

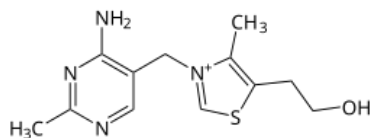
Oznaczanie witaminy B₁ (tiaminy) metodą spektrofluorymetryczną (metoda thiochromowa)

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczanie tiaminy w próbkach żywności i/lub preparatach farmaceutycznych. Dodatkowo w ramach ćwiczenia będą przygotowane krzywe kalibracyjne na jej podstawie wyznaczenie zawartości witaminy B₁ w preparacie farmaceutycznym/produkcie spożywczym oraz ocena dokładności i precyzji metody (odzysk, RSD).

Wstęp

Tiamina [1] jest kluczową witaminą regulującą metabolizm energetyczny, funkcjonowanie układu nerwowego i sercowego oraz utrzymanie homeostazy komórkowej. Jej brak skutkuje złożonymi zaburzeniami metabolicznymi i neurokardiologicznymi, wynikającymi z uniwersalnej roli koenzymatycznej TPP w komórkach. W związku z tym tiamina ma istotne znaczenie kliniczne, zwłaszcza w profilaktyce i leczeniu stanów związanych z niedoborem, takich jak neuropatie, niewydolność serca czy zaburzenia metaboliczne przebiegające z kwasicą mleczanową.



Rys. Struktura tiaminy

Tiamina (rys. 1) sama w sobie słabo fluoryzuje, dlatego w analizach chemicznych jest najczęściej utleniana w środowisku zasadowym do thiochromu - związku silnie fluorescencyjnego. Zwykle do utlenienia tiaminy do thiochromu stosuje się żelazocyjanek **potasowy** (K₃[Fe(CN)₆]) w środowisku alkalicznym. Do utlenienia można także zastosować inne utleniacze lub układy enzymatyczne (H₂O₂ + peroksydaza). Powstały thiochrom wykazuje maksimum wzbudzenia przy długości fali około **~370 nm** i maksimum emisji w zakresie około **~430–445 nm** (wartości mogą się

nieznacznie różnić w zależności od warunków utlenienia oraz stosowanego rozpuszczalnika do ekstrakcji) [1]

Odczynniki i roztwory

- roztwór chlorowodoru tiaminy o stężeniu 1 µg/mL w 0,05 mol/L roztworze kwasu siarkowego (VI)
- roztwór kwasu siarkowego (VI) (H₂SO₄) o stężeniu 0,05 mol/L
- roztwór wodorotlenku potasu (KOH) o stężeniu 5,4 mol/L
- 4 % roztwór heksacyjanożelazanu(III) potasu [K₃Fe(CN)₆]
- 2-propanol
- Roztwór tiaminy (przygotowanie przez studentów)

Wykonanie ćwiczenia

Przygotowanie odczynnika utleniającego

Do zlewki o pojemności 100 cm³ dodać 75 cm³ roztworu KOH o stężeniu 5,4 M i dodać 3 cm³ 4 % roztworu [K₃Fe(CN)₆].

Przygotowanie roztworu wzorcowego tiaminy.

W kolbie miarowej o objętości 50,00 cm³ przygotować roztwór tiaminy o stężeniu 1 mg/dm³ w 0,05 M kwasie siarkowym.

Sporządzenie krzywej wzorcowej

Do 6 kolb o objętości 50,00 dodać od 0,0 do 5,0 cm³ roztwór chlorowodoru tiaminy o stężeniu 1 mg/dm³. Następnie uzupełnić do 10,00 cm³ 0,05 M H₂SO₄ i dodać 8,00 cm³ odczynnika utleniającego. Po 10 min dodać 10,00 cm³ 2-propanolu i wytrząsać przez 2 minuty. Odczekać kilka minut do rozdzielenia się warstw.

Przygotowanie napoju

Napój tak rozcieńczyć by mierzone stężenie witaminy B₁ mieściło się w zakresie krzywej kalibracyjnej. Następnie po rozcieńczeniu pobrać 1,00 cm³ do 3 kolb miarowych o objętości 50 cm³. Do każdej z kolb dodać 9,00 cm³ 0,05 M roztworu H₂SO₄ i wytrząsać przez 10 min. Dodać 8,00 cm³ odczynnika utleniającego i odczekać

10 min. Po 10 min dodać 10,00 cm³ 2-propanolu i wytrząsać przez 2 minuty. Odczekać kilka minut do rozdzielenia się warstw.

Pomiar spektrofлуorymetryczny.

Z tak przygotowanych próbek (krzywa wzorcowa + próbki analizowane) pobierać za pomocą pipety 1,00 cm³ warstwy organicznej do kwarcowej kuwety spektrofлуorymetrycznej. Następnie zmierzyć natężenie fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 365 nm i emisji 440 nm. Pomiary powtórzyć 3 -krotnie.

Obliczenia

Wyznaczyć średnie natężenie fluorescencyjne (F) – po odjęciu tła dla każdego z roztworów wzorcowego. Następnie na podstawie pomiarów wykreślić krzywą w układzie $F=f(c)$ i metodą regresji liniowej wyznaczyć współczynnik kierunkowy oraz współczynnik determinacji (R²). Następnie na podstawie krzywej kalibracyjnej wyznaczyć stężenie tiaminy – uwzględniając rozcieńczenia i wynik podać w odpowiedniej formie, tj. w mg L⁻¹. Policzyc niepewność (SD) oraz RSD. W celu walidacji metody można zastosować badanie odzysku.

Możliwe problemy i wskazówki praktyczne

- Thiochrom jest wrażliwy na warunki reakcji i utleniania — zbyt długi czas lub nadmiar utleniacza może prowadzić do rozkładu lub zmian sygnału. Monitoruj czas i stężenia reagentów.
- Matryca próbki może zwiększać tło fluorescencji — ekstrakcja do rozpuszczalnika organicznego często poprawia czułość i selektywność
- Unikać ekspozycji roztworów na intensywne światło i przechowywać próbki/standardy w ciemnych naczyniach (tiamina może być wrażliwa na światło).
- Upewnij się, że kuwety i rozpuszczalniki są czyste — zanieczyszczenia mogą dawać sygnał tła.

Bezpieczeństwo i utylizacja odpadów

- Pracować w rękawicach i okularach ochronnych. NaOH i niektóre utleniacze są żrące - ostrożnie przy pipetowaniu i mieszaniu.
- K₃[Fe(CN)₆] - stosować z zachowaniem zasad bezpieczeństwa; nie mieszać z silnymi reduktorami w niekontrolowany sposób.

- Rozpuszczalniki organiczne (izobutanol, metanol) — palne i toksyczne; używać w wyciągu i składować odpady w oznakowanych pojemnikach.

LITERATURA ZALECANA

1. Motonori Fujiwara, Kiyoo Matsui, Determination of Thiamine by Thiochrome Reaction, Anal. Chem. 1953, 25, 5, 810–812
2. A. Cygański, Chemiczne metody analizy ilościowej, WNT Warszawa 1992
3. W. Szczepaniak, Metody instrumentalne w analizie chemicznej, WNT, Warszawa 2007
4. Peter Atkins, de Paula Julio, James Keeler, Chemia fizyczna, Wyd. PWN, 2022

Zagadnienia

Spektrofлуorymetria – podstawy metody
Metody oznaczania związków metodą spektrofлуorymetrii
Diagram Jabłońskiego
Flouescencja i Fosforyscencja
Regresja liniowa punktów pomiarowych