

PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON METHANOL NEBEN ÄTHANOL

IVAN ODLER

Lehrstuhl für Gerichtsmedizin an der Komenský-Universität in Bratislava

Zusammenfassung

Es wurden die Abhängigkeiten untersucht, welche die durch fuchsinschweflige Säure mit Methanol nach dessen Oxydation zu Formaldehyd in Gegenwart von Äthanol erhaltenen Färbungen beeinflussen. Weiters wurden die Bedingungen sowohl der maximalen Empfindlichkeit dieser Reaktion, als auch die Möglichkeit ihrer Anwerdung zur quantitativen Bestimmung untersucht.

In die Redaktion eingelangt den 23. IX. 1954

LITERATÚRA

1. Hepter J., Z. Untersuch. Nahrgrs.-u. Genussm. 24, 131 (1912). 2. Meyerfeld J., Chem. Ztg. 37, 649 (1912). 3. Nicloux M., Bull. Soc. chim. Paris, 3. ser. T 35, 330 (1906). 4. Völtz W., Förster R., Baudrexel A., Arch. ges. Phys. 133 (1910). 5. Wieland H., Scheuing G., Ber. 54, 2527 (1921). 6. Hoffpauir C., Buckaloo G. W., Gauthrie J. D., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 15, 605 (1943). 7. Segal L., Anal. Chem. 23, 1499 (1951). 8. Walker J. F., *Formaldehyde*, New York 1944. 9. Büchi J., Pharm. Acta Helv. 6, 1 (1931). 10. Tobie W. C., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 14, 405 (1942). 11. Atkinson W. B., Stain Technol. 27, 153 (1952). 12. Fellenberg T., Biochem. Z. 85, 45 (1918). 13. Reif G., Z. Untersuch. Lebensmitt. 51, 267 (1926). 14. Denigès G., C. r. Acad. sci. 150, 832 (1910). 15. Fendler G., Mannich C., Arb. pharmaz. Inst. Berl. 3, 243 (1906).

Došlo do redakcie 23. IX. 1954

KOLORIMETRICKÉ STANOVENIE TRYPAFLAVÍNU

FRANTIŠEK SOKOL

Virologický ústav Československej akadémie vied v Bratislave

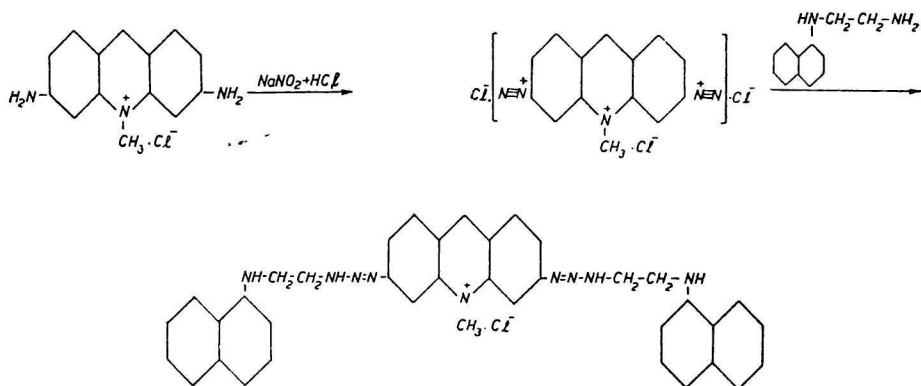
Pri purifikácii chrípkového vírusu jeho vyzrážaním vodnými roztokmi trypaflavínu z infikovanej alantoidickej tekutiny [1] bolo treba nájsť rýchlu a presnú metódu na stanovenie trypaflavínu v tekutine nad zrazeninou po odstredení vyzrážaného komplexu vírusu chrípkový s trypaflavínom.

V literatúre je opísaných viac metód na kvantitatívne stanovenie trypaflavínu. Väčšina z nich sa zakladá na vyzrážaní trypaflavínu dvojchrómanom draselným [2, 3], ferikyamidom draselným [4, 5] alebo kyselinou pikrovou [6] a na spätnej titracii nespotrebovaného činidla. Ellis [7] stanovuje trypaflavín gravimetricky zrážaním kyselinou pikrovou. Všetky tieto metódy sú

však málo citlivé a pomerne málo presné, pretože trypaflavín sa týmito látkami nezráža kvantitatívne. Polarimetrickú a polarografickú metódu, ktorú opísali Blažek, Kalvoda a Zýka [8], sme nepoužili pre prítomnosť rozličných aminokyselín a bielkovín v našich vzorkách. Keďže v danom prípade šlo o stanovenie malých množstiev trypaflavínu a keďže možnosť rušivého účinku iných látok bola minimálna, rozhodli sme sa použiť kolorimetrickú metódu.

Princíp metódy

Molekulu trypaflavínu (3,6-diamino-10-metylakridínchlorid, ináč nazývaný aj euflavín alebo akriflavín) sme po zdiazotovaní skopulovali s N-(1-naftyl)-etyléndiamínom. Farebnú reakciu sme vyvolávali v troch stupňoch. Najprv sme obidve aminokupiny zdiazotovali dusitanom sodným, potom sme nadbytok dusitanu odstránili sulfamátom amónnym, načo nasledovala kopulácia. Všetky tri reakcie sme robili pri izbovej teplote v prostredí kyseliny soľnej. Reakčná schéma je táto:



Prístroje a pomôcky

Pracovali sme s fotoelektrickým spektrofotometrom Coleman. Meralo sa vo valcovitých kyvetách o priemere 25 mm. Na odmeriavanie roztokov sme používali preciačované byrety, pipety a odmerné banky. Roztoky sme temperovali na príslušnú teplotu pomocou ultratermostatu.

Experimentálna časť

Používané roztoky

Na prípravu roztokov sme ako rozpúšťadlo používali destilovanú vodu. Všetky roztoky, okrem roztoku 6, sú nestále, a preto sme ich prechovávali v tmavých zábrusových fľaškách a v ladničke pri +5 °C. Používali sme tieto roztoky:

- 0,1000 g trypaflavínu v 500 ml roztoku. Koncentrácia trypaflavínu 200 μ /ml.
- 25 ml roztoku 1 zriedených destilovanou vodou na 250 ml. Koncentrácia trypaflavínu 20 μ /ml. Pre každú sériu stanovení, ktorá trvala dlhšie ako 48 hodín, sme pripravili nové štandardné roztoky 1 a 2.

3. 0,5000 g dusitanu sodného p. a. v 100 ml roztoku. Roztok treba obnovovať po každom týždni.

4. 2,5000 g sulfamátu amónneho v 50 ml roztoku. Roztok treba obnovovať po každom týždni.

5. 1,0000 g N-(naftyl)-etyléndiamíndihydrochloridu v 50 ml roztoku. Tento roztok je obzvlášť nestály, preto sa odporúča pripravovať ho vždy čerstvý pri každej sérii stanovení.

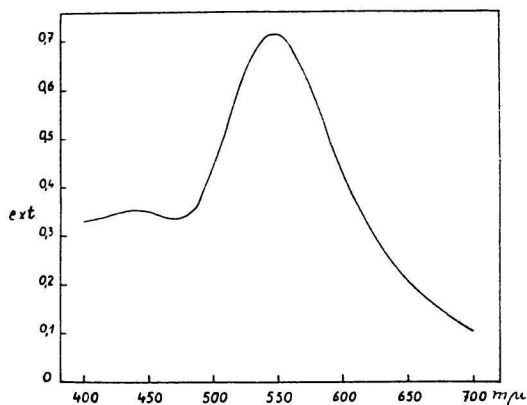
6. 37 % kyselina solná p. a. zriedená destilovanou vodou v pomere 1 : 1.

Vyvolanie sfarbenia

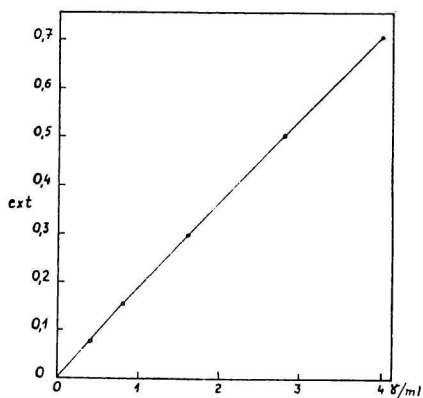
Do 50 ml odmernej banky sa pridá toľko ml analyzovaného roztoku, aby po doplnení po značku koncentrácia trypaflavínu bola 1—4 γ /ml. Potom sa pridá 25 ml destilovanej vody a 2 ml roztoku kyseliny solnej (roztok 6). Hneď nato pridáme 1 ml roztoku dusitanu (roztok 3). Obsah odmernej banky sa premieša a nechá stáť 10 minút. Po 10 minútach sa do odmernej banky pridá 1 ml roztoku sulfamátu (roztok 4), obsah odmernej banky sa premieša a nechá stáť 10 minút. Nakoniec sa pridajú 2 ml roztoku naftyletyléndiamínu (roztok 5), objem sa doplní destilovanou vodou niečo pod značku odmernej banky a premieša sa. Roztok vytemperujeme vo vodnom kúpeli na teplotu udávanú na odmernej banke a doplníme destilovanou vodou po značku. Fotometrujeme ho za 15 minút po pridaní roztoku naftyletyléndiamínu. Súčasne urobíme slepý pokus, na ktorý nastavíme nulovú hodnotu prístroja.

Zistenie polohy maxima absorpčného pásu

Podobným spôsobom sme vyvolali sfarbenie roztoku, v ktorom konečná koncentrácia trypaflavínu bola 4 γ /ml. Roztok sme 15 minút po pridaní roztoku naftyletyléndiamínu fotometrovali pri vlnových dĺžkach od 400 až po 700 $m\mu$. Vlnovú dĺžku sme menili po 10 $m\mu$ a po každý raz sme zaznamenali príslušnú extinkciu. Absorpčná krivka farbiva je znázornená na obr. 1.



Obr. 1. Absorpčná krivka fotometrovaného farbiva vo viditeľnej oblasti. Hrúbka roztoku 25 mm, koncentrácia trypaflavínu 4 γ /ml.



Obr. 2. Kalibračná krivka pre kvantitatívne stanovenie trypaflavínu. Hrúbka roztoku 25 mm, vlnová dĺžka 550 $m\mu$.

Z obrázka vidieť, že maximum absorpcie leží pri 550 $m\mu$.

Stálosť sfarbenia a kalibračná krivka

Stálosť sfarbenia sa sledovala pomocou závislosti extinkcie roztokov o rôznej koncentrácii pri 550 μ od času. Výsledky sú uvedené v tab. 1. Čas sa počíta od prídania roztoku naftyetyléndiamínu. Z tabuľky vidieť, že stálosť fotometrovaného farbiva v danom prostredí je dostačujúca pre presné merania.

Tabuľka 1

č.	konc. v γ /ml	15 min.	extinkcia po 90 min.	extinkcia po 1050 min.
1	0,4	0,077	0,072	0,068
2	0,8	0,155	0,150	0,141
3	1,6	0,295	0,293	0,275
4	2,8	0,505	0,505	0,480
5	4,0	0,710	0,710	0,665

Z údajov uvedených v druhom a treťom stĺpci tab. 1 je zhotovená kalibračná krivka, znázornená na obr. 2.

Krivka sa nepatrne odkláňa od priamky určovanej Beerovým zákonom. Odporúča sa pri každej sérii stanovení zhotoviť novú kalibračnú krivku alebo aspoň prekontrolovať jej dva body.

Analyza vzoriek tekutiny nad zrazeninou

Vírus chrípky po vyvrážaní sa od tekutiny nad zrazeninou oddelil odstredovaním pri 3000 obrátkach za minútu po dobu 15 minút. Do 50 ml odmernej banky sa pipetoval obyčajne 1 ml tekutiny nad zrazeninou, pretože obsahoval 150—200 γ trypaflavínu v jednom ml. Slepý pokus sa pripravoval zrazením vírusu 96 obj. % etylalkoholom a po vyvolaní sfarbenia vykazoval veľmi slabú ružovú farbu.

Presnosť, citlivosť a hodnotenie metódy

V oblasti koncentrácií, v ktorej sme pracovali, sú odčítania na fotometri v najnepriaznivejšom prípade reprodukovateľné na 2 %. To znamená, že aj koncentráciu trypaflavínu by sme za priaznivých podmienok mohli stanoviť s takouto presnosťou. Chyba stanovenia závisí, pravda, aj od presnosti odmeriavania objemov. Paralelné stanovenia, ktoré sme robili, nelíšili sa od seba viac ako o 3 %. Samozrejme pri nižších koncentráciách je chyba stanovenia väčšia. Dolná hranica dokázateľnosti trypaflavínu touto metódou sa pohybuje okolo 0,2 γ /ml, takže metóda by sa dala použiť na dôkaz stôp trypaflavínu v biologickom materiáli. Musíme si však uvedomiť, že takmer všetky látky, v ktorých je aminogrupina priamo viazaná na aromatické jadro, dávajú farebnú reakciu s použitými činidlami, čo by vlastné stanovenie rušilo. Preto možno metódu použiť len tam, kde sa takéto zlúčeniny nevyskytujú alebo kde možno ich vplyv vhodnými metódami vylúčiť.

Ďakujem J. Drábkovi z Výskumného ústavu agrochemickej technológie v Bratislave za prípravu sulfamátu amónneho a N-(naftyl)-etyléndiamínu. Ďalej ďakujem L. Boreckému z nášho ústavu za účinnú spoluprácu.

Súhrn

Vypracovala sa kolorimetrická metóda na kvantitatívne stanovenie trypaflavínu vo vodných roztokoch, ktorá sa použila na jeho stanovenie v tekutinách

po vyzrážaní chrípkového vírusu. Prediskutovala sa presnosť a citlivosť metódy a poukázalo sa na možnosť jej využitia pre kvantitatívne stanovenie stopových množstiev trypaflavínu v biologickom materiáli.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПАФЛАВИНА

ФРАНТИШЕК СОКОЛ

Вироголический институт Чехословацкой Академии Наук в Братиславе

В ы в о д ы

Был разработан колориметрический метод для количественного определения трипафлавина в водных растворах, который был использован для его определения в жидкости по осаджению вирусов гриппа. Продискутирована точность и чувствительность метода и обращено внимание на возможность его использования для количественного определения следов трипафлавина в биологическом материале.

Поступило в редакцию 16. XI. 1954

KOLORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON TRYPAFLAVIN

FRANTIŠEK SOKOL

Virologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

Zusammenfassung

Es wurde eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Trypaflavin in wässrigen Lösungen ausgearbeitet. Diese Methode wurde zur Bestimmung von Trypaflavin in Flüssigkeiten nach Ausfällung des Grippe-Virus resp. in Supernatanten bei der Purifikation des Grippe-Virus verwendet. Es wurde die Genauigkeit und Empfindlichkeit dieser Methode, d. i. die untere Grenze der Bestimmbarkeit von Trypaflavin mittels dieser Methode erörtert. Schliesslich wurde auf die Möglichkeit der Anwendung dieser Methode zur quantitativen Bestimmung von Spurenmengen von Trypaflavin im biologischen Material hingewiesen.

In die Redaktion eingelangt den 16. XI. 1954

LITERATÚRA

1. Borecký L., Čsl. Biol. 3, 297—299 (1954). 2. Pedley E., Pharm. J. 155, 148—150 (1945). 3. Jackerott K. A., Dansk. Tids. Farm. 16, 154—160 (1942). 4. Powell A. D., Hall G. F., Quart. J. Pharmac. Pharmacol. 6, 389—394 (1933). 5. Hall G. F., Powell A. D., Quart. J. Pharmac. Pharmacol. 10, 386—497 (1937). 6. Bollinger A., Quart. J. Pharmac. Pharmacol. 13, 1—6 (1940). 7. Ellis B. A., Analyst 67, 226—227 (1942). 8. Blažek A., Kalvoda R., Zýka J., Čas. čes. Lékár. 63, 138 (1950).

Došlo do redakcie 16. XI. 1954