КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 634.835+771.531

Ф. ШАМПАНЬОЛ, М. В. МЕЛКОНЯН

ФОТОДЕНСИТОМЕТРИЯ В РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОХИМИИ

Применение распределительной хроматографии на бумаге, на тонком слое целлюлозы или электрофорез позволяют выявить множество компонентов биохимического состава растительного сырья. На этой основе с помощью фотоденситометрии с легкостью можно определить количественное содержание множества соединений, в том числе сахаров, органических кислот, аминокислот, полифенолов и т. д. [1, 2, 5].

Ценность этой методики заключается, с одной стороны, в ограниченном размере необходимой для анализа пробы, с другой — в быстроте определений, что в целом обуславливает целесообразность ее применения.

Фотоденситометрическое определение может быть успешным только в том случае, когда хроматографическое разделение полное и качественное: фон гомогенный, а пятна выделены хорошо и контрастны. Это легче достигается на тонкослойных стеклянных пластинках, чем на бумаге. Хорошие результаты получаются при электрофорезе.

Если фотометрия измеряет прохождение света через вещество или гомогенный раствор, фотоденситометрия проводит это измерение через твердое тело, молекулы которого размещены гетерогенно.

Фотоденситометр включает: источник света, камеру с фотомультипликатором, самопишущий прибор — интегратор, чертящий «пики», площадь которых более или менее пропорциональна количеству анализируемого вещества.

Аппарат интегрирует в общее показание последовательно измеряемую оптическую плотность в каждой точке пластинок, которые поочередно располагаются относительно источника света*.

Применение фотоденситометрической техники для количественных определений основывается на том, что рассмотренное вещество подчиняется основному закону абсорбции (закон Бера-Ламбера), который гласит, что оптическая плотность (О. П.) анализируемого вещества должна быть пропорциональной числу пройденных молекул:

$$\text{О. П.} = \frac{I_0}{I} = E \cdot \Pi.,$$

где I_0 — случайная световая интенсивность; I — переданная световая интенсивность; E — специфический коэффициент затухания; Π — число пройденных молекул.

* Фотоденситометрия может быть применена в абсорбции или в светопрооницаемости, в отражении или в флуоресценции. Здесь мы рассматриваем только абсорбцию.

Способ действия. На пластинку с тонким слоем целлюлозы размером 20×20 см наносят пять пятен длиной 15—20 мм. Для этой цели можно использовать микропипетку или капиллярную трубку строго определенной длины. Однако лучшие результаты могут быть получены с помощью микрошприца, действующего принудительной эжекцией капель, что позволяет избежать контакта со слоем целлюлозы.

На два пятна, расположенные по краям пластинки, и на одно, находящееся посередине, воздействуют раствором — эталоном с известным составом и содержанием, а на два других пятна — анализируемым раствором. Это делается для того, чтобы несколько сгладить случайные флуктуации и достичь более высокой точности.

Затем приступают к осуществлению фотоденситометрии каждого пятна и ведению записи для каждого пика соответствующего пятна.

Лучшие результаты получаются, если фотометрическое определение проводить через день, а не сразу, так как пятна на пластинке наилучшую интенсивность имеют именно в это время.

Площадь пика пропорциональна концентрации. Соотнеся площадь пика анализируемого раствора к площади того же пика раствора-этало-на, получают искомую концентрацию. Так, например, искомое содержание винной кислоты красного вина равно $\frac{38}{63} \times 50 = 30,2$ эквив./л.,

так как площадь пика эталона составляет 63 ед., площадь пика вина — 38 ед., а раствор-эталон содержит 50 эквив./л. (оба раствора используют в одном и том же объеме — 20 мл).

Зачастую хроматография не обеспечивает искомую гомогенную основу — линия основы получается негоризонтальной, вследствие чего аппарат вовлекает в определения лишние отрезки площади пластинки, и данные получаются недостоверные, завышенные. В таком случае площадь каждого пика можно определить с помощью планиметрии или взвешиванием после разрезания.

При определении различных соединений для получения максимального контраста используют фильтры, приложенные к аппарату, которые в определенной мере ограничивают ширину спектра, излучаемого источником. К примеру, при проявлении на анилиновой основе можно использовать фильтр Враттена 47 Б.

Все эти операции очень быстрые. Фотоденситометрическое исследование пластинки двумя образцами и тремя растворами — эталонами — требует всего нескольких минут.

Для определения концентрации пятен из существующих аппаратур наибольшее применение имеют денситометры, такие, как фотометр-интегратор-регистратор Вернона¹, фотоденситометр Джойса-Лейбла, тип Хромоксон² и др. Среди них наиболее усовершенствованным, быс-

¹ Изготавливается учреждением «Вернон», — Франция, ул. Эд. Трамлей, 5.

² Изготавливается учреждением «Джойс-Лейбл» — Франция, Сюрсен, ул. Вердена, 75.

тым и точным является «ВИТАТРОН» ТЛД-100³. Он сконструирован специально для количественной оценки неправильных по форме структур двумерного сечения, т. е. именно таких, какие возникают при тонкослойной хроматографии, хроматографии на бумаге или электрофорезе высокого вольтажа. Кроме того, прибором точно определяются фотографируемые пятнистые или линейные очертания.

Достоверность результатов фотоденситометрии варьирует в пределах $\pm 8\%$. Как и в каждом микрометоде, эта точность может быть сильно искажена вмешательством разного рода причин, которые подробно рассмотрены в исследованиях Шелларда [3], а также Ферберна и Ральфа [4].

Таким образом, при наличии высококачественных хроматограмм на тонкослойных пластинках или на бумаге, а также электрофореза высокого вольтажа фотоденситометрия является наиболее универсальным, достаточно точным и очень быстрым методом для количественных определений различных компонентов растительного сырья.

Такие универсальные экспресс-методы с большой производительностью особенно нужны для селекционеров: гибридологический анализ биохимического состава большого экспериментального материала почти не возможен с помощью существующих методов, специализированных для определения либо качественного, либо количественного состава того или иного компонента. Кроме того, они не отличаются быстротой операций. Между тем при работе с большим селекционным фондом быстрота определений с надежной точностью зачастую становится главным фактором.

Национальный институт Агрономических исследований Франции
 Научно-исследовательский институт
 виноградарства, виноделия и плодоводства
 МСХ АрмССР

Посупило 10.II 1974 г.

Ֆ. ՇԱՄՊԱՆՅՈՒ, Մ. Վ. ՄԵԼՔՈՆՅԱՆ

ՖՈՏՈԴԵՆՍԻՏՈՄԵՏՐԻԱՆ ԲՈՒՍԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Բույսերի կենսաբանության ուսումնասիրության հետ կապված հետազոտությունները օրրստօրե խորանում և բազմակողմանի են դառնում, որոնց նպատակադիր ու արդյունավետ իրագործումը մեծապես պայմանավորված է գիտական ժամանակակից սարքավորումների առկայությամբ:

Այս տեսակետից ուշադրության է արժանի խրոմատոգրաֆիայի և էլեկտրաֆորեզի միջոցով հայտնաբերված նյութերի որակական կազմի քանակական որոշումը գենսիտոմետրիայի միջոցով:

³ Изготавливается учреждением «Поль Брюинг», Голландия.

Գոյութիւն ունեցող դենսիտոմետրներից ամենակատարելագործվածը, ամենաարագը և առավել ճիշտը TLD—100 մականիշի մեքենան է, որի միջոցով կարելի է որոշել շաքարների, օրգանական թթուների, ամինաթթուների, ֆենոլային և այլ միացութիւնների քանակական կազմը:

Այս տիպի ունիվերսալ և արագ մեթոդների առկայութիւնը կարևոր է հատկապես սելեկցիոնների համար, որոնց մեծաքանակ փորձարկվող նյութի հիբրիդոլոգիական անալիզը, ըստ քիմիական կազմի, համարյա անհնար է գոյութիւն ունեցող մոնոմեթոդների օգնութեամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bourzeix M., Guitraud J. et Champagnol F. Chromatog J., 50, 83—91, 1970.
2. Champagnol F. et Bourzeix M. J. Chromatog, 59, 472—5, 1971.
3. Shellard E. J. Quantitative paper and thin layer Chromatography. Academic Press, London, 1968.
4. Fairbairn J. W. et Relph S. J. J., Chromatog., 33, 494, 1968.
5. Bourias M. Chimie. Anal., 51, 76—82, 1969.