

УДК 577.151/152

**Петров С. А.**, д-р біол. наук, проф., **Магла М. Г.**, аспірант  
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## НОВА МОДИФІКАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТІВ ТІАМІНУ У ТКАНИНАХ

Нова модифікація методу визначення кількісного вмісту тіаміну та його метаболітів у тканинах дозволяє визначати вміст тіохрому, 4-метил-5β-оксиетилтіазолу, тіаміну та його фосфатів у тканинах за допомогою хроматографії на папері.

**Ключові слова:** тіамін, тіохром, 4-метил-5β-оксиетилтіазол, хроматографія

Методи визначення фосфорних ефірів тіаміну в тканинах добре розроблені і базуються в основному на хроматографії [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8] та електрофорезі [9, 10, 11]. Щодо визначення катаболітів вітаміну В<sub>1</sub>, то відомі лише поодинокі праці, пов'язані з дослідженням сечі. Вміст катаболітів тіаміну у тканинах вивчали лише в нашій лабораторії [12].

Для цього була поставлена мета — розробити нову модифікацію методу кількісного визначення тіаміну та його метаболітів у тканинах.

### Матеріали та методи

В дослідженнях користувалися хроматографією на папері. Використовували препарат <sup>14</sup>C-тіаміну з питомою активністю 24,3 мКі/ммоль, виготовлений фірмою Amersham.

В дослідах *in vivo* <sup>14</sup>C-тіамін разом з <sup>12</sup>C-тіаміном вводили під шкіру білим щурам у ліве стегно в дозі 1,0 мг/кг маси. Через 6 годин тварин забивали. Органи гомогенізували у воді із розрахунку 1 г тканини на 9 мл води. Потім до гомогенатів додавали подвійний об'єм спирту для осадження білків. Осад білків відокремлювали за допомогою центрифугування при 5000 g протягом 10 хвилин. Надосадну рідину (нор-1) зберігали. Отриманий осад знову обробляли подвійним об'ємом спирту для більш повної екстракції з нього метаболітів тіаміну. Суміш центрифугували за вище зазначених умов і отриману надосадну рідину поєднували з нор-1. Об'єднану рідину наносили на хроматографічний папір у кількості 0,1 мл і провадили висхідну хроматографію протягом 24 годин.

Спочатку для хроматографії користувалися сумішшю Сіліпранді [8], що складається з н-пропанолу, води та 1 М ацетатного буферу рН 5,4 в співвідношенні 65 : 20 : 15. Однак дана суміш дозволила достатньо чітко розділити тільки фосфорні ефіри вітаміну В<sub>1</sub>. Що стосується катаболітів тіаміну — тіохрому та 4-метил-5β-оксиетилтіазолу, то для їх розподілу суміш Сіліпранді була непридатною. Тому у подальшій роботі використовували

## Модифікація методу визначення метаболітів тіаміну

іншу хроматографічну суміш, до складу якої входили ізобутанол, піридин, вода та оцтова кислота у співвідношеннях 33 : 33 : 33 : 1. Дану суміш скорочено назвали піридиною.

Після 24 годин експозиції хроматограми просушували, розрізали на фрагменти по 0,5 см і підраховували їх радіоактивність на газопроточному приладі “Протока”. На інші хроматографічні стрічки наносили “свідків” і по їх положенню розраховували  $R_f$  для ідентифікації метаболітів тіаміну.

### Результати дослідження

Результати дослідження представлені у таблиці 1.

Як свідчать результати, наведені в таблиці 1, суміш Сіліпранді дає мож-

Таблиця 1

#### Розподіл метаболітів тіаміну за хроматографії на папері (n=8)

Середовище для хроматографічного розподілу	$R_f$ метаболітів тіаміну					
	тіамін	ТМФ	ТПФ	ТТФ	тіохром	4-м-5β-о*
Суміш Сіліпранді	0,65±0,03	0,42±0,03	0,25±0,01	0,06±0,01	—	—
Піридінова суміш	0,55±0,03	0,27±0,01	0,17±0,01	0,11±0,01	0,72±0,04	0,97±0,04

Примітка: \* 4-м-5β-о — 4-метил-5β-оксиетилтіазол

ливість чітко розподілити тільки тіамін та його фосфорні ефіри. Застосування піридинової суміші призводить до виявлення не тільки тіаміну та його фосфатів, але й катаболітів вітаміну — тіхрому та 4-метил-5β-оксиетилтіазолу.

Важливо зазначити, що ці дві останні сполуки мають значно більший  $R_f$ , ніж тіамін і його фосфорні ефіри, завдяки чому всі ці метаболіти можна чітко ідентифікувати.

Таким чином, хроматографія на папері в піридиновій суміші дає змогу кількісно визначати вміст не тільки тіаміну та його фосфатів в тканинах, але й катаболітів цього вітаміну — тіхрому та 4-метил-5β-оксиетилтіазолу.

### Література

1. *Leuc H. Ф.* Радиохроматографическое определение фосфорных эфиров тиамин —  $S^{35}$  в печени белых крыс // Научн. конф. Одесского мед. института, посв. 90-летию со дня рожд. В. И. Ленина: Тез. докл. — Одесса. — 1960. — С.28-30.
2. *Bernard B., de Cartier P. H.* Comportement de la thiamine et de ses phosphoderives a l'analyse ionophoretique // Giorn. Biochim. — 1958. — V. 7, № 1. — P. 1-7.
3. *Giri K. V., Balakrishnan S.* Circular paper chromatographic method for estimation of thiamine and riboflavin in multivitaminum preparations // Analyt. Chem. — 1955. — V. 27, № 7. — P. 1178-1180.
4. *Kaizer H., Wildemann L.* Eine Method zur quantitativen Ansvwertung fluoreszierender Papierchromatographie // Internat. Z. Vitaminforsch. — 1956. — V. 27, № 2. — P. 131-139.

5. Kraus H., Wildemann L. Uber die quantitative papierchromatografische Bestimmung des Thiamins in harn // Internat. Z. Vitaminforsch. — 1956. — V. 27, № 2. — P. 122-131.
6. Pleticha R. Chromatographisch-polarographische Stadie des Thiamins I // Pharmazie. — 1954. — P. 734-740.
7. Pleticha R. Chromatographisch-polarographische Stadie des Thiamins III. Zur frage der Trennungstechnik bei der Bestimmung des Thiamins im naturlichem Material // Pharmazie. — 1957. — V. 12, № 10. — P. 675-680.
8. Siliprandi N. Sili prandi D. Separation and quantative determination of thiamine,phosphoric esters and their preparation in pure form // Biochim. and Biophys. Acta. — 1954. — V. 14, № 1. — P. 52-61.
9. Шкодин А. М., Тихомирова Г. П. К полярографии тиамина. Полярографический метод определения тиамина в присутствии аскорбиновой кислоты // Укр. хим. журнал. — 1955. — Т. 21, № 2. — С. 265-268.
10. Rossi-Fanelli A., Mondivi B. Separations elektroforetika su karta degli esteri fosforisi della tiamina // Boll. Sok. Ital. Biol. Sperim. — 1953. — V. 29, № 7. — P. 1330-1333.
11. Serge A., Ciriello C., Reviglio M. Metodo di dossagio della tiamina e dei suoi esteri fostorici // Gazz. Chim. Ital. — 1957. — V. 87, № 10. — P. 1199-1202.
12. Петров С. А. Регуляция тиамином и его метаболитами процессов образования и обмена аминокислот и кетокислот в организме // Автореф. докт. дисс. — Минск. — 1992. — 32 с.

**Петров С. А., Магла М. Г.**

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, кафедра биохимии,  
ул. Дворянская, 2, 65026, Украина

#### **НОВАЯ МОДИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ТИАМИНА В ТКАНЯХ**

##### **Резюме**

Новая модификация метода определения количественного содержания тиамина и его метаболитов позволяет определить содержание тиохрома и 4-метил-5β-оксиэтилтиазола, тиамина и его фосфатов в тканях с помощью хроматографии на бумаге.

**Ключевые слова:** тиамин, тиохром, 4-метил-5β-оксиэтилтиазол, хроматография

**Petrov S. A., Magla M. G.**

Odessa National University after I. I. Mechnikov, Department of Biochemistry,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

#### **NEW MODIFIKATION OF CHROMATOGRAPHIC METHOD OF THIAMINE METABOLITES DETERMINATION IN TISSUES**

##### **Summary**

New modifikation of thiamine and its metabolites quantitative determination method makes possible to define the level of thiochrome, 4-methyl-5β-oxyethylthiazole, thiamine and its phosphates in tissues under the chromatographia on the paper.

**Key words:** thiamine, thiochrome, 4-methyl-5β-oxyethylthiazole, chromatographia.