

Г. Т. Адунц

Количественное определение тиамин при помощи фотометра

(Представлено Г. Х. Бунятяном 7 VII 1953)

Для определения тиамин (витамин B_1) существует ряд методов, которые отличаются друг от друга как по принципу определения, также и по чувствительности.

Существующие методы в основном можно разделить на три группы: биологический, микробиологический и химический.

Биологический метод определения тиамин в настоящее время не имеет практического значения, т. к. связан с большими трудностями и требует длительного времени.

Химический метод определения тиамин широко применяется в современных биохимических лабораториях, он доступен по своей простоте и требует гораздо меньшего времени. Этот метод по своей чувствительности уступает микробиологическому методу, дающему возможность определить тиамин в 1 мл экстракта в количестве 0,00005 гаммы, между тем как химическим методом можно определить 0,001 гаммы тиамин в том же объеме экстракта.

Несмотря на такую высокую чувствительность микробиологического метода, химический метод имеет ряд преимуществ перед микробиологическим методом.

Поскольку биологический и микробиологический методы определения тиамин не входят в нашу задачу в настоящей статье, мы не останавливаемся на изложении этих методов.

Сущность химического или так называемого тиохромного метода заключается в следующем: витамин B_1 , содержащийся в экстракте растительного или животного происхождения, окисляется калиферрицианидом ($K_3Fe(CN)_6$) в щелочной среде и превращается в тиохром.

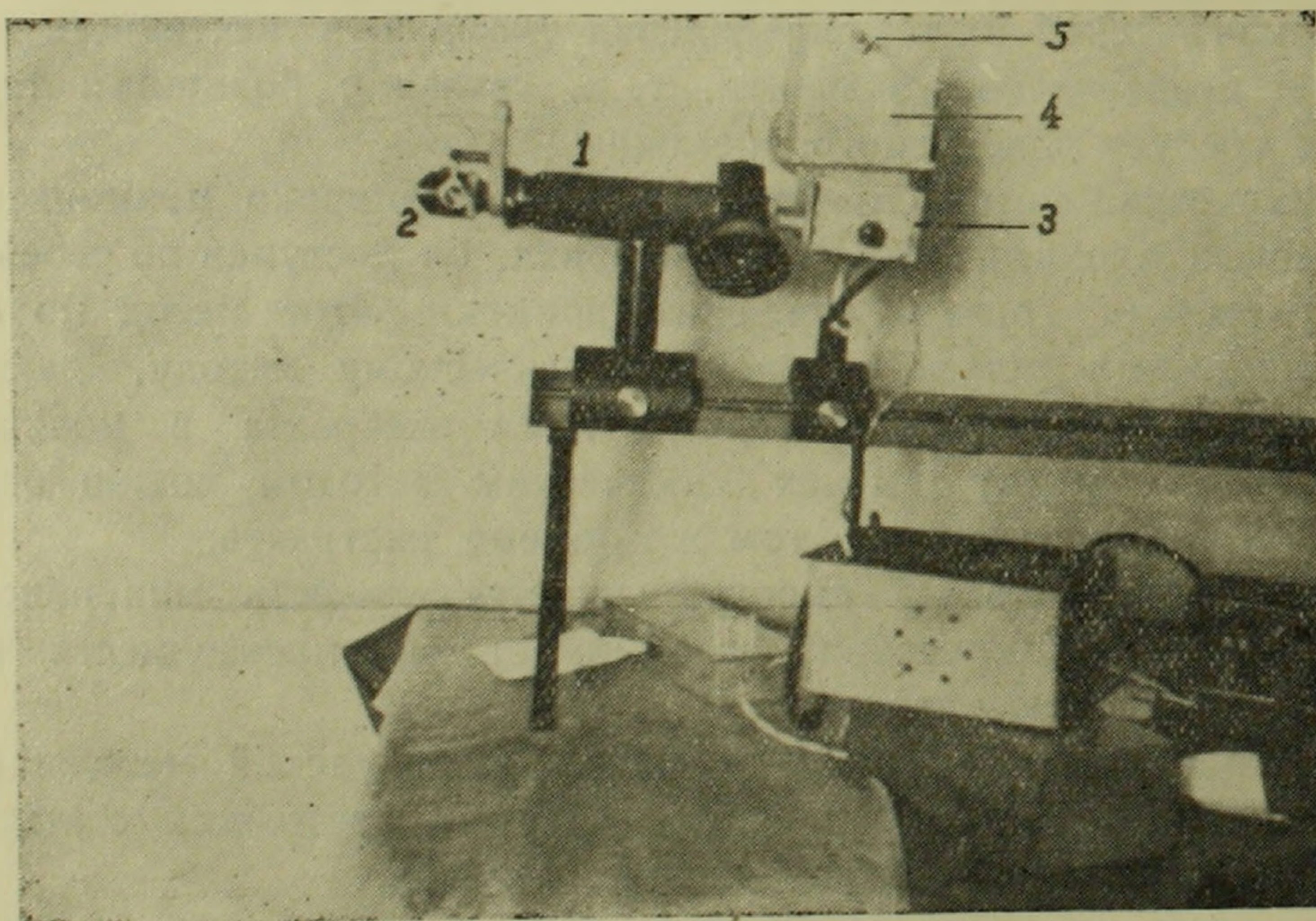
В дальнейшем изобутиловым спиртом извлекается тиохром из водного экстракта и затем определяется его количество (в изобутиловом спирте) путем флуорометрирования. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна концентрации тиамин.

Интенсивность флуоресценции определяется визуальным и электро-фото-гальванометрическими способами.

Электро-фото-гальванометрический метод является современным

совершенным методом для определения тиамин, но вместе с тем имеет свои недостатки. При извлечении тиамин изобутиловым спиртом вместе с ним часто переходят в изобутиловый спирт также и другие флуоресцирующие вещества, что отражается на количестве определяемого тиамин, т. к. шкала гальванометра показывает больше тиамин, чем действительно содержится в исследуемой пробе.

Визуальный метод более простой, но он имеет ряд недостатков, вследствие чего достоинство этого метода снижается. Во-первых, в ходе работы при визуальном методе расходуется большое количество кристаллического тиамин. Во-вторых, при сравнении исследуемого раствора со стандартом нет возможности точного определения тиамин, т. к. поле зрения бывает очень широкое, вследствие этого неточность определения может колебаться в пределах до 15%, т. к. современные флуорометры имеют ряд недостатков, не выпускаются в массовом масштабе и к тому же являются дорогими приборами, мы задались целью изготовить флуорометр, который лишен вышеупомянутых недостатков и отличался бы своей простотой, доступностью широкого применения и выгодностью в смысле экономии материала и времени.



Наружный вид флуорометра. 1—фотометр; 2—окуляр;
3—подвижная установка для кюветов; 4—корпус флуорометра;
5—кварцевая лампа.

Нами сконструированный флуорометр представляет металлический ящик, перегородженный черным фильтром (стекло из окисного никеля). Под фильтром помещена подвижная установка для кюветов (см. фотоснимок).

В верхней части ящика параллельно к кюветам прикреплена обыкновенная медицинская кварцевая лампа, типа ПРК-4. Для предотвращения значительного перегрева в верхней половине (выше чер-

ного фильтра) имеются отверстия для воздушного охлаждения прибора.

Размеры металлического ящика следующие: высота 30 см, ширина 20 см, глубина 20 см, от дна до фильтра 6 см, от фильтра до кварцевой лампы 12 см.

Против каждого кювета имеется по одному отверстию, которые трубками соединяются к гнездам штупфотометра.

Ультрафиолетовые лучи из кварцевой лампы попадают на черный фильтр, через который проходят только невидимые лучи, (ультрафиолетовые). Эти лучи, попадая в кювет, где находится тиохром, вызывают флуоресценцию тиохрома. Последний испускает видимые лучи, которые попадают в поле зрения штупфотометра. Затем при помощи шкалы фотометра определяют количество тиохрома (тиамина) в исследуемом растворе.

При помощи предложенного нами фотометра мы определяли интенсивность флуоресценции различных концентраций тиамина. В 10 мл изобутилового спирта брались следующие количества тиамина—0,0025; 0,005; 0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 и 1,0 гаммы. На 10 мл изобутилового спирта брался тиамин в количестве от 1 до 50 гамма. Опыты показали, что при наличии в растворах большого количества тиамина интенсивность флуоресценций частично уменьшается, поэтому необходимо исследуемый раствор разводить до того, чтобы содержание тиамина составляло в пределах 0,0025—1,0 в 10 мл. На основании упомянутых стандартных растворов тиамина различной концентрации мы составляли соответствующую кривую, которая значительно облегчает работу. Как показывает кривая, при повышении концентрации тиамина прямо пропорционально повышается и интенсивность флуоресценций.

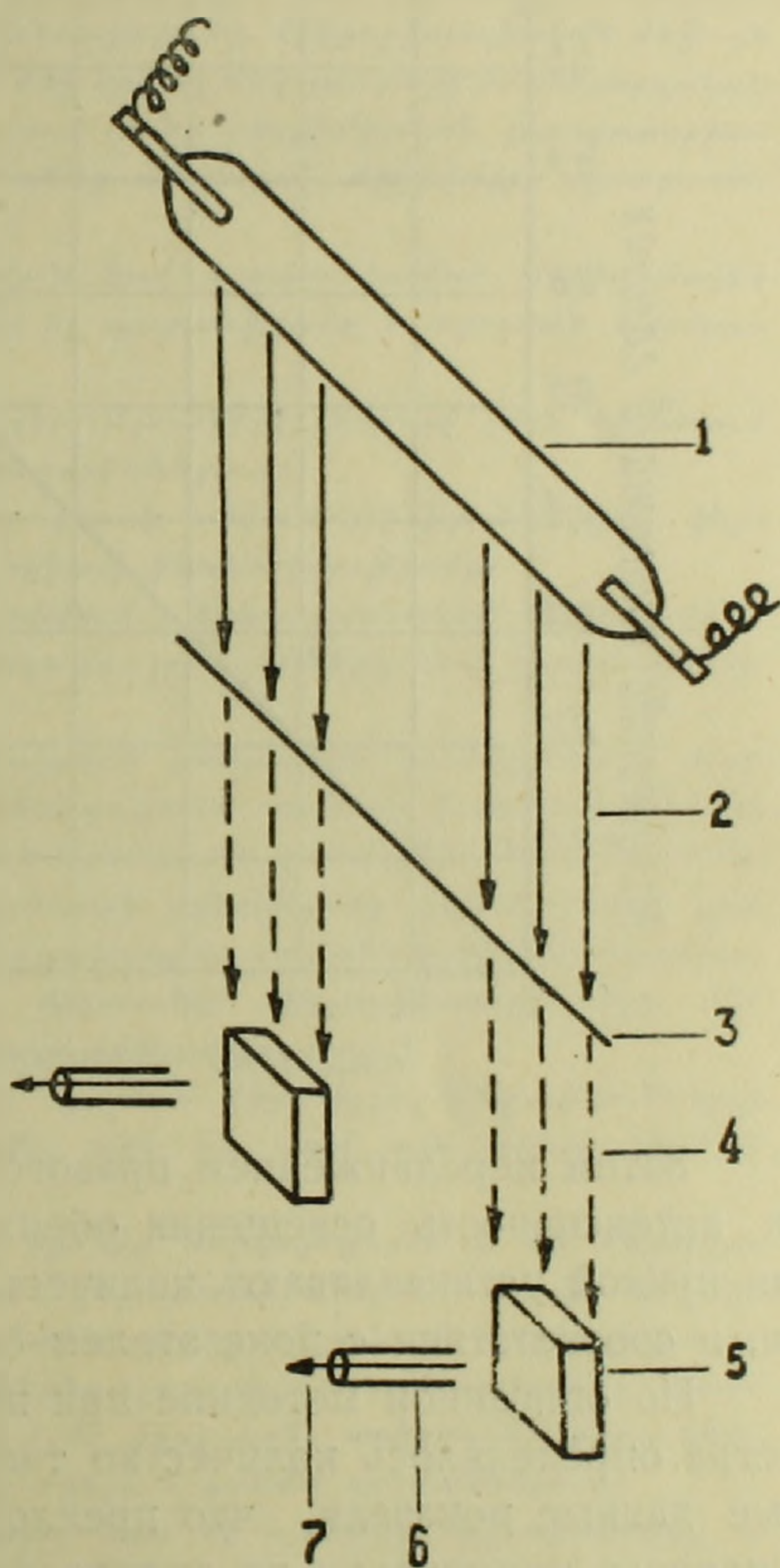
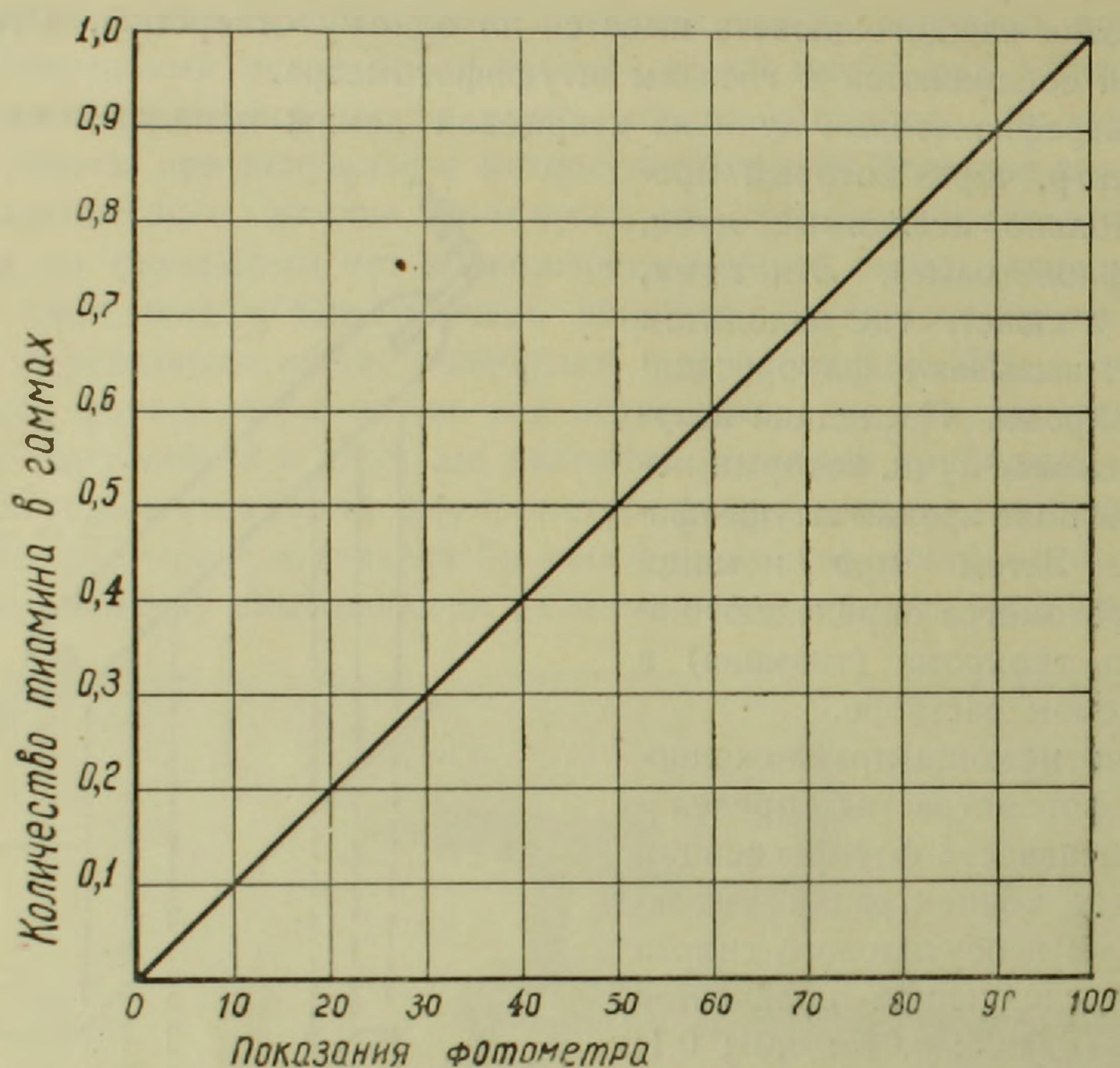


Схема фотометра. 1—кварцевая лампа; 2—видимые ультрафиолетовые лучи; 3—черный фильтр; 4—невидимые ультрафиолетовые лучи; 5—кювет; 6—трубка, соединяющаяся со штруффотометром; 7—видимые лучи из флуоресцирующего тиохрома.

Измерение интенсивности флуоресценции исследуемого раствора производится следующим образом: исследуемый раствор в кювете помещается в передвижной установке металлического ящика в правом гнезде, а стандарт, содержащий 1 гамму тioxрома в 10 мл изобутиловом спирте—в левом гнезде.



Затем передвижением правого барабана фотометра приравнивается интенсивность освещения обеих половин поля зрения. При помощи кривой устанавливают количество тиамина в исследуемом растворе, в соответствии с показателем барабана.

По описанной методике при помощи предложенного нами фотометра определялось количество тиамина в моче и в крови. Полученные данные показали, что предложенный флуорометр пригоден для широкого применения по определению тиамина в растворах и экстрактах как животного, так и растительного происхождения.

Предварительные данные показали, что при помощи этого прибора можно определить количество также рибофлавина и N⁻¹ метилникотинамида.

В заключение приношу глубокую благодарность действ. чл. АН Арм. ССР проф. Г. Х. Бунятяну за ценные указания в процессе проведения этой работы.

Институт физиологии АН Арм. ССР

ԹԻԱՄԻՆԻ քանակական որոշումը Ֆուտոմետրի օգնությամբ

Թիամինի քանակական որոշման համար գոյություն ունեն մի շարք մեթոդներ, որոնք միմյանցից տարբերվում են ինչպես որոշման սկզբունքով, այնպես էլ զգայությամբ:

Գոյություն ունեցող մեթոդները հիմնականում կարելի է բաժանել երեք խմբի՝ միկրոբիոլոգիական, բիոլոգիական և քիմիական:

Բիոլոգիական մեթոդով թիամինի քանակի որոշումը շատ կոպիտ է և պահանջում է բավական երկար ժամանակ, դրա համար էլ թիամինը այժմ այդ մեթոդով չեն որոշում:

Գոյություն ունեցող մեթոդների մեջ ամենազգայունը միկրոբիոլոգիական մեթոդն է, որի օգնությամբ կարելի է 1 մլ լուծույթի մեջ որոշել մեկ դամմայի տասներորդական մասը: Բայց այս մեթոդը նույնպես լայն կիրառում չունի բիոքիմիական լաբորատորիաներում, որը կապված է միկրոօրգանիզմների համար սննդարար միջավայրի պատրաստման մեծ դժվարութունների հետ:

Թիամինի քանակական որոշման քիմիական կամ այսպես կոչված թիոխրոմային մեթոդը տարբերվում է վերոհիշյալ մեթոդներից իր պարզությամբ և որոշման արագությամբ:

Թիոխրոմային մեթոդը իր մի շարք առավելութունների շնորհիվ լայն կիրառում է ստացել ժամանակակից բիոքիմիական լաբորատորիաներում:

Ուսումնասիրվող լուծույթի մեջ թիամինը վեր է ածվում թիոխրոմի, իսկ վերջինիս կոնցենտրացիան չափվում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությամբ:

Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը չափվում է երկու եղանակով՝ ֆլուորոմետրիկ և տարբեր կոնցենտրացիա ունեցող ստանդարտ լուծույթների հետ համեմատելով: Վերջին եղանակը տալիս է զգալի սխալներ:

Նախ և առաջ ֆլուորոմետրացիան բաց դաշտում կատարելիս զուգարվում է նաև միջավայրի ցրված լույսը, ինչպես նաև բաց տեսադաշտում անհնար է ուսումնասիրվող լուծույթը ճշգրիտ կերպով համեմատել թիամինի ստանդարտ լուծույթի հետ: Թիամինի քանակական որոշումը ժամանակակից ֆլուորոմետրի օգնությամբ ընթանում է շատ արագ և տալիս է ճշգրիտ արդյունքներ, բայց դժբախտաբար ժամանակակից ֆլուորոմետրը մասսայական ձևով չի թողարկվում, այդ պատճառով էլ լաբորատորիաների մեծ մասը զրկված է այդ գործիքով օգտվելու հնարավորութունից:

Նկատի ունենալով թիամինի քանակական որոշման վերոհիշյալ թերությունները, մենք պատրաստել ենք ֆլուորոմետրի մեկ մոդել, որն այս կամ այն չափով զերծ է վերոհիշյալ թերություններից:

Տեքստում նկարագրված ֆլուորոմետրը իրենից ներկայացնում է մի մետաղյա արկղ, որը միացվում է ֆոտոմետրի հետ: Եթե լաբորատորիաներում կա ֆոտոմետր, ապա նման ֆլուորոմետրի պատրաստումը առանձին դժվարություն չի ներկայացնում:

Թիամինի մի շարք քանակական որոշումներից պարզվել է, որ մեր կոդից պատրաստված ֆլուորոմետրի օգնությամբ կարելի է 1 մլ իզոբուտիլ սպիրտում ճշգրիտ կերպով որոշել թիամինի քանակությունը 0,025-ից մինչև 1 դամմա սահմաններում:

Այդ մոդելի օգնությամբ կարելի է որոշել նաև N-1 մեթիլ նիկոտինամինը և ռիբոֆլավինը: