

В. А. ДЕВЯТНИН и В. М. ПОСИКОВА

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА С)
В КРОВИ И МОЧЕ**

(Представлено академиком А. Н. Бахом 27 II 1937)

Изучение С-витаминного обмена в организме сейчас является одним из очередных вопросов физиологии и ему посвящена огромная литература.

Ввиду этого мы в 1936 г. поставили себе задачей найти метод, наиболее пригодный для повседневной клинической работы в этой области. К этому нас побудило то обстоятельство, что достаточно точного метода определения аскорбиновой кислоты в крови и моче мы до сих пор не имеем.

Метод Tillmans (1), Harris and Ray (2) и др. не может иметь применения вследствие присутствия в крови и моче большого количества разнообразных веществ, редуцирующих (2, 6) дихлорфенолиндофенол, как например цистеин, глутатион, сахара, эрготионеин и др. Метод Martini und Bon-signore (3) является довольно громоздким в условиях клинических лабораторий и не всегда специфичным. Методы, предложенные Emmerie and Eekelen (4) и Букиным (5), являются в принципе наиболее интересными и специфичными, но и они не дают в конечном итоге точных результатов. Применяемые авторами кислоты (трихлоруксусная и соляная) обладают разрушающим действием на индикатор, а уксуснокислая ртуть полностью окисляет аскорбиновую кислоту и дальнейшая обработка сероводородом не восстанавливает ее на 100%*.

Farmer and Abt (6), Fujita and Iwatake (7) предложили новые методы, но и эти методы не являются применимыми, так как в первом случае в анализ берется только плазма крови, а во втором случае использование красной кровяной соли в биологических вытяжках приводит к неверным результатам титрования, на что указывают также Manseau, Policard et Ferrand (8).

В свое время нами был предложен метод для определения аскорбиновой кислоты в растительных объектах (9, 10, 11). Применяемый нами уксуснокислый свинец в уксуснокислой вытяжке не окисляет аскорбиновой кислоты и дает результаты, согласующиеся с истинным содержанием витамина С в объектах (12, 8), но он не удаляет из вытяжки цистеина и тионина, что при исследовании растительных объектов не имеет значения, но важно для работы с животными объектами; это обстоятельство послужило предметом критики нашего метода со стороны Emmerie and Eekelen (13)**.

* См. Десятинин и Посикова, Тр. Центр. ин-та пер. крови (1937) (в печати)

** Выражаем благодарность авторам за критику нашей работы.

Нами было замечено, что в присутствии солей кальция окисление аскорбиновой кислоты уксуснокислой ртутью значительно тормозится; окисленная при этом аскорбиновая кислота затем может быть полностью восстановлена сероводородом*. В настоящее время в литературе приводятся попытки рассматривать роль кальция как фактора, задерживающего окисление аскорбиновой кислоты (15).

Это обстоятельство было положено нами в основу предлагаемого метода, техника которого излагается ниже.

Метод

1. 4 см³ крови или мочи вносят в широкую центрифужную пробирку, туда же приливают 8 см³ 0.5% уксуснокислого кальция и при тщательном размешивании стеклянной палочкой добавляют 4 см³ 25% уксуснокислой ртути. Энергично размешивают до получения однородной массы и центрифугируют 5 мин. (мочу нет надобности центрифугировать, достаточно отфильтровать через складчатый фильтр).

2. Центрифугат (или фильтрат) обрабатывают в маленькой колбочке 3—5 мин. сероводородом, последний удаляют углекислотой.

3. Берут пипеткой несколько куб. см прозрачной, бесцветной вытяжки в пробирку и оттитровывают из микробюретки $\frac{0.001}{2}$ нормальным раствором (2,6) дихлорфенолиндофенола до ясного устойчивого розового окрашивания**. Количество аскорбиновой кислоты можно вычислить в мг%, принимая, что 1 мг аскорбиновой кислоты восстанавливает 11.4 см³ 0.001 нормального раствора (2,6) дихлорфенолиндофенола.

4. Параллельно с этим учитывают количество индикатора, идущего на титрование реактивов («поправка на цветность»), для чего проводят контрольный опыт с реактивами и дистиллированной водой. Полученное количество см³ индикатора при расчете вычитают.

Этот метод нами был проверен на кристаллической аскорбиновой кислоте и на различных веществах, присутствующих в крови и моче и могущих восстанавливать индикатор. Результаты приводим ниже.

Таблица 1

Титрование аскорбиновой кислоты, внесенной в кровь и мочу (данные выражены в куб. см индикатора, пошедшего на титрование)

№	К р о в ь				М о ч а				Примечание
	Ас-кор-бин. к-та	Кровь	Кровь + ас-кор-бин. к-та	Определен. в % исх. колич. ас-кор-бин. к-ты	Ас-кор-бин. к-та	Моча	Моча + ас-кор-бин. к-та	Определен. в % исх. колич. ас-кор-бин. к-ты	
1	9.90	0.40	10.30	100.0	9.90	0.0	9.90	100.0	Кровь и моча исследовались в зимне-весенний период (март—май 1936 г.)
2	20.60	0.50	21.10	100.0	12.20	0.5	12.70	100.0	
3	20.60	0.55	21.15	100.0	34.10	0.0	34.10	100.0	
4	34.10	0.40	34.50	100.0	—	—	—	—	
5	7.19	0.44	7.63	100.0	—	—	—	—	

* Механизм этого действия нами изучается и будет в скором времени опубликован (14).

** Так как в крови и моче содержание аскорбиновой кислоты обычно невелико, то во избежание ошибок желательно использовать весь фильтрат для титрования.

Таблица 2

Титрование редуцирующих веществ

Вещество	В см ³ индикат. на 2 см ³ раствора	Колич. опреде- лений	Вещество	В см ³ индикат. на 2 см ³ раствора	Колич. опреде- лений
Глютацион 0.5%	0	3	Ацетон 0.4%	0	2
L-цистеин 0.1%	0	6	Смесь ароматических аминокислот 1.0%	0	2
Кровь + цистенин 0.1% (за вычетом крови)	0	5	Смесь аминокислот жирного ряда 1.0%	0	2
Кровь + глютацион 0.1% (за вычетом крови)	0	4	Смесь моносахаридов 1.0%	0	2
Сахароза 5%	0	2	Смесь полисахаридов 1.0%	0	2
Фруктоза 1%	0	2	Альдегиды	0	4
Глюкоза 1%	0	2	Кетоны (кроме ацето- на)	0	4
Фенолы 2%	0	2	Оксалаты	0	2
Железо лимонно-кис- лое 0.2%	0	2	Фосфаты	0	2
Жирные кислоты 0.1%	0	2	Сульфо-белки 5%	0	2
Пирогалловая кисло- та 0.1%	0	2	Стерины (смесь) 0.5%	0	2
Мочевая к-та 0.5%	0	2			

При исследовании крови и мочи у большого количества здоровых подопытных субъектов мы получили данные, указывающие на известную стабильность содержания аскорбиновой кислоты в крови и на зависимость между введением витамина С с пищей и выделением его мочей. Некоторые из этих наблюдений приводятся в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Содержание аскорбиновой кислоты в крови человека

	Аскорбин. к-та в мг%
Норма	0.50
»	0.55
»	0.57
»	0.60
Гиповитаминов	0.32
»	0.25
»	0.0

Более полные данные будут нами опубликованы позже, но и из приведенного материала можно извлечь некоторые положения.

1. Так называемый «гипервитаминоз-С» в организме человека не имеет места.

2. О насыщенности организма аскорбиновой кислотой можно судить лишь после установления содержания последней одновременно в крови и моче.

3. Гиповитаминоз-С может быть вызван, особенно в зимне-весенний период, при недостаточном потреблении в пище свежих плодов и овощей.

Таблица 4

Выделение аскорбиновой кислоты мочой в зависимости от пищевого рациона

	Дни опыта									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Нагрузка в мг аскорбиновой кислоты									
	0	150	150	150	150	300	300	300	300	300
Количество ас-корбин. к-ты в суточной моче (мг)	0.0	0.0	6.3	4.7	2.2	4.7	26.5	50.5	87.0	135.0

В заключение в виду отсутствия в продаже уксуснокислой ртути приводим технику изготовления этого реактива по Товарницкому (16). 110 г желтой окиси ртути смешивают в склянке с притертой пробкой с 400 см³ дистиллированной воды, лишенной CO₂, туда же добавляют 60 г ледяной уксусной кислоты, тщательно взбалтывают и оставляют на 7—10 дней, время от времени основательно встряхивая. По прошествии указанного времени раствор отфильтровывают и на каждые 100 см³ фильтрата добавляют 20 см³ дистиллированной воды. Полученный 25% раствор соли сохраняется в темном месте неопределенно долгое время.

Резюме

1. Излагается метод определения аскорбиновой кислоты в крови и моче, позволяющий освободиться от восстановления индофенола посторонними редуцирующими веществами и учесть 100% имеющейся в исследуемом объекте аскорбиновой кислоты.
2. В основу метода положена обработка объекта ацетатом ртути в присутствии солей кальция, как парализатора окисления аскорбиновой кислоты, и дальнейшее восстановление сероводородом.
3. Приводятся некоторые данные для характеристики и оценки метода.

Витаминная лаборатория.
Центральный институт переливания крови.
Москва.

Поступило
27 II 1937.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Tillmans, Hirsch u. Jackish, ZS. Unters. Lebens., 136, 241 (1932).
² Harris a. Ray, Biochem. J., XXVII, 590 (1933). ³ Martini u. Bonsignore, Biochem. ZS., 273, 170 (1934). ⁴ Emmerie a. Eekelen, Biochem. J., XXVIII, № 4 (1934). ⁵ Букин и Мурри, Хим. методы определения витаминов С и А, ВАСХНИЛ (1935). ⁶ Farmer a. Abt, Proc. Soc. Expt. Biol. a. Med., 32, 9, 1625, 1649 (1935). ⁷ Fujita, Iwatake, Miyata, цитировано по Мансеау (см. 8). ⁸ Мансеау, Policard, Ferrand, Bull. soc. chim. biol., XVIII, 9—11 (1936). ⁹ Девятнин и Дорошенко, Вопросы питания, № 5 (1936). ¹⁰ Dewjatnin u. Doroschenko, Biochem. ZS., 280, 118 (1935). ¹¹ Девятнин и Дорошенко, ДАН, III, 4, 177—180 (1935). ¹² Ярусова, Вопросы питания, № 4 (1936). ¹³ Eekelen a. Emmegrie, Biochem. J., XXX, № 1 (1936). ¹⁴ Девятнин, Доклад на засед. Биохим. секц. Менделеевского о-ва, 10 I 1937. ¹⁵ West a. Luman, Science, 2178 (1936). ¹⁶ Товарницкий, Тр. Иван. обл. с.-х. оп. ст. (1934).