durch Bestimmung der Phosphormenge und durch Bestimmung der Menge an Fettsäuren erhielten die Autoren durch die Methode über die Fettsäuren um 11 % niedrigere Ergebnisse, u. zw. bei ihrer Untersuchung in der Kaninchenleber, was in Übereinstimmung mit den Befunden von Artom und Fishman steht, die sie in der Rattenleber gewonnen haben, wobei diese Befunde durch die Arbeiten der Autoren ihre Ergänzung gefunden haben.

In die Redaktion eingelangt den 21. X. 1955

LITERATÚRA

1. Niederland T. R., Dzúrik R. J., Kovács P. K., Machová-Karfíková J., (v tlači). 2. Fiske C. H., Subbarow Y., J. biol. Chem. 66, 375 (1925). 3. Stewart C. P., Hendry E. B., Biochem. J. 29, 1683 (1935). 4. Lowry O. H., Roberts N. R., Leiner K. V., Wu M. L., Farr A. L., J. biol. Chem. 207, 1 (1954). 5. Bell R. D., Doisy F. A., J. biol. Chem. 44, 55 (1920). 6. Jirgl V., nepublikované údaje. Podľa ústneho oznámenia dr. Komárkovej. 7. Taussky R. H., Shorr E., J. biol. Chem. 202, 675 (1953). 8. Klenk E., Gehrman G., Z. physiol. Chem. 292, 110 (1953). 9. Niederland T. R., Kovács P. K., Dzúrik R. J., Macho L. (v tlači). 10. Kaiser E., Kagan B. M., Analyt. Chem. 23, 1879 (1951). 11. Artom C., Fishman W. H., J. biol. Chem. 148, 405 (1943). 12. Davies D. R., Davies W. C., Biochem. J. 26, 2046 (1932).

Došlo do redakcie 21. X. 1955