

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Ф.Скорины»

Кафедра физиологии человека и животных

ВИТАМИНОЛОГИЯ

**Практическое пособие
по выполнению лабораторных работ**

Гомель, 2005

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Ф.Скорины»

Кафедра физиологии человека и животных

ВИТАМИНОЛОГИЯ

**Практическое пособие
по выполнению лабораторных работ
для студентов IV курса специальности 1-31 01 01-04
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»**

Гомель, 2005

УДК 547.9 (075.8)
ББК 24.239+28.072 я 73
В 54

Авторы-составители: Т.В.Бобрик, Е.И.Тороп

Рецензент:

кафедра физиологии человека и животных учреждения образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины» 27 октября 2004 г., протокол № 2.

Витаминология. Практическое пособие по выполнению лабораторных работ / Министерство образования РБ, УО «ГГУ им.Ф.Скорины», авторы-составители: Т.В.Бобрик, Е.И.Тороп. – Гомель, 2004. – 59 с.

Практическое пособие составлено в соответствии с требованиями государственного образовательного стандарта и учебной программой курса «Витаминология». Практическое пособие включает теоретический и практический разделы, а также список литературы. Предназначено для лабораторных занятий по курсу «Витаминология». Адресовано студентам биологического факультета.

УДК 547.9 (075.8)
ББК 24.239+28.072 я 73
В 54

© Т.В.Бобрик, Е.И.Тороп, 2005

© Учреждение образования «Гомельский государственный университет имени Ф.Скорины», 2005

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Раздел I Гигиеническая оценка обеспеченности организма витаминами	6
Раздел II Жирорастворимые витамины	10
Тема 1 Витамин А	10
Тема 2 Витамин D	17
Тема 3 Витамин E	18
Тема 4 Витамин К	20
Раздел III Водорастворимые витамины	23
Тема 1 Витамин С	23
Тема 2 Витамин В ₁	35
Тема 3 Витамин В ₂	38
Тема 4 Витамин В ₃	42
Тема 5 Витамин РР (В ₅)	43
Тема 6 Витамин В ₆	45
Тема 7 Витамин В ₁₂	47
Тема 8 Витамин В _с	48
Тема 9 Витамин Н	50
Тема 10 Витамин Р	50
Приложения	55
Литература	57

ВВЕДЕНИЕ

Витамины – это низкомолекулярные органические соединения, которые необходимы в небольших количествах, организму, но не могут синтезироваться в нем или вырабатываются в ограниченном количестве. Эти вещества не выполняют пластической функции, но влияют на многочисленные обменные процессы и являются чаще всего предшественниками органических *кофакторов* (коферментов и, в том числе, простетических групп), либо, реже, предшественниками сигнальных веществ. Потребность в витаминах зависит от вида организма и возраста, пола и физиологических условий, таких как беременность, кормление грудью, физическая нагрузка и питание. Следует подчеркнуть, что витамин – что не химическое понятие: оно имеет чисто физиологический смысл.

Ежедневная потребность организма в витаминах покрывается при рациональном питании, тогда как недоедание, неправильное питание нарушение всасывания или подавление бактериального синтеза (витамины К, В₁₂, Н) ведут к *гиповитаминозу* и в экстремальных случаях, к *авитаминозу*. Дефицит витаминов обуславливает появление специфических нарушений обмена с характерными клиническими проявлениями, в результате чего происходит поражение кожи, клеток крови и нервной системы. Передозировка витаминов ведет к *гипервитаминозу* с симптомами отравления только для витаминов А и Д. Лить немного витаминов может депонироваться в организме (А, Д, Е, В₁₂).

Номенклатура витаминов основана на использовании заглавных букв латинского алфавита с нижними индексами. Одновременно, согласно предложению Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC), используют наименования, отражающие химическую природу или функцию витаминов. Физиологические названия витаминов в большинстве случаев содержат префикс "анти". Единицы измерения, характеризующие количественное содержание витаминов в пище и тканях живого организма, - мг%, мкг%, мг/кг, мкг/г и др.

Близки к витаминам так называемые *витаминоподобные вещества*, не отвечающие всем перечисленным выше признакам. К этой группе относят соединения, которые проявляют основные свойства витаминов, но отличаются тем, что их дефицит не вызывает специфического симптомокомплекса, и тем, что они не являются строго обязательными пищевыми факторами. Среди них выделим *холин, липоевую кислоту, оротовую кислоту, пангамовую кислоту (В₁₅), инозит, пара-аминобензойную кислоту, убихинон, витамин U, витамин F*.

Группу веществ, противодействующих витаминам, называют **антивитаминами**. Они затрудняют использование витаминов путем их разрушения, связывания в неактивные формы, замещения соединениями, близкими по структуре, но не обладающими их свойствами. Выделяют две группы антивитаминов. К первой группе относят энзимы образующие с витаминами комплексы, препятствующие их всасыванию (например, авидин). Антивитамины второй группы действуют как антикоферменты и могут быть отнесены к числу антиметаболитов.

В настоящем методическом пособии для каждого изучаемого в эксперименте витамина дается краткая характеристика его биохимических свойств и физиологических функций.

Практическое пособие составлено в соответствии с требованиями Государственного образовательного стандарта и учебным планом подготовки специалистов по специальности 1-310101-04 «Биология (научно-педагогическая деятельность)». Адресовано студентам IV-V курсов биологического факультета.

Практическое пособие включает теоретический и практический разделы, а также список литературы. Предназначено для практических занятий по курсу «Витаминология» кафедры физиологии человека и животных.

РАЗДЕЛ I.

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ОРГАНИЗМА ВИТАМИНАМИ

Контроль за достаточным поступлением с пищей витаминов и удовлетворением физиологических потребностей в них является одной из важнейших задач специалистов в области *нутрициологии* (витаминологии).

Таблица 1 – Методы изучения витаминной обеспеченности организма

Изучение витаминной ценности рационов и фактического потребления витаминов с пищей	Изучение витаминного статуса организма
1. Методы изучения фактического питания: <ul style="list-style-type: none">✓ расчетный;✓ анкетно-опросный;✓ весовой.	1. Оценка состояния здоровья и физического развития: <ul style="list-style-type: none">✓ соматометрические методы;✓ физиометрические методы;✓ общеклиническое и соматоскопическое обследование с выявлением микросимптомов витаминной недостаточности (гипо- и авитаминозов);✓ гематологические методы;✓ изучение заболеваемости (морбидности).
2. Химико-аналитические методы определения содержания витаминов в рационах.	2. Физиолого-биохимические тесты (прямые и функциональные).

Существуют две основные группы *методов оценки витаминной обеспеченности организма*:

1. Изучение содержания витаминов в рационах питания обследуемых контингентов населения и фактического потребления витаминов с пищей. Эта группа методов ставит своей задачей получение данных о количестве витаминов, поступающих в орга-

низм человека с пищей, без учета индивидуальных особенностей физиологических и метаболических процессов.

2. Изучение и оценка витаминного статуса организма человека по уровню адекватности функционирования физиологических и биохимических систем, эссенциальными компонентами которых являются данные витамины. Данная группа методов позволяет судить о степени насыщения организма витаминами.

І. ИЗУЧЕНИЕ ВИТАМИННОЙ ЦЕННОСТИ ПИЩЕВЫХ РАЦИОНОВ И ФАКТИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ С ПИЩЕЙ

Расчетный метод заключается в изучении потребляемого человеком продуктового набора по официальным документам (меню-раскладкам, накопительным ведомостям) с последующим расчетом по таблицам «Химического состава пищевых продуктов» содержания в них витаминов. Данные, полученные с помощью расчетного метода, дают представление о витаминной ценности используемого рациона питания, об основных пищевых источниках витаминов в питании обследуемого контингента населения. Однако, они не позволяют учесть истинное потребление витаминов обследуемыми, поскольку учет реально съеденной ими пищи отсутствует. Этому недостатка лишены весовой и, в меньшей мере, анкетно-опросный методы изучения фактического питания.

Анкетно-опросный метод заключается в изучении фактического питания населения с помощью специально разработанных анкет. Метод прост, доступен, не требует специального оборудования и может использоваться при анализе как группового, так и индивидуального питания в домашних условиях. Для оценки витаминной обеспеченности в анкеты включают вопросы о потреблении в течение дня дополнительных источников витаминов – поливитаминных препаратов, витаминизированных напитков и др.

Весовой метод заключается в строгом количественном учете (взвешивании) всех потребляемых в день продуктов и блюд. Метод трудоемкий, но дает возможность полной количественной оценки фактического питания.

При анализе потребления витаминов с пищей необходимо учитывать их распад при кулинарной и термической обработке продуктов.

Используя описанные методы, получают данные о содержании витаминов в среднесуточных рационах питания и их фактическом потреблении. Полученные данные сопоставляют с нормами среднесуточной физиологической потребности в витаминах (*приложение 1*).

Сведения о содержании витаминов при применении расчетных методов носят ориентировочный характер, что обусловлено резкими колебаниями содержания витаминов в одних и тех же продуктах в зависимости от климато-географических условий, сезона, сорта, условий хранения, последующей кулинарной и термической обработки и других факторов. Этим недостатком лишены прямые методы определения содержания витаминов, основанные на использовании *химико-аналитических методик*.

II. ИЗУЧЕНИЕ ВИТАМИННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА

1. Оценка состояния здоровья и физического развития

Комплексное изучение состояния здоровья, включающее общеклиническое обследование, оценку заболеваемости, изучение иммунологического статуса и антропометрических показателей у обследуемых является важным подходом к оценке обеспеченности организма витаминами.

Общеклиническое и соматоскопическое обследование направлено на выявление возможных микросимптомов гиповитаминозных состояний (*приложения 4, 5*).

Один из основных показателей, характеризующих состояние здоровья, – *изучение заболеваемости*, включающее учет общего числа случаев с временной утратой трудоспособности, изучение структуры заболеваемости, числа индекса здоровья коллектива (число обследуемых, не обращавшихся за медицинской помощью / общее число обследованных × 100 %).

Отклонение *антропометрических показателей* от стандартных показателей физического развития здоровых лиц могут также указывать на дефицит в питании витаминов, играющих важную роль в обеспечении нормального роста и развития.

Показатели *иммунологического* и *гематологического статуса* – чувствительные тесты, которые могут изменяться на более ранних стадиях витаминной недостаточности, чем другие показатели здоровья.

2. Физико-биохимические тесты оценки обеспеченности витаминами

Сущность этих методов заключается в прямом изучении содержания витаминов и их метаболитов в биологических жидкостях (*биохимические тесты*), либо в оценке физиологических или метаболических процессов, на реализацию которых влияют витамины (*физиологические тесты*).

Биохимические тесты:

1. Методы, основанные на определении содержания витаминов и продуктов их обмена в биологических жидкостях организма, тканях (например, *определение витамина С в моче, сыворотке крови, лейкоцитах*).
2. Методы, основанные на оценке состояния метаболических процессов, в которых принимают участие витамины (например, оценка обеспеченности витамином Е по определению *суточной экскреции креатина*, которая существенно возрастает при недостаточности этого витамина).

Физиологические тесты: исследование *проницаемости стенки сосудов* (для оценки обеспеченности организма аскорбиновой кислотой и биофлаваноидами); *оценка времени темновой адаптации* (как показатель обеспеченности организма ретинолом) и др.

РАЗДЕЛ II.

Жирорастворимые витамины

Витамин А, Д, Е, К растворяются в жирах и маслах. Они относительно стабильны при обычной температуре варки пищи, но инактивируются ультрафиолетовым светом и при окислении.

Для всасывания жирорастворимых витаминов в кишечнике необходим пищевой жир и желчь. В стенках кишечника витамины включаются в хиломикроны, после чего переносятся в печень (А, Д, К); главным местом резервирования витамина Е служит жировая ткань. В организме витамины выделяются в желчь и либо реабсорбируются, либо экскретируются с калом; некоторые метаболиты (но не сами витамины) выводятся с мочой. Избыток витаминов в организме оказывает токсический эффект (особенно витаминов А и Д).

Пищевые источники жирорастворимых витаминов – овощи с зелеными листьями, растительные масла, молочные продукты, мясо.

Тема 1. ВИТАМИН А (РЕТИНОЛ)

Ретинол – исходное вещество для ретиноидов: ретиналя, ретиноевой кислоты. Они могут образовываться из провитамина – каротина путем расщепления.

Ретиноиды встречаются в животной пище. Каротин – во многих фруктах и овощах (морковь, картофель). Ретиналь – красящее вещество зрительного пигмента родопсина. Цис-форма данной простетической группы изомеризуется в транс-форму за счет энергии поглощенного света, что инициирует лежащие в основе зрительных ощущений РР-зависимые конформационные и электрохимические процессы с участием апородопсина (опсина).

Ретиноевая кислота действует как важный фактор роста, она является одним из регуляторов клеточной дифференцировки. По механизму действия ретиноиды близки к стероидам и тиреоидным гормонам, которые связаны с регуляцией экспрессии определенных генов.

Недостаток витамина А проявляется в «куриной слепоте», в повреждении глаз и нарушении роста.

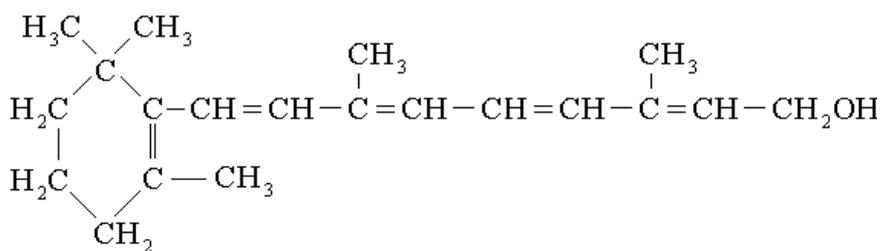


Рис. 1 –
Структурная
формула
ретинола

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на витамин А

Материалы, посуда, реактивы:

33% раствор треххлористой сурьмы в хлороформе (хранят в склянке из темного стекла, пригоден к употреблению через 6-8 часов после приготовления; срок годности – две недели);

концентрированная серная кислота;

ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа (II);

уксусный ангидрид;

рыбий жир, медицинский; употребляют только свежий препарат, т.к. старый или прокипяченный рыбий жир практически лишены витамина А; или масляный раствор витамина А;

серная кислота, концентрированная ($\rho_{20} = 1,836$);

хлороформ;

пипетки;

сухие пробирки.

А) Реакция с треххлористой сурьмой.

В сухую пробирку вносят 2-3 капли свежего рыбьего жира или масляного раствора витамина А и добавляют 1 мл раствора треххлористой сурьмы в хлороформе, перемешивают. Появляется синее окрашивание. В связи с тем, что развитию окраски мешает присутствие воды, рекомендуется в реакционную смесь добавить несколько капель уксусного ангидрида.

Б) Реакция с сульфатом железа.

В пробирку вносят 1-2 капли рыбьего жира или масляного раствора витамина А, добавляют 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа. Появляется голубое окрашивание, переходящее в розово-красное.

В) Реакция с серной кислотой.

Под воздействием концентрированной серной кислоты растворы витамина А приобретают сине-фиолетовую окраску, возникновение которой связано с водоотнимающим действием реактива. Окраска является нестойкой и быстро сменяется буроватой, вследствие образования липохрома.

1 каплю рыбьего жира растворяют в 20-25 каплях хлороформа, к раствору добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты и встряхивают. Появляется сине-фиолетовое окрашивание, которое вскоре переходит в красновато-бурое и бурое.

Лабораторная работа № 2

Определение содержания каротинов в растительных объектах

Каротины экстрагируют ацетоном или этиловым спиртом и выделяют из смеси пигментов на хроматографической бумаге. Каротины элюируют из хроматограммы петролевым эфиром или низкокипящим бензином и их содержание определяют путем колориметрирования.

Материалы, посуда, реактивы:

петролейный эфир (температура кипения 60-70° С) или бензин (температура кипения 70-80° С); ацетон или этиловый спирт, 95-96%;

хроматографическая бумага (вес 1 дм² = 0,85 г);

углекислый натрий или углекислый кальций;

азобензол, перекристаллизованный из спирта и высушенный. 145 мг препарата растворяют в 100 мл 96% этилового спирта; из данного основного раствора готовят рабочий, разбавляя его спиртом в 10

раз (в мерной колбе на 100 мл). 1 мл рабочего раствора азобензола соответствует 0,00235 мг каротина; растворы хранят в темном месте;

кварцевый песок;

концентрационный колориметр или колориметр-нефелометр;

стеклянные сосуды цилиндрической формы, высота 25-30 см, диаметр 13-15 см, с притертыми пробками или крышками;

ступки фарфоровые;

мерные цилиндры на 100 мл с притертыми пробками.

А) Экстракция каротинов

Навеску растительного материала (1-10 г в зависимости от предполагаемого содержания каротинов) растирают в ступке с ацетоном или 95-96% спиртом, добавив немного кварцевого песка и щепотку углекислого натрия или химически чистого мела (углекислого кальция) для нейтрализации кислот. Ацетон или спирт приливают порциями по 10-15 мл. Экстрагирование повторяют несколько раз. Вытяжки сливают в мерный цилиндр на 100 мл. Извлечение продолжают до получения бесцветного экстракта. Раствор в мерном цилиндре доводят ацетоном или спиртом до определенного объема (50-60-75-100 мл).

Б) Определение каротинов

Хроматографическую бумагу нарезают на полоски длиной 25 см и шириной 15 см. 0,5-1 мл ацетонового (или спиртового) раствора пигментов наносят (в виде полосы) на полоску хроматографической бумаги на расстоянии 4 см от ее нижнего края. Бумагу подсушивают на воздухе (лучше всего с помощью фена) в затененном месте и затем сворачивают в однослойную трубку, верхний конец которой сшивают или скрепляют пластмассовой скрепкой. Трубку ставят на дно стеклянного сосуда, куда заранее был налит петролейный эфир или низкокипящий бензин слоем в 2-3 см (он должен быть ниже места нанесения раствора пигментов на бумагу). Через 20-30 мин. бумажную трубку вынимают из сосуда. Вырезают полоску бумаги, окрашенную в желто-оранжевый цвет (она находится сразу же за фронтом подъема растворителя), измельчают ее (нарезают) в стеклянный бюкс или стаканчик и извлекают каротины небольшими порциями (по 1-2 мл) петролейного эфира или бензина, повторяя экстрагирование до получения бесцветного раствора. Раствор каротинов доводят этими же растворителями до определенного объема (например, 10-20 мл) и колориметрируют, употребляя в качестве стандартного рабочий раствор азобензола (14,5 мг в 100 мл). Содержание каротина (в миллиграммах на 100 г продукта) X рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,00235 \cdot 100 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot D_1}{V_2 \cdot n \cdot D_2}$$

где V_1 — объем ацетонового (спиртового) экстракта пигментов в мерном цилиндре, мл;

V_2 — объем ацетонового (спиртового) экстракта, нанесенный на бумагу, мл;

V_3 — объем раствора каротинов в петролейном эфире или бензине, взятый для колориметрирования, мл;

D_1 — показания шкалы колориметра для стандартного раствора;

D_2 — показания шкалы колориметра для исследуемого раствора (среднее из 3-4 определений);

n — навеска растительного материала, г.

При колориметрировании каротинов пользуются синим светофильтром.

Лабораторная работа № 3

Спектрофотометрический метод определения содержания ретинола в рыбьем жире

Материалы, посуда, реактивы:

рыбий жир (медицинский);

едкое кали, 50% водный раствор;

этиловый спирт, 95%, не содержащий альдегидов. Для проверки на альдегиды к 10 мл спирта добавляют 10 мл воды, 1 мл 2 % раствора азотнокислого серебра и (по каплям) раствор аммиака до исчезновения образующегося вначале осадка; смесь ставят в темное место на 12 часов; она должна оставаться бесцветной и прозрачной;

этиловый спирт абсолютный, 99,8% (по объему). Для получения его к 95% спирту-ректификату прибавляют негашеную известь в таком количестве, чтобы куски ее выступали над поверхностью жидкости в колбе. Соединяют колбу с обратным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой с негашеной известью, осторожно нагревают на водяной бане (при температуре

не выше 75° С) в течение часа и затем оставляют стоять на два дня. Через два дня отгоняют спирт в колбу Бунзена, которую плотно соединяют с холодильником. Отводную трубку колбы соединяют с хлоркальциевой трубкой. Концентрация такого спирта составляет около 99,5%. Для более полного удаления влаги к 99,5% спирту добавляют твердый едкий натр или едкое кали (10 г на 1 л) и перегоняют, отбрасывая начальную и конечную фракции;

диэтиловый эфир;

сернокислый натрий, прокаленный, сохраняют в сосуде с притертой пробкой;

спектрофотометр;

делительные воронки;

колбы конические емкостью 100 мл;

колбы для отгонки;

баня водяная;

баллон с азотом.

Ход работы:

В конической колбе емкостью 100 мл отвешивают на аналитических весах около 1 г жира, прибавляют 30 мл этилового спирта, не содержащего альдегидов, и 3 мл 50% раствора едкого кали. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и ставят на 30 мин. в горячую водяную баню (85-90° С). После омыления колбу охлаждают, добавляют 50 мл воды и содержимое переносят в делительную воронку. Неомыляемую фракцию три раза экстрагируют диэтиловым эфиром, при этом первый раз берут 50 мл его, а во второй и третий – по 30 мл. Все эфирные вытяжки сливают в другую делительную воронку и несколько раз промывают водой до полного удаления остатков щелочи (проба с фенолфталеином). Для обезвоживания к промытой эфирной вытяжке добавляют 8 г прокаленного сернокислого натра и ставят на 30 мин. в темное место, время от времени встряхивая, после чего фильтруют через сухой бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сернокислый натрий на фильтре несколько раз промывают диэтиловым эфиром (берут каждый раз по 10 мл), который фильтруют в ту же колбу. Эфир отгоняют на водяной бане при температуре до 40° С (если отгонку ведут в токе азота, температуру бани можно повысить до 47-50° С).

Примечание. Отгонку эфира рекомендуется вести в токе азота, учитывая легкую окисляемость ретинола; в студенческой работе, рассчитанной на ознакомление с методом, отгонку допускается проводить на воздухе (**под тягой!**), соблюдая противопожарные мероприятия.

После отгонки эфира неомыляемый остаток растворяют в абсолютном этиловом спирте до получения раствора, содержащего в 1 мл 8 международных единиц (МЕ) витамина А (при изготовлении раствора учитывают, что в 1 г невитаминизированного рыбьего жира должно содержаться не менее 350 МЕ витамина А; в 1 г витаминизированного рыбьего жира содержится 1000 МЕ ретинола). Изменяют оптическую плотность раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длинах волн 311, 324,5 и 334 нм.

Содержание витамина А в международных единицах x в 1 г жира вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_{\text{испр}} \cdot V}{Q \cdot 100} \cdot 1850,$$

где $D_{\text{испр}} = 7 D_{324,5} - 2,912 D_{311} - 4,088 D_{334}$;

$D_{324,5}$, D_{311} , D_{334} – оптические плотности раствора при длинах волн 324,5, 311 и 334 нм соответственно;

V — разведение, мл;

Q — навеска жира, г;

1850 — коэффициент перевода в международные единицы.

Одна международная единица витамина А равна 0,3 мкг.

Лабораторная работа № 4

Определение времени темновой адаптации (физиологический тест)

Повышение световой чувствительности зрительного анализатора в условиях малой освещенности в значительной степени зависит от скорости регенерации зрительного пурпура, протекающей с участием витаминов А и В₂. При недостаточном обеспечении организма *ретинолом* и *рибофлавином* продолжительность темновой адаптации возрастает вплоть до потери способности видеть при сумеречном освещении.

Установлено, что максимум световой чувствительности глаза при ярком освещении находится в желто-зеленой части спектра, а при низкой освещенности смещается в зеленую область. Поэтому при одинаковой низкой освещенности, когда цвета неразличимы, поверхности, окрашенные в сине-зеленые тона, воспринимаются как более светлые, чем поверхности синего и красного цветов. На этом явлении смещения максимума световой чувствительности (*феномен Пуркинье*) основаны методы определения темновой адаптации.

Ориентировочно определение времени темновой адаптации можно провести упрощенным способом с помощью *таблиц Кравкова - Пуркинье* (плотный картон 20 x 20 см оклеен черной бумагой; отступя 4 см от края, наклеены по углам цветные квадраты (3 x 3 см) из голубой, желтой, красной и зеленой бумаги). В затемненной комнате таблицу размещают на уровне глаз обследуемого на расстоянии 40-50 см.

При нормальной функции темновой адаптации обследуемый через 40-50 секунд отмечает появление светлого квадрата на месте желтого, затем светло-серого на месте голубого квадрата. Красный и зеленый квадраты в этих условиях не видимы.

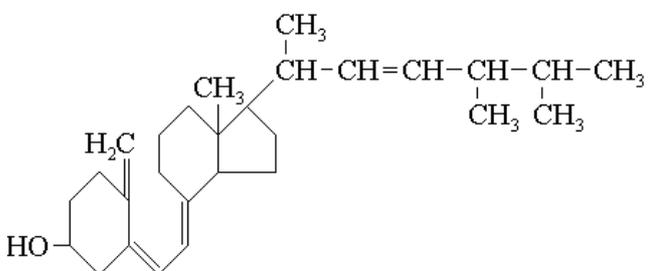
При пониженном светоощущении на месте желтого квадрата может появиться светлое пятно, голубой же квадрат останется неразличим.

Вращая таблицу, проверяют правильность ответов испытуемых. Для удобства контроля на противоположной стороне таблицы на месте проекции желтого и голубого квадратов наклеивают соответственно одно или два утолщения из картона, легко прощупываемых обследователем в темноте.

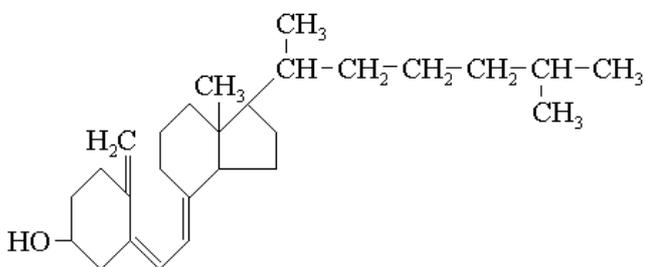
Тема 2. ВИТАМИН Д (ЭРГОКАЛЬФЕРОЛ)

Соединения, которые обозначаются как витамин Д, относятся к одной из групп изопреноидов – стероидам. Провитаминными формами являются некоторые стеролы (7- дегидрохолестерол, эргостерол), каждый из которых при действии УФ лучей превращаются так называемый кальцитриол – гормон, формирование структуры которого завершается в печени и почках.

Кальферол активирует определенные биологические процессы по механизму, сходному с механизмом действия стероидных гормонов. Основная биологическая роль кальтриола – это стимуляция всасывания кальция и фосфора в кишечнике, которые необходимы для образования кристаллов гидроксиапатита, откладывающихся в коллагеновых фибриллах кости. Он также имеет отношение к реабсорбции кальция почками и мобилизации кальция из костей.



a



б

Рис. 2 –
Структурные
формулы
витамина D₂ (а)
и D₃ (б)

При недостатке витамина Д замедляется формирование новых костей и нарушается обновление костной ткани, что приводит к рахиту (дети) и остеомалации (взрослые). Витамин Д не выделяется с мочой, а его избыток в организме оказывает токсический эффект.

Лабораторная работа

Качественные реакции на витамин D

Выделено несколько близких по химической природе витаминов D, являющихся производными *циклопентанопергидрофенантрена* (D₁, D₂ и D₃). В продуктах (рыбий жир, коровье масло) чаще всего встречается витамин D₃.

Материалы, посуда, реактивы:

<i>анилин;</i>	<i>пробирки;</i>
<i>соляная кислота, концентрированная;</i>	<i>пипетки;</i>
<i>1% раствор брома в хлороформе (1:60);</i>	<i>часовые стекла;</i>
<i>рыбий жир, витаминизированный;</i>	<i>спиртовки;</i>
<i>или масляный раствор витамина эрго-</i>	<i>стеклянные палочки.</i>
<i>кальциферола.</i>	

А) Реакция с анилином (под тягой).

К 1 мл витаминизированного рыбьего жира прибавляют 4-5 мл анилина и 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Содержимое пробирки нагревают до кипения и кипятят 20-30 с. Жидкость принимает красную окраску.

Б) Реакция с бромом (под тягой).

На сухое часовое стекло вносят 2-3 капли витаминизированного рыбьего жира или масляного раствора витамина D₂, добавляют (под тягой) 3-4 капли 1% раствора брома в хлороформе, размешивают. Через некоторое время появляется зеленое или зеленовато-голубое окрашивание.

Тема 3. ВИТАМИН Е (ТОКОФЕРОЛ)

Витамин Е выполняет две метаболические функции: антиоксидантную и играет специфическую роль в метаболизме селена. Токоферолы наряду с супероксиддисмутазой снижают токсичность кислорода, улавливая супероксидный анион-радикал, прерывают цепные реакции окисления остатков ненасыщенных жирных кислот перекис-

ными радикалами в мембранных структурах клетки. Второй защитой мембран от разрушающего действия перекисей служит глутатионпероксидаза, в состав которой входит селен.

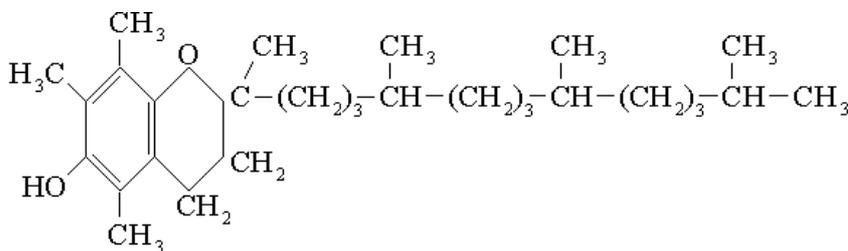


Рис.3 –
Структурная
формула
 α -токоферола

Витамин Е исключительно синтезируется растениями, особенно много его в зародышах пшеничных зерен.

Лабораторная работа

Качественные реакции на витамин Е

Материалы, посуда, реактивы:

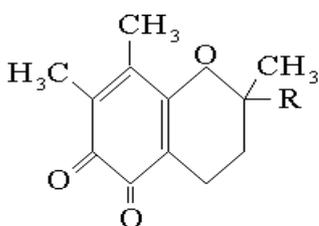
0,1% раствор α -токоферола в 96% спирте;

азотная кислота, концентрированная;
0,2% спиртовой раствор хлорного железа (0,2 г FeCl_3 растворить в 100 мл абсолютного этилового спирта; хранят в темном месте);

0,5% спиртовой раствор ортофенантролина;

пробирки;
пипетки;
спиртовки.

А) Реакция с азотной кислотой.



Реагируя с сильными окислителями, например с концентрированной азотной кислотой, α -токоферол превращается в *o*-токоферилхинон (*R* – остаток фитола), который затем образует соединение, окрашенное в красный или желтовато-красный цвет.

В сухую пробирку вносят 3-4 капли спиртового раствора α -токоферола, **осторожно** добавляют 8-10 капель концентрированной

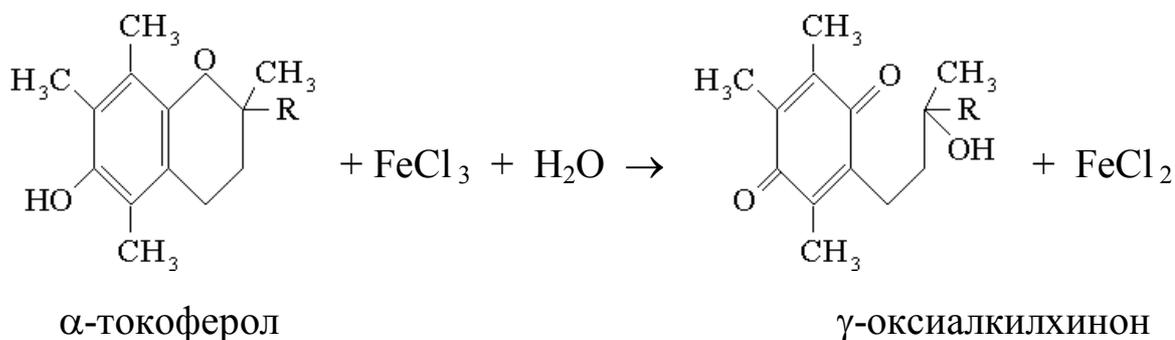
азотной кислоты и пробирку слегка встряхивают. Через 1-2 минуты образующаяся эмульсия расслаивается, причем верхний маслянистый слой приобретает красное или желтовато-красное окрашивание.

Реакция протекает бурно, поэтому рекомендуется азотную кислоту прибавлять медленно, по стенке пробирки и проводить реакцию в **вытяжном шкафу**.

Б) Реакция с хлорным железом.

Токоферолы окисляются хлорным железом, которое при этом восстанавливается до FeCl_2 . Ион Fe^{2+} , реагируя с ортофенантролином, образует комплексный ион $\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3^{2+}$, благодаря которому раствор окрашивается в красный цвет.

При окислении токоферолов хлорным железом происходит разрыв пиранового кольца с образованием γ -оксиалкилхинона:



К 1-2 мл спиртового раствора концентрата витамина Е добавляют 1 мл раствора ортофенантролина и по каплям раствор хлорного железа до появления красного окрашивания.

В пробирку вносят несколько капель спиртового раствора α -токоферола, прибавляют равное количество раствора FeCl_3 , перемешивают и нагревают. Раствор окрашивается в красный цвет.

Тема 4. ВИТАМИН К (АНТИГЕМОМОРРАГИЧЕСКИЙ, ФИЛЛОХИНОН)

Содержание бактериального менахинона (витамина K_2) в животных тканях может быть пополнено менохиноном, образующимся из растительного филохинона (витамина K_1). Обе формы по своей химической природе являются производными 2-метил-1,4-нафтохинона.

Недостаточность витамина К приводит к геморрагической болезни новорожденных, у взрослых нарушается процесс свертывания крови. В молекулярных механизмах нормально протекающих физиологических процессов участвует К-зависимая карбоксилаза, катализирующая посттрансляционную модификацию факторов свертывания крови II, VII, IX, X путем – карбоксилирования глутаминовых остатков. В присутствии Ca^{2+} дальнейшая модификация полипептидных цепей приводит к образованию тромбина, что важно для свертывания крови.

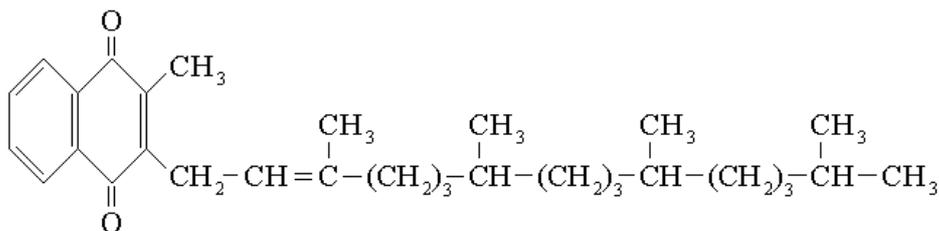


Рис. 4 –
Структурная
формула
витамина К

Свертывание крови можно замедлить антогонистами витамина К (например производными кумарина), что используется в терапевтических целях.

Лабораторная работа

Качественные реакции на витамин К

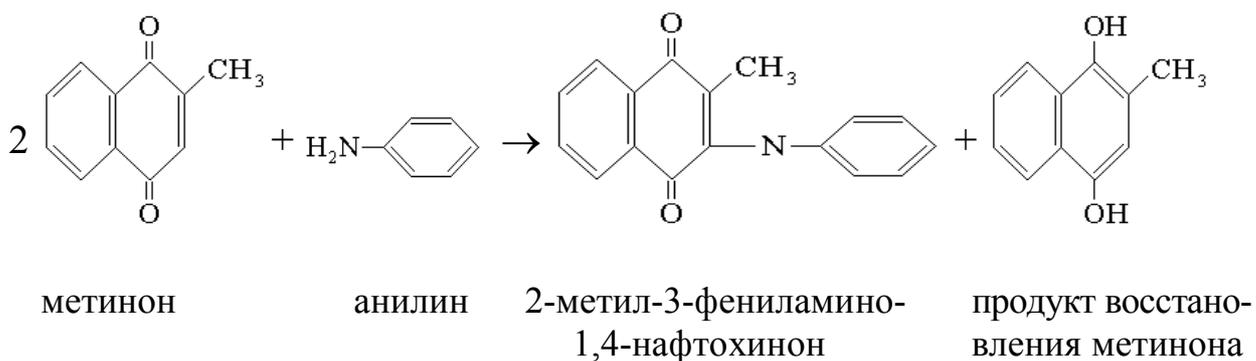
Витамин К₁, выделенный из листьев люцерны, капусты, крапивы и других растений, является 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохиноном. Витамин К₂ выделен из рыбной муки.

Материалы, посуда, реактивы:

0,1% спиртовой раствор викасола (производного витамина К ₁ растворимого в воде).	анилин;
0,1% водный раствор викасола; или метинон, 0,2% раствор в этиловом спирте;	0,025% раствор цистеина;
	10% раствор гидроксида натрия NaOH;
	пробирки;
	пипетки.

A) Реакция с анилином

2-метил-1,4-нафтохинон (метинон) с анилином образует 2-метил-3-фениламино-1,4-нафтохинон, обладающий красной окраской:



К 1 мл раствора 0,1% водного раствора викасола или 0,2% спиртового раствора метинона добавляют 6-8 капель анилина и взбалтывают.

Содержимое пробирки приобретает красную окраску.

Б) Реакция с цистеином

В сухую пробирку вносят 0,5 мл 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 2-3 капли 0,025% раствора цистеина и 1-2 капли 10% раствора гидроксида натрия.

Жидкость окрашивается желтый или в лимонно-желтый цвет.

РАЗДЕЛ III.

Водорастворимые витамины

Водорастворимые витамины включают витамины группы В, витамины С и Н и проблематично (нет строгих доказательств) – витамин Р.

Водорастворимые витамины всасываются в кишечнике и поступают в кровь воротной вены печени. Единственное исключение составляет витамин В₁₂, для всасывания которого требуется внутренний фактор, синтезируемый париентальными клетками желудка. Витамины задерживаются в организме в связанном виде с ферментами или транспортными белками, а избыток выделяется с мочой, когда, их содержание в плазме превышает "почечный" порог. Небольшой резерв свободных витаминов постоянно должен пополняться приемом пищи. Истощение самого заметного резерва, присущего витамину В₁₂, может наступить через несколько лет, тогда как для витамина С это происходит через несколько месяцев. Недостаточность водорастворимых витаминов приводит к поражению пищеварительной и нервной системы, кожи, а также клеток крови.

Избыток водорастворимых витаминов не всегда токсичен. Исключением являются никотиновая кислота (но не никотинамид), приводящая к расширению кровеносных сосудов (покраснение лица), пиридоксин (5 г в сутки), вызывающий сенсорную атаксию и дисфункцию сенсорных нервов, а также аскорбиновая кислота, при приеме больших доз которой появляется понос, образование оксалатных почечных камней и ряд других вредных симптомов.

За некоторым исключением, потребности в водорастворимых витаминах покрываются приемом адекватных количеств следующих пищевых продуктов: цельные зерна хлебных злаковых, бобовые, овощи с зелеными листьями, мясо и молочные продукты.

Тема 1. ВИТАМИН С (АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

L-аскорбиновая кислота образуется из L-гуланолактона под действием особого флавопротеина у растений и многих животных, кроме человека.

Недостаток витамина С проявляется как цинга с характерными повреждениями соединительной ткани, кровоизлияниями и выпаде-

нием зубов. В организме аскорбиновая кислота служит восстановителем в различных реакциях (большой частью гидроксилирования). Это касается синтеза калагена, катехоламинов и желчных кислот.

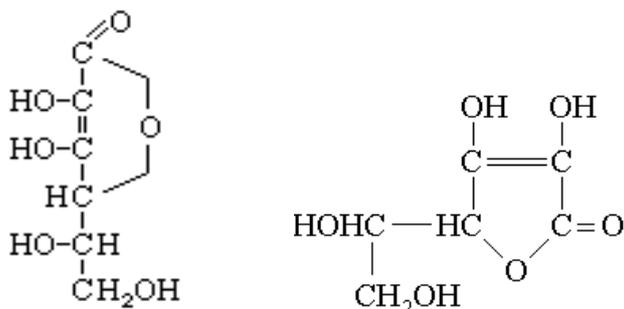


Рис. 5 – Структурные формулы аскорбиновой кислоты (варианты изображения)

Быстрое разрушение витамина С в растительных тканях при их повреждении инициируется ферментом аскорбатоксидазой. Образующаяся при этом дегидроаскорбиновая кислота является неустойчивым соединением. Она легко гидролизуется с образованием 2,3-дикетогулоновой кислоты, которая энзиматически разрушается далее. Этот процесс противодействует обратному восстановлению дегидроаскорбиновой кислоты в присутствии глутатиона, НАДН и дигидроаскорбинатредуктазы, что наряду с неферментативным окислением аскорбиновой кислоты молекулярным кислородом при переработке сырья и при приготовлении пищи ведет к значительному снижению содержания витамина в пище.

Методы оценки обеспеченности человека и животных витамином С

При оценке С-витаминной обеспеченности организма наибольшее распространение получили прямые методы определения аскорбиновой кислоты в крови, моче и органах:

1. *Исследование плазмы и лейкоцитов периферической крови.* Концентрация аскорбиновой кислоты в плазме крови отражает скорость метаболической утилизации витамина непосредственно в данный момент, а в лейкоцитах – характеризует стабилизированный уровень ее метаболического использования тканями.

2. Установление *величины суточного выделения* аскорбиновой кислоты *с мочой* (табл. 2).

3. Определение *миллиграмм-часовой экскреции витамина с мочой*. На содержание аскорбиновой кислоты исследуется не определенный объем мочи, а учитывается ее выделение с мочой за известный промежуток времени – утром, натощак, при ограниченной подвижности.

4. *Нагрузочные методы исследования* основаны на регистрации кривых изменения концентрации аскорбиновой кислоты в крови и моче через определенный промежуток времени после введения стандартных доз витамина. Эти методы не нашли широкого распространения в силу их трудоемкости и отсутствия в настоящее время доказательств оптимальности обеспечения организма витамином С при так называемом насыщении.

5. *Концентрация аскорбиновой кислоты в органах и тканях* является основным показателем для экспериментальных животных.

6. «*Языковая проба*» – определение времени обесцвечивания 2,6-дихлорфеноиндофенола, наносимого на дорсальную поверхность языка – применяется для массовых ориентировочных обследований больших групп населения.

Концентрация витамина в плазме крови (мг%) и выведение его с мочой (мг/ч) находятся в тесной зависимости и являются хорошим показателем обеспеченности рациона витамином.

Таблица 2 – Содержание аскорбиновой кислоты в организме в зависимости от степени насыщения его витамином С

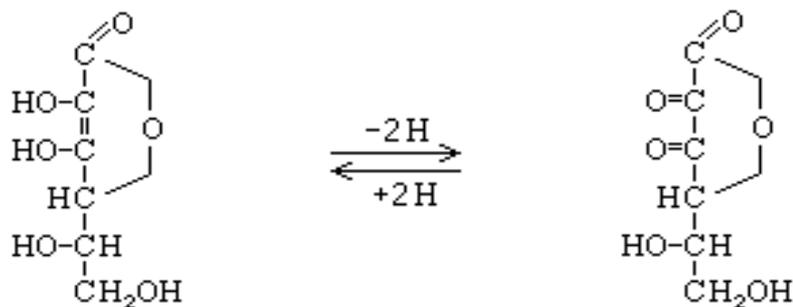
Степень насыщения	плазма	лейкоцит	% выделения с мочой витамина С после нагрузки
	мг %		
Высокая	0,7 – 1,2	20 – 30	60 – 80
Пониженная	0,1 – 0,6	10 – 14	20 – 60
Низкая	< 0,1	< 10	< 20

Существуют также косвенные методы оценки обеспеченности организма витамином С. Они базируются на более общих неспецифических показателях: фагоцитарная реакция, уровень гемоглобина, содержание эритроцитов, резистентность капилляров. Их использование ограничивается экспериментами со строго отобранными контрольными группами и не всегда убедительно.

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на витамин С

По химическому строению аскорбиновая кислота является 2,3-ендиол-L-гулоно-1,4-лактоном. Характерным ее свойством является способность к окислению. При слабом окислении аскорбиновая кислота может переходить в дегидроаскорбиновую кислоту, которая в свою очередь может снова восстанавливаться в аскорбиновую кислоту:



L-аскорбиновая кислота

L-дегидроаскорбиновая кислота

Способность аскорбиновой кислоты к окислению используется для качественного и количественного ее определения.

Материалы, посуда, реактивы:

аскорбиновая кислота кристаллическая;

0,002 % раствор аскорбиновой кислоты;

сок картофеля или капусты (клубень картофеля или часть качана капусты натирают на терке из нержавеющей стали; растертую массу отжимают через марлю, сложенную в два слоя);

10 % раствор гексацианоферрата (III) калия (свежеприготовленный на холоду);

10 % раствор хлорида железа (III);

5 % раствор уксусной кислоты;

0,02 % раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (свежеприготовленный);

5 % раствор гидроксида калия;

0,01 % раствор метиленовой сини;

5 % раствор гидрокарбоната натрия;

10 % раствор нитрата серебра;

1 % раствор иодида калия;

1 % раствор крахмала;

2 % раствор соляной кислоты;

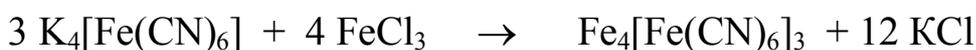
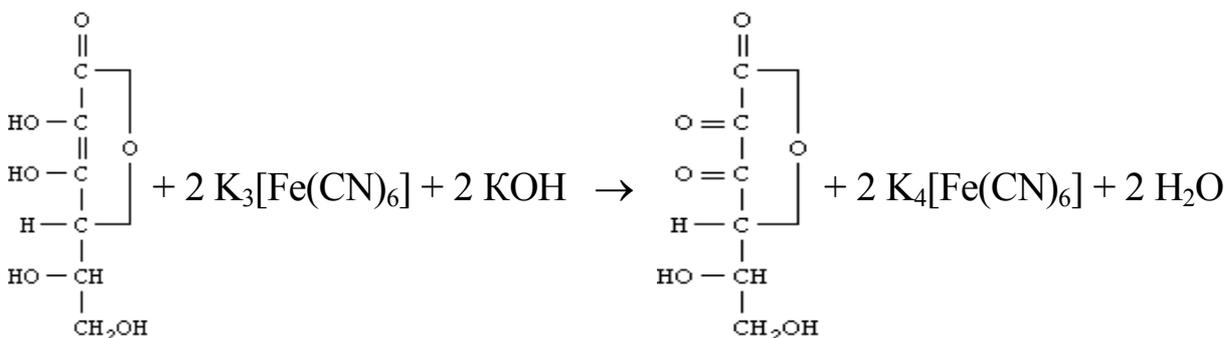
0,1 н раствор иодата калия;

штатив с пробирками.

А) Взаимодействие с красной кровяной солью

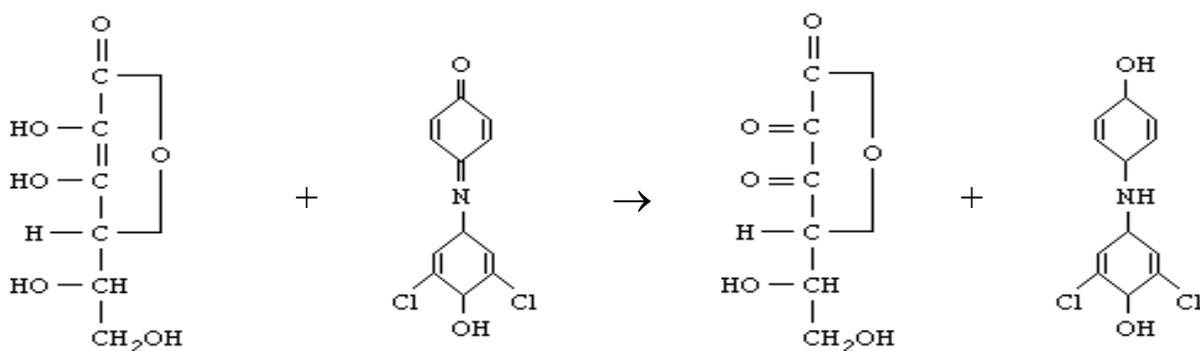
К 5 мл 0,02 % раствора аскорбиновой кислоты добавляют по 0,1 мл 10 % раствора красной кровяной соли $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 % раствора гидроксида калия KOH и каплю 10 % раствора хлорида железа (III) $FeCl_3$.

При подкислении раствора появляется сине-зеленое окрашивание и при стоянии образуется синий осадок берлинской лазури $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. В контрольной пробирке смешивают воду с каплей 10 % раствора красной кровяной соли $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и каплей 10 % раствора хлорида железа (III) FeCl_3 . Появляется бурое окрашивание жидкости, обусловленное образованием железосинеродистой соли окисного железа.



Б) Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

2,6-дихлорфенолиндофенол – индикатор, имеющий в щелочной среде синюю окраску благодаря синей окраске своего аниона, а в кислой – розовую (розовый цвет имеют недиссоциированные молекулы). Восстановленная форма – бесцветна.



АК

окрашенная форма
2,6-дихлорфенолиндофенола

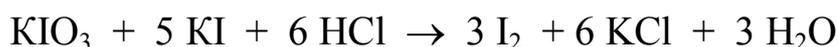
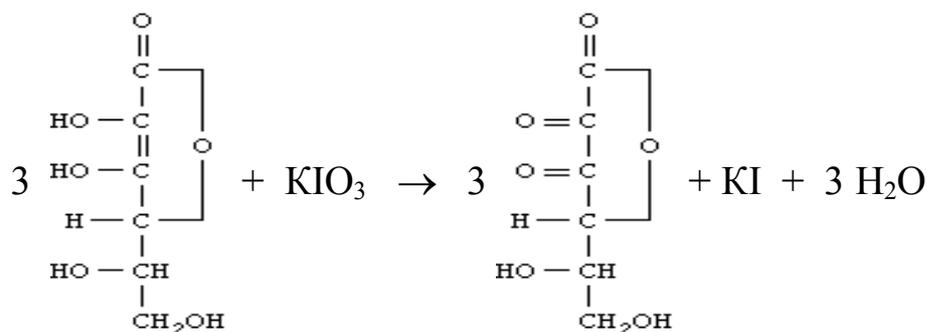
ДАК

бесцветная
лейкоформа

К 0,02 % раствору аскорбиновой кислоты добавляют по каплям свежеприготовленный 0,02% раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола – происходит обесцвечивание синего раствора. Далее раствор аскорбиновой кислоты подкисляют 5 % раствором уксусной кислоты CH_3COOH и добавляют по каплям 0,02 % раствор

Д) Реакция с иодатом калия

К 2 мл свежееотжатого сока картофеля или капусты прибавляют 0,5 мл 1 % раствора иодида калия, 1 мл раствора крахмала, 1 мл 2 % раствора соляной кислоты. К полученному раствору добавляют 0,1 н раствор иодата калия до появления стойкого слабо синего окрашивания:



Каждую из приведенных качественных реакций необходимо провести параллельно в двух пробирках, одна из которых содержит раствор аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде, вторая – свежееотжатый сок капусты или картофеля. Поскольку в биологических жидкостях АК достаточно неустойчива, реакции необходимо проводить сразу после получения сока.

Лабораторная работа № 2

Определение витамина С в моче

Материалы, посуда, реактивы:

5 % раствор уксусной кислоты;
0,0005–0,001 н раствор 2,6-дихлор-
енолиндофенолята натрия (50-
100 мг на 100 мл раствора);
0,001 н раствор соли Мора;
0,01 н раствор перманганата ка-
лия;

0,1 н раствор перманганата калия
(для получения 0,01 н раствора).
щавелевокислый натрий, х.ч.
насыщенный раствор щавелево-
кислого аммония (7 г х.ч. реактива
на 100 г дистиллированной воды).

А) Титрование мочи

Измеряют объем собранной мочи и фильтруют ее. 2 мл профильтрованной мочи титруют 0,0005 – 0,001 н раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до стойкого розового окрашивания. Если окраска мочи мешает титрованию, ее разбавляют в 2-5 раз 5 % раствором уксусной кислоты и берут для титрования также 2 мл (при малой концентрации АК для титрования можно взять большее количество мочи). Для «холостого» опыта используют 2 мл 5 % раствор уксусной кислоты. Титрование проб проводят в 3 повторностях сразу после взятия мочи.

Содержание АК в моче, собранной натошак, определяют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot v \cdot g \cdot 60 \cdot 0,088}{v_1 \cdot t},$$

где X – количество АК, выделенное с мочой за 1 час, мг;

a – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование мочи, мл;

b – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование в холостом опыте, мл;

T – поправка к титру раствора индикатора (проверяют в дни работы по 0,01 н раствору соли Мора, титр которого в свою очередь устанавливают один раз в 3-4 недели по 0,01 н раствору перманганата калия);

v – общий объем мочи, мл;

v_1 – объем мочи, взятый для титрования, мл;

0,088 – коэффициент для перевода полученных результатов в весовые единицы (1 мл 0,001 н раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг АК);

t – промежуток времени, за который собрана моча, мин;

g – разведение.

Содержание АК в моче, собранной за сутки (в мг), вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot v \cdot 0.088}{v_1},$$

где v – общий объем мочи, собранной за сутки, мл;

v_1 – количество мочи, взятое для титрования, мл.

В) Установка поправки к титру краски Тильманса

Отмерить в стаканчик 10 мл раствора краски Тильманса, добавить 3-5 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония или натрия и титровать солью Мора из микробюретки до перехода синего цвета краски Тильманса в соломенно-желтый (нерезкий переход окраски, появление бурых тонов свидетельствует о порче краски).

Поправку (Т) на титр 2,6-дихлорфенолиндофенола вычисляют по формуле:

$$T = V_1 \cdot V_2 / V_3,$$

Где V_1 – объем соли Мора, израсходованный на титрование 10 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл;

V_2 – объем 0,01 н раствора перманганата калия, затраченный на титрование 10 мл соли Мора, мл;

V_3 – объем 0,01 н раствора перманганата калия, пошедший на титрование 10 мл точно 0,01 н раствора щавелевой кислоты, мл.

Лабораторная работа № 3

Определение витамина С в крови

Материалы, посуда, реактивы:

5 % раствор метафосфорной кислоты (готовят на бидистиллированной воде);	щавелевокислый натрий;
0,0005 н раствор натриевой соли 2,6-дихлоренолиндофенола (0,11 мг индикатора растворить в 1 л биди-стиллированной воды);	центрифуга;
	фарфоровые кюветы для титрования;
	специальная микробюретка для титрования.

Ход работы:

Кровь берут пипеткой (не менее 0,5 мл) в центрифужную пробирку, стенки которой покрыты легким слоем щавелевокислого натрия или калия, размешивают стеклянной палочкой и центрируют 20-30 минут при 3000 оборотов в минуту.

Из полученного центрифугата (плазмы крови) берут пипеткой 0,1-0,5 мл в сухую центрифужную пробирку, прибавляют той же

пипеткой равное количество дистиллированной воды (промывая таким образом пипетку) и двойное количество свежеприготовленного 5% раствора метафосфорной кислоты. Размешивают и центрифугируют в течении нескольких минут.

Пример: 0,2 мл плазмы + 0,2 мл дистиллированной воды + 0,4 мл 5 % раствора метафосфорной кислоты.

Плазму, освобожденную от белка, титруют краской Тильманса (0,0005 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола) из специальной микробюретки. При титровании легкие повороты винта двигают краску по бюретке. Медленно вытекая, краска образует на кончике бюретки капли, которые приходится снимать, дотрагиваясь до нее краем стенки сосуда, в котором находится титруемая жидкость.

Титрование следует производить обязательно на белом фоне в небольших углублениях (около 1 мл) молочного стекла или фарфора. Для титрования берут 0,1-0,5 мл плазмы, в зависимости от количества имеющегося материала, с расчетом, чтобы его хватило не менее чем на два параллельных титрования.

Холостой опыт производится с раствором метафосфорной кислоты и дистиллированной воды в соответственном объеме.

Формула вычисления полученных результатов:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0,088 \cdot 4 \cdot 100}{v},$$

где X – содержание АК в плазме крови, мг% (миллиграмм-проценты);
 a – объем краски Тильманса, затраченный на титрование плазмы, мл;
 b – объем краски Тильманса, израсходованный на титрование в холостом опыте, мл;
 T – поправка на титр краски Тильманса;
 4 – разведение;
 $0,088$ – число миллиграммов АК, соответствующее 1 мл затраченного 0,001 н раствора индикатора;
 v – количество плазмы, взятой для титрования, мл.

Вычисляют поправку на титр индикатора (стр. 31).

Лабораторная работа № 4

Количественное определение витамина С в растительном материале

Материалы, посуда, реактивы:

картофель, лимон, капуста свежая, киви;	микробюретка на 5 мл;
5 % раствор соляной кислоты HCl;	пипетки на 5 и 20 мл;
0,001 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола;	конические колбы на 50 и
0,1 % раствор аскорбиновой кислоты;	100 мл;
0,001 н раствор иодноватокислого калия;	стаканы на 100 мл;
иодид калия KI;	мерный цилиндр на 250 мл;
1 % раствор крахмала – индикатора;	мерные колбы на 100 мл;
5 % раствор иодистого калия;	воронка;
3 % раствор пероксида водорода H ₂ O ₂ ;	ступка фарфоровая.
кварцевый песок;	

А) Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола

Установку титра приблизительно 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола производят по аскорбиновой кислоте (АК) в день работы. 1 мл 0,1% раствора АК растворяют в 25 мл 2 % раствора серной кислоты.

5 мл этого раствора титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания. Отмечают затраченный на титрование объем реагента (*a*, мл). Такой же объем раствора АК титруют из другой микробюретки 0,001 н раствором иодноватокислого калия с прибавлением в колбочку перед титрованием нескольких кристаллов (не более 0,1 г) иодида калия и 5 капель 1% раствора крахмала. Титрование ведут осторожно до появления едва заметного синего окрашивания и отмечают затраченный на титрование объем (*b*, мл).

В первом и во втором случае были оттитрованы одинаковые объемы АК, следовательно, количества затраченных иодида калия и 2,6-дихлорфенолиндофенола эквивалентны друг другу. 1 мл 0,001 н раствора иодида калия эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты (молекулярный вес аскорбиновой кислоты – 176, а грамм-эквивалент – 88). Отсюда:

$$0,088 \cdot b = T \cdot a, \text{ тогда } T = 0,088 \cdot b / a,$$

где *T* – титр 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте.

Б) Приготовление экстракта из растительного материала

Нарезают исследуемый материал (картофель, капусту) мелкими кусочками и отвешивают около 10 г материала. Переносят навеску в ступку и тщательно растирают с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя небольшими порциями 5 % раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. С помощью воронки смесь количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 5 % раствором хлороводородной кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу. Всего затрачивают 50 мл 5 % раствора хлороводородной кислоты (конечная ее концентрация в растворе равна 2,5 %).

Содержимое мерной колбы тщательно перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой. После этого фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

В) Определение содержания аскорбиновой кислоты в растительном материале

В две конические колбочки на 50 мл приливают по 10 мл полученного растительного экстракта. В одной из проб разрушают витамин С путем добавления нескольких капель пероксида водорода и кипячения. Содержимое колб титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (три повторности). При наличии витамина С раствор обесцвечивается, а при дальнейшем прибавлении индикатора раствор окрашивается в розовый цвет. В пробе, где витамин С был разрушен, обесцвечивание не происходит, и даже от 1-2 капель индикатора появляется розовое окрашивание.

Расчет содержания аскорбиновой кислоты (P) в исследуемом материале производится по следующей формуле:

$$P = 100 \cdot a \cdot V \cdot T / m \cdot n ,$$

где a – затраченный объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола при титровании, *мл*;

V – объем экстракта (*100 мл*);

T – титр 2,6-дихлорфенолиндофенол в *мг* аскорбиновой кислоты;

m – навеска исследуемого материала, *г*;

n – объем титруемого раствора (*10 мл*).

В результате находят количество витамина С в мг на 100 г исследуемого продукта. По данному методу определяется только восстановленная форма аскорбиновой кислоты.

Лабораторная работа № 5

Исследование резистентности капилляров кожи (физиологический тест)

Резистентность капилляров крови (РКК) зависит от обеспеченности организма *аскорбиновой кислотой* и *рутином*, участвующих в регуляции коллоидного состояния межклеточных субстанций. Этот показатель оценивают по появлению мелких кровоизлияний на ограниченном участке кожи в месте механического воздействия (создание избыточного или отрицательного давления).

Обнажив предплечье, на верхнюю треть плеча накладывают манжету тонометра. В манжете создают давление в 200 мм ртутного столба в течение 3 минут. РКК оценивается на участке дозированной нагрузки на капилляры кожи (под манжетой). Кровоизлияния подсчитывают с помощью лупы. Если этому мешает гиперемия, то целесообразно участок исследования слегка сдавить предметным стеклом: на анемированной коже геморагии выступают отчетливее.

РКК оценивается по пятибалльной шкале:

- I степень* – до 5 мелких петехий;
- II степень* – от 6 до 15 петехий;
- III степень* – до 30 петехий;
- IV степень* – более 30 кровоизлияний;
- V степень* – число кровоизлияний не поддается подсчету.

При достаточной С- и Р-витаминной обеспеченности у практически здоровых людей обычно регистрируется первая и вторая степень резистентности капилляров кожи.

Тема 2. ВИТАМИН В₁ (ТИАМИН)

Тиамин состоит из двух циклических систем, пиримидинового кольца и тиазолового кольца, связанных метиленовой группой. Активной формой витамина является тиаминдифосфат, иначе тиаминпирофосфат,

который в качестве кофактора ферментов участвует в переносе активных альдегидных групп при окислительном декарбоксилировании 2-кетокислот и в транскетолазных реакциях гексозомонофосфатного пути.

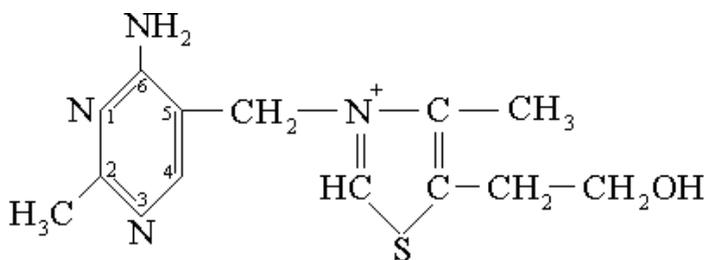


Рис. 6 – Структурная формула тиамин

Недостаток витамина приводит к заболеванию «бери–бери», симптомами которого являются неврологические расстройства, сердечная недостаточность и мышечная атрофия.

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на витамин В₁

Материалы, посуда, реактивы:

тиаминбромид, в порошке;

5% раствор железосинеродистого калия (феррицианид калия - $K_3Fe(CN)_6$);

10% раствор гидроксида натрия; бутиловый или изоамиловый спирт;

0,01% раствору тиамин-хлорида), подкисленный соляной кислотой до pH 3-4 (или 0,01% раствор тиамин-хлорида);

диазореактив (основной раствор) готовят растворением 0,9 г сульфаниловой кислоты в 9 мл концентрированной HCl с последующим разбавлением дистиллированной водой до 100 мл (хранят в склянке из темного стекла); перед определением готовят рабочий раствор: в мерную колбу на

50 мл, помещенную в сосуд со льдом, вносят 1,5 мл основного раствора, добавляют 1,5 мл свежеприготовленного 5% раствора нитрита натрия $NaNO_2$, через 5 мин добавляют при помешивании еще 6 мл раствора нитрита натрия и доводят дистиллированной водой, охлажденной на льду, до метки; реактив готов через 15 мин (может храниться в холодильнике не более одних суток);

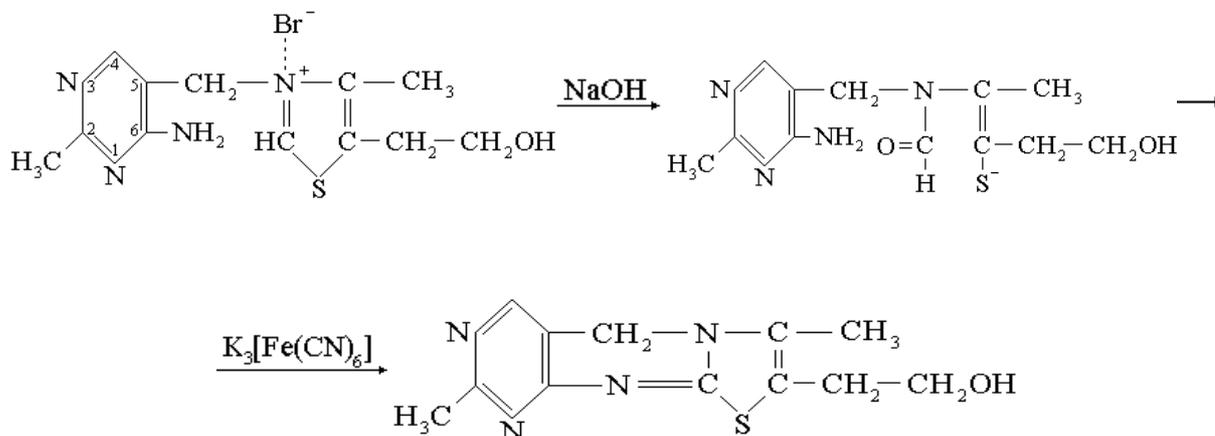
карбонатно-щелочной раствор: перед употреблением смешивают равные объемы 4% раствора гидроксида натрия и 5,76% раствора карбоната натрия;

пробирки;

пипетки.

А) Тиохромная реакция.

Тиамин в щелочной среде окисляется железосинеродистым калием в тиохром, обладающий голубой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете:



Немного порошка тиаминбромида (около 10 мг) растворяют в 5 мл воды, прибавляют 1 мл 5% раствора железосинеродистого калия, 1 мл 10% раствора гидроксида натрия, 5 мл бутилового (или изоамилового) спирта. Пробирку (или стаканчик) хорошо встряхивают и оставляют на несколько минут. Верхний, спиртовой слой осторожно сливают в пробирку из нефлуоресцирующего стекла и рассматривают в лучах ртутно-кварцевой лампы (в темном помещении). Хорошо заметна голубая или синяя флуоресценция.

Б) Диазореакция на витамин В₁.

Раствор тиамин при добавлении к нему диазореактива и щелочи окрашивается в оранжевый или красный цвет вследствие образование сложного соединения тиамин с диазобензосульфокислотой.

К 2 мл карбонатно-щелочного раствора добавляют 1 мл диазореактива и 1-2 мг порошка тиаминбромида (на кончике скальпеля). Вначале появляется желтое окрашивание, которое через 1-2 мин. переходит в розовое или красное.

Тема 3. ВИТАМИН В₂ (РИБОФЛАВИН)

Название витамин В₂ в литературе часто ассоциируется с рибофлавином. Витамин В₂ – это комплекс нескольких витаминов. В обмене веществ рибофлавин выполняет функцию структурного элемента протетических групп флавиномононуклеотида (ФМН) и флавиндинуклеотид (ФАД). ФМН и ФАД – ковалентно связанные составные части различных оксиредуктаз и служат для переноса атомов водорода. Специфического авитаминоза не обнаружено.

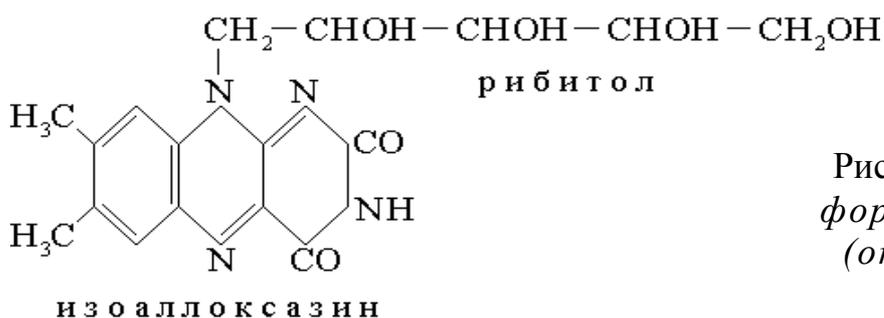


Рис. 7 – Структурная формула рибофлавина (окисленная форма)

Рибофлавин — диметилированное производное изоаллоксазина, к которому присоединен спирт рибитол.

Рибофлавин обладает окислительно-восстановительными свойствами. В окисленной форме рибофлавин окрашен в желтый цвет, а в восстановленной – бесцветный.

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на витамин В₂

Материалы, посуда, реактивы:

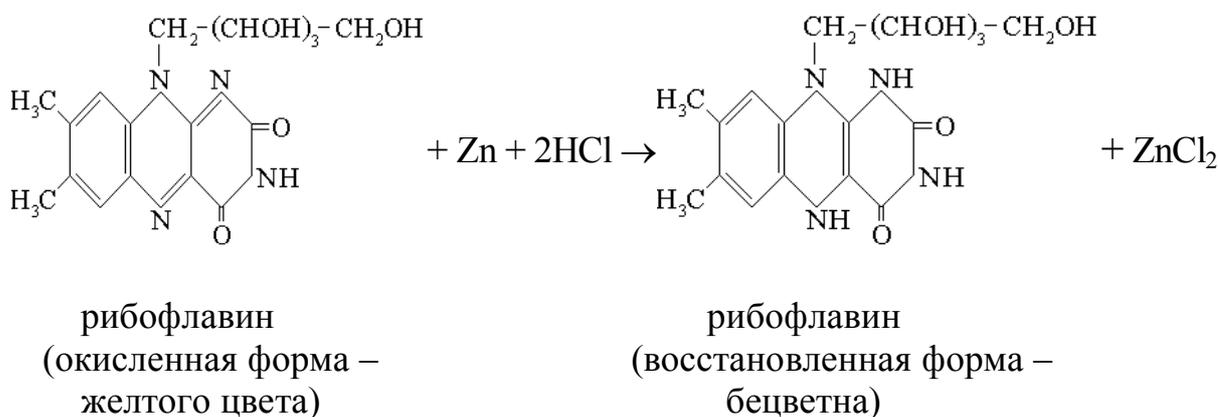
0,025% раствор витамина;
рибофлавин, 0,015% раствор, хранят в
склянке из темного стекла;
соляная кислота концентрированная;
цинк металлический;

0,1% раствор азотнокислого
серебра, хранят в склянке из
темного стекла;
пробирки;
пипетки.

А) Реакция с металлическим цинком.

К 1 мл раствора рибофлавина добавляют (*под тягой!*) 10 капель концентрированной соляной кислоты и кусочек металлического цин-

ка. Под влиянием выделяющегося водорода окраска раствора постепенно меняется: из желтой превращается сначала в зеленую, затем в малиновую, розовую, и, наконец, наступает обесцвечивание. Через несколько минут верхний слой жидкости в пробирке снова принимает желтое окрашивание (окисление лейкофлавина в рибофлавин кислородом воздуха).



В слабокислой или нейтральной среде рибофлавин обладает желто-зеленой флуоресценцией.

Б) Реакция с азотнокислым серебром.

Нейтральные или слабокислые растворы рибофлавина (рН 6,5-7,2), реагируя с азотнокислым серебром, дают соединение, окрашенное в розовый и красный цвет.

К 1 мл раствора рибофлавина добавляют 0,5 мл раствора азотнокислого серебра. Появляется розовое или красное окрашивание (интенсивность окраски зависит от концентрации рибофлавина в растворе).

Лабораторная работа № 2

Количественное определение содержания витамина В₂

Метод основан на учете интенсивности флуоресценции рибофлавина. В работе используется ферментный препарат фосфатазы для высвобождения связанного рибофлавина.

Материалы, посуда, реактивы:

Ферментный препарат фосатазы: выращивают гриб *Aspergillus niger* или *Penicillium notatum*, затем мицелий гриба подсушивают при 45°C; высушенный гриб экстрагируют 2,5 М раствором ацетата натрия, рН 4,4-5 (на 100 мг мицелия 10 мл раствора) в течение 2-3 ч и фильтруют;

4% раствор перманганата калия $KMnO_4$;

3% раствор пероксида водорода H_2O_2 ;

0,1 н раствор серной кислоты H_2SO_4 ;

рабочий раствор хлорида олова (II) $SnCl_2$ (1 г $SnCl_2$ в 25 мл концентрированной HCl ; раствор хранят в темноте, перед определением разбавляют водой в отношении 1:50);

раствор $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ (перед употреблением растворяют 0,25 г $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ в 10 мл 2% раствора $NaHCO_3$);

образцовый раствор рибофлавина (10 мг рибофлавина растворяют в 200 мл воды, подкисленной уксусной кислотой, добавляют несколько капель толуола, разводят водой в отношении 1:100;

получают раствор, содержащий 0,5 мкг рибофлавина в 1 мл).

дрожжи;

печень;

проростки;

флуорометр;

весы;

водяная баня;

термостат;

фарфоровые ступки;

градуированные пробирки на 10 мл;

мерные колбы на 100 мл;

градуированные пипетки на 1, 5 и 10 мл;

колбы конические;

воронки;

фильтры бумажные;

кварцевый песок;

стеклянные палочки;

карандаш по стеклу.

А) Получение вытяжки рибофлавина

Навеску материала (печень, проростки, дрожжи) (5 г) растирают в ступке с кварцевым песком и 10 мл 0,1 н раствора серной кислоты, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объем содержимого кислотой до 75 мл и на кипящей водяной бане нагревают при помешивании в течение 45 мин. Затем колбу охлаждают, добавляют 5 мл ферментного препарата, выдерживают при 45°C в течение 40 мин, доводят объем до 100 мл и фильтруют.

Б) Определение содержания рибофлавина в вытяжках

В две градуированные пробирки вливают по 8 мл фильтрата. В одну пробирку добавляют 0,5 мл образцового раствора, содержащего 0,25 мкг рибофлавина. В обе пробирки приливают по каплям 4% раствор перманганата калия до появления слабо-розового окрашивания

(примерно 1 мл). Через 10 мин удаляют избыток перманганата 3% раствором H_2O_2 , добавляя его по каплям (пока раствор полностью не обесцветится). Объем полученных растворов доводят водой до 10 мл и измеряют интенсивность флуоресценции. По окончании флуорометрии в обе пробирки вносят по 0,2 мл раствора хлорида олова (II) SnCl_2 и 0,1 мл раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ для тушения флуоресценции витамина B_2 и измеряют флуоресценцию примесей.

Содержание рибофлавина в мкг на 1 г исследуемого материала определяют по формуле:

$$X = \frac{(A - B) \cdot 0,5 \cdot V \cdot V_2}{(A_1 - B_1) \cdot V_1 \cdot n}$$

где A – показание флуорометра для опытного раствора;

B – показание флуорометра для опытного раствора после тушения флуоресценции рибофлавина;

A_1 – показание флуорометра для образцового раствора рибофлавина;

B_1 – показание флуорометра для образцового раствора рибофлавина после тушения флуоресценции;

0,5 – количество микрограммов рибофлавина в 1 мл образцового раствора;

V – объем экстракта перед измерением флуоресценции (10 мл);

V_1 – объем вытяжки, взятой для анализа, мл;

V_2 – объем всей вытяжки, мл;

n — навеска материала, г.

Лабораторная работа № 3

Определение времени темновой адаптации (физиологический тест)

Повышение световой чувствительности зрительного анализатора в условиях малой освещенности в значительной степени зависит от скорости регенерации зрительного пурпура, протекающей с участием витаминов А и B_2 . При недостаточном обеспечении организма *ретинолом* и *рибофлавином* продолжительность темновой адаптации возрастает вплоть до потери способности видеть при сумеречном освещении.

Установлено, что максимум световой чувствительности глаза при ярком освещении находится в желто-зеленой части спектра, а при низкой освещенности смещается в зеленую область. Поэтому при

одинаковой низкой освещенности, когда цвета неразличимы, поверхности, окрашенные в сине-зеленые тона, воспринимаются как более светлые, чем поверхности синего и красного цветов. На этом явлении смещения максимума световой чувствительности (*феномен Пуркинье*) основаны методы определения темновой адаптации.

Ориентировочно определение времени темновой адаптации можно провести упрощенным способом с помощью *таблиц Кравкова - Пуркинье* (плотный картон 20 x 20 см оклеен черной бумагой; отступя 4 см от края, наклеены по углам цветные квадраты (3 x 3 см) из голубой, желтой, красной и зеленой бумаги). В затемненной комнате таблицу размещают на уровне глаз обследуемого на расстоянии 40-50 см.

При нормальной функции темновой адаптации обследуемый через 40-50 секунд отмечает появление светлого квадрата на месте желтого, затем светло-серого на месте голубого квадрата. Красный и зеленый квадраты в этих условиях не видимы.

При пониженном светоощущении на месте желтого квадрата может появиться светлое пятно, голубой же квадрат останется неразличим.

Вращая таблицу, проверяют правильность ответов испытуемых. Для удобства контроля на противоположной стороне таблицы на месте проекции желтого и голубого квадратов наклеивают соответственно одно или два утолщения из картона, легко прощупываемых обследователем в темноте.

Тема 4. ВИТАМИН В₃ (ПАНТОТЕНОВАЯ КИСЛОТА)

Пантотеновая кислота широко распространена как в животном, так и в растительном мире. Витамин В₃ в норме находится во всех клетках и тканях организма. При гипо- и авитаминозах у животных и птиц развиваются специфические дерматиты и кератиты, дегенеративные изменения ряда органов и тканей, особенно желез внутренней секреции, наступает депигментация шерсти и перьев, потеря волос, повреждения сердца и почек, снижение иммунобиологической реактивности.

Пантотеновая кислота содержится в больших количествах в дрожжах, яичном желтке, печени, мясе, молоке, зеленых частях растений, особенно богаты этим витамином картофель, помидоры, цветная капуста.

По химической природе витамин В₃ представляет соединение β-аланина с производным масляной кислоты, связанных между собой амидной связью.

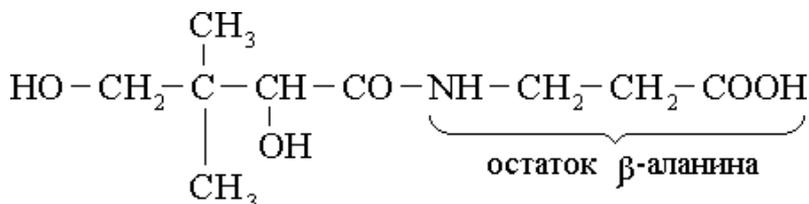


Рис. 8 – Структурная формула пантотеновой кислоты

Роль пантотеновой кислоты в обмене веществ заключается в том, что она входит в состав коэнзима А, принимающего участие в окислении жирных кислот, а также пировиноградной и лимонной кислот, т.е. выступает в качестве промежуточного метаболита, связывающего углеводный и жировой обмен.

Тема 5. ВИТАМИН РР (В₅, НИКОТИНОВАЯ КИСЛОТА)

Никотиноамид, в который могут превращаться никотиновая кислота и, с низким выходом, триптофан, необходимы для биосинтеза двух коферментов никотинамиддинуклеотида НАД⁺ и никотинамиддинуклеотидфосфата НАДФ⁺, которые рассматриваются как переносчики гидрид-иона в обмене веществ.

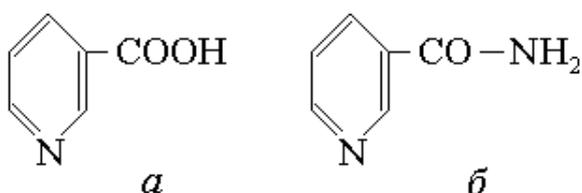


Рис.12 – Структурная формула никотиновой кислоты (а) и никотиноамида (б)

Недостаток витамина проявляется в повреждении кожи (пеллагра), нарушении пищеварения и депрессии.

Некоторое количество никотиновой кислоты может синтезироваться из аминокислоты триптофана при участии витамина В₆, поэтому пеллагру можно рассматривать как полиавитаминоз, связанный с недостатком триптофана и ряда витаминов в диете.

Значительное количество никотиновой кислоты содержится в дрожжах, рисовых и пшеничных отрубях, печени, рыбе, мясе, хлебе, картофеле, гречневой крупе и других продуктах.

Лабораторная работа

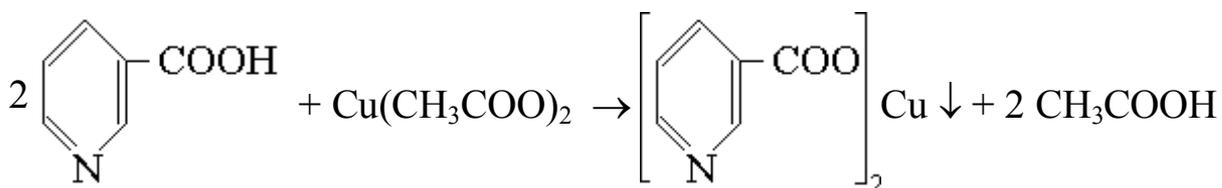
Качественные реакции на витамин РР

Материалы, посуда, реактивы:

никотиновая кислота, в порошке;	40% раствор гидроксида натрия
никотинамид, в порошке;	NaOH;
0,75% раствор никотиновой кислоты (в горячей воде);	водяная баня;
15% раствор уксусной кислоты;	чаши фарфоровые;
5% раствор уксуснокислой меди;	пипетки;
углекислый натрий NaHCO ₃ , безводный;	спиртовки;
	палочки стеклянные;
	пробирки.

А) Реакция с уксуснокислой медью.

Никотиновая кислота, реагируя с солями меди в уксуснокислой среде, образует медную соль никотиновой кислоты (никотинат меди) синего цвета:



никотиновая кислота

никотинат меди

К 2 мл 0,075% раствора никотиновой кислоты добавляют 1 мл 15% раствора уксусной кислоты и нагревают до начала кипения. После этого приливают 1-1,5 мл 5 % раствора уксуснокислой меди. В пробирке сначала появляется голубоватая муть, а затем выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

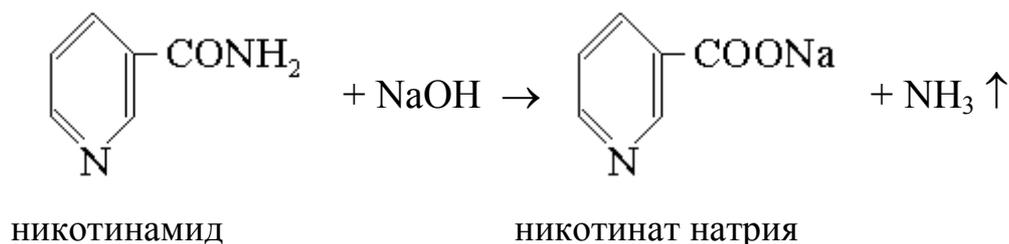
Б) Реакция с углекислым натрием.

При нагревании никотиновой кислоты с безводным углекислым натрием появляется специфический неприятный запах пиридина.

В небольшом фарфоровом тигле смешивают 0,05 г никотиновой кислоты с 0,1-0,15 г безводного углекислого натрия и подогревают. Появляется резкий запах пиридина.

В) Отличие никотиамида от никотиновой кислоты.

При нагревании никотиамида с едким натром выделяется аммиак.



Немного порошка никотиамида (на кончике шпателя) всыпают в пробирку, добавляют 2 мл воды, половину объема 40% раствора гидроксида натрия и подогревают 5 мин. на кипящей водяной бане. Появляется запах аммиака. К отверстию пробирки подносят красную лакмусовую бумажку, смоченную водой. Она синееет.

Продельывают ту же реакцию с никотиновой кислотой – выделения аммиака не наблюдается.

Тема 6. ВИТАМИН В₆ (ПИРИДОКСИН)

Витамин В₆ является производным пиридоксина и представляет собой смесь трех веществ: пиридоксина, пиридоксаль и пиридоксамина, обладающих витаминной активностью.



Рис.9 – Структурные формулы витамина В₆

Активная форма витамина В₆, пиридоксальфосфат – важный кофактор в обмене аминокислот; входит также в состав фермента гликогенфосфорилазы. Недостаточность витамина встречается редко. Наибольшее значение для организма имеет пиридоксин.

Лабораторная работа **Качественные реакции на витамин В₆**

Материалы, посуда, реактивы:

5% раствор витамина В ₆ ;	4% раствор борной кислоты;
5% раствор хлорного железа (FeCl ₃ ·6H ₂ O);	фосфорно-вольфрамовая кислота, 1% раствор в разведенной соля- ной кислоте (1:10);
0,01% раствор пиридоксина;	пробирки;
20% раствор ацетата натрия;	пипетки.
0,5% спиртовой раствор 2,6- дихлорхинон-хлоримида;	

А) Реакция витамина В₆ с хлорным железом

Витамин В₆ образует с хлорным железом комплекс, окрашенный в красный цвет.

В пробирку вносят 0,5 мл раствора витамина В₆, добавляют 1 каплю раствора хлорного железа, перемешивают. Жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция основана на образовании комплексного соединения типа фенолята железа.

Б) Отличие пиридоксина от пиридоксаля и пиридоксамина

Пиридоксол, реагируя с 2,6-дихлорхинонхлоримидом, образует соединение, окрашенное сначала в синий, а затем в красный цвет. Реакция характерна для фенолов со свободным параположением, поэтому ее не дают пиридоксаль и пиридоксамин.

В две пробирки вносят по 1 мл раствора пиридоксина и 2 мл раствора ацетата натрия, затем в первую пробирку прибавляют 1 мл дистиллированной воды, а во вторую – 1 мл раствора борной кислоты и перемешивают. Когда пробирки остынут до комнатной температуры, быстро прибавляют в каждую из них по 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида. В первой пробирке жидкость принимает вначале синее окрашивание, сменяющееся вскоре красным, во второй – синее окрашивание не появляется.

В) Осаждение пиридоксина фосфорно-вольфрамовой кислотой

Пиридоксин, являясь производным пиридина, обладает основными его свойствами и осаждается некоторыми реактивами на алкалоиды, в том числе фосфорно-вольфрамовой кислотой.

К 1 мл раствора пиридоксина добавляют 1 мл раствора фосфорновольфрамовой кислоты. Наблюдают выпадение осадка. Можно провести микрохимическую реакцию на часовом стекле, соответственно уменьшив объемы растворов.

Тема 7. ВИТАМИН В₁₂ (ЦИАНОКОБАЛАМИН)

Кобаламин – это хелатное (клетчатое), комплексное соединение, центральной структурой которого является порфириноподобная корриновая кольцевая система, включающая четыре пиррольных кольца. Кобальт находится в положении, которое в геме занимает железо. 5'-дезоксиаденозиловое производное витамина В₁₂ является коферментом для превращения ряда соединений во внутриклеточных процессах. У млекопитающих в настоящее время известны две реакции, в которых участвует В₁₂-кофермент: метилирование гомоцистеина и превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА.

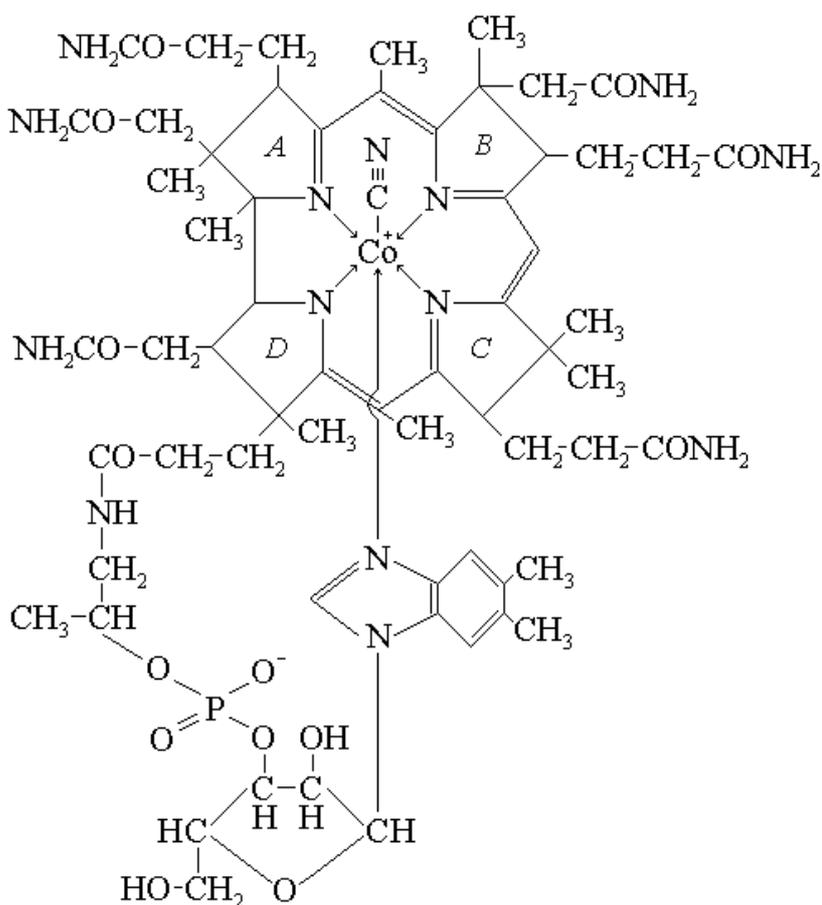


Рис. 10 –
Структурная
формула
ианкобаламина

Витамин В₁₂ – кобальтсодержащий витамин.

Витамин В₁₂ синтезируется исключительно микроорганизмами. Он встречается в заметных количествах в печени, мясе, яйцах, молоке, но не в растительных продуктах. Всасывание витамина В₁₂

(внешний фактор) возможно при наличии секретлируемого слизистой желудка внутреннего фактора (гликопротеин), который предотвращает

ет разрушение витамина; в крови кобаламин связывается белком транскобаламином.

Производные кобаламина участвуют в метилировании гомоцистеина в метионин, в изомеризации метилмалонил в сукцил и в превращении рибонуклетидов в дезоксирибонуклеотиды.

Недостаток витамина или нарушение его всасывания чаще всего вызывается отсутствием внутреннего фактора, что приводит к пернициозной, злокачественной анемии.

Лабораторная работа

Качественные реакции на витамин В₁₂

Материалы, посуда, реактивы:

витамин В₁₂ (в ампулах);

10% раствор тиомочевины;

серная кислота, концентрированная Н₂SO₄;

электроплитка;

песчаная баня;

резиновая груша;

пинцет;

жаростойкие пробирки;

пипетки на 1 мл;

беззольные фильтры.

А) Реакция на наличие кобальта

В жаростойкую пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина В₁₂, добавляют 0,5 мл концентрированной серной кислоты и озоляют на песчаной бане в вытяжном шкафу до обесцвечивания. После охлаждения осторожно вливают 1 мл дистиллированной воды, перемешивают.

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли раствора тиомочевины и высушивают над электроплиткой или над пламенем спиртовки. Затем на это же место на фильтре наносят 1-2 капли минерализата витамина и снова нагревают. По краю пятна появляется зеленое окрашивание, указывающее на наличие кобальта.

ВИТАМИН В_С (ФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА)

Наряду с биологически активным соединением фолиевой кислотой к витаминам относятся ее производные, объединенные общим названием «фолацин». В отечественной литературе чаще встречается термин «фолиевая кислота», реже – «витамин В₉». В зарубежной

справочной литературе наравне с фолиевой кислотой чаще встречается термин «витамин В₉». Термин «витамин М» считается устаревшим и практически не встречается.

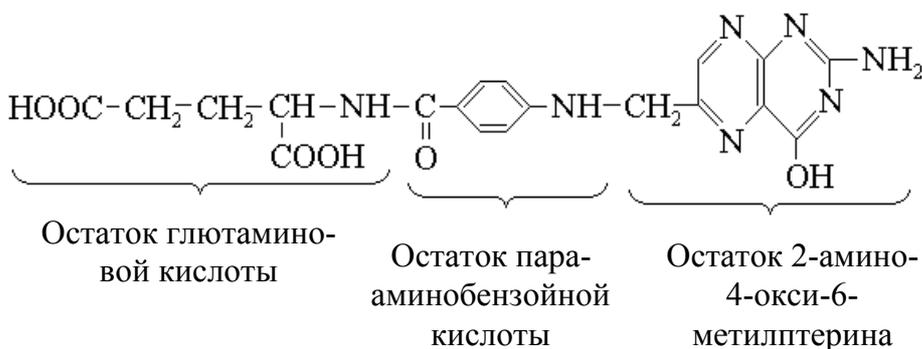


Рис.11 –
Структурная
формула
фолиевой
кислоты

Фолиевая кислота участвует в качестве кофермента в различных ферментативных реакциях, играет важную роль в обмене аминокислот, в пуриновом и пиримидиновом обмене, что определяет значение витамина для нормального процесса роста, развития и пролиферации тканей, в частности в процессе кроветворения и эмбриогенеза. Фолиевая кислота стимулирует и регулирует кроветворение, обеспечивает нормальное образование форменных элементов крови - эритроцитов, тромбоцитов, способствует увеличению числа лейкоцитов, играет роль в предупреждении атеросклероза.

Фолиевая кислота широко распространена в природе и поступает в организм человека с продуктами питания животного и растительного происхождения. Содержание фолиевой кислоты в некоторых продуктах (мгк на 100 г продукта): дрожжи пивные – 1470 мкг, печень говяжья – 240 мкг, бобы – 160 мкг, петрушка – 117 мкг.

Недостаточность фолиевой кислоты считается наиболее распространенным гиповитаминозом. Он чаще встречается у пожилых людей с низким уровнем достатка, у больных алкоголизмом, у беременных и кормящих женщин, а также при ряде заболеваний. Причиной недостаточности фолиевой кислоты могут быть нарушения ее всасывания при хронических энтероколитах, после резекции кишечника, при длительном приеме барбитуратов, сульфаниламидных препаратов.

При гипо- и авитаминозе В₉ прежде всего страдает кроветворная ткань и слизистая оболочка кишечника. Развивается макроцитарная гиперхромная анемия, лейкопения, тромбоцитопения. Гиповитаминоз В₉ вызывает явления стоматита, гастрита, энтерита. Во время беременности дефицит фолиевой кислоты может быть причиной недоношенности, нарушения психического развития новорожденных.

Тема 9. ВИТАМИН Н (БИОТИН)

Биотин имеет большое значение для процессов обмена кожи, необходим для переработки в кишечнике и усвоения организмом сырого яичного белка. При недостаточности или отсутствии биотина и при длительном употреблении в большом количестве сырого яичного белка возможны токсические явления. Предполагается, что биотин, являясь одним из самых сильных витаминов-катализаторов, оказывает регулирующее влияние на нервную систему, участвует в жировом обмене.

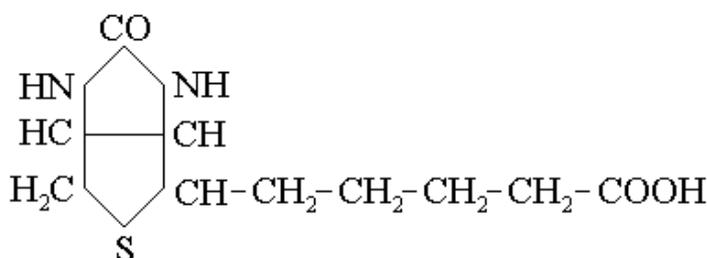


Рис. 13 –
Структурная
формула биотина

Биотин широко распространен в природе и содержится как в продуктах растительного, так и животного происхождения. В продуктах животного происхождения биотин связан с белками, а растительного – содержится в свободном виде. Из-за его высокой активности потребность человека в сутки биотина составляет 150-200 мкг. Однако биотин не только поступает в организм человека с продуктами питания. Большая часть потребности человека в биотине обеспечивается за счет его синтеза бактериями в кишечнике. В период беременности потребность в биотине повышается до 250-300 мкг в сутки.

Случаи витаминной недостаточности очень редки и могут наблюдаться только у людей, которые употребляют в пищу большое количество сырых яиц. Нарушение обмена и недостаток витамина Н наблюдается при себорейном дерматите у грудных детей, при сахарном диабете, при острых и хронических гепатитах.

Тема 10. ВИТАМИН Р (РУТИН, БИОФЛАВАНОИДЫ)

Биофлавоноиды – группа органических соединений растительного происхождения, в том числе метиловый эфир эриодиктина (гесперидин) из апельсиновых корок, рутин, катехины чая и др., которые имеют дифенилпропановый скелет.

Роль биофлавоноидов предположительно заключается в стабилизации основного вещества соединительной ткани путем ингибирования гиалуронидазы. Имеющиеся данные указывают на тесную функциональную связь биофлавоноидов с аскорбиновой кислотой в окислительно-восстановительных процессах организма.

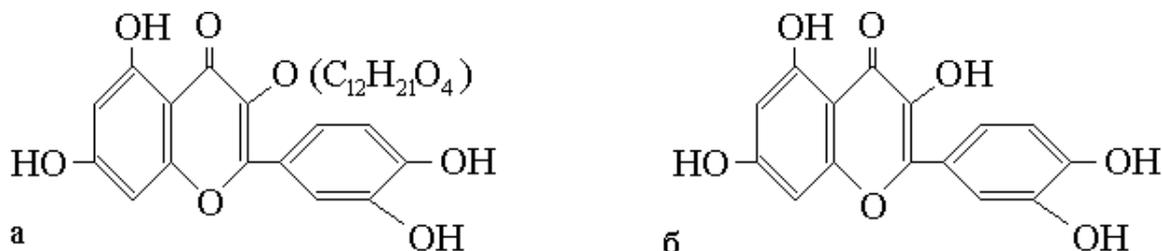


Рис. 14 – Структурные формулы рутина (а) и кверцетина (б).

При недостаточности биофлавоноидов или при отсутствии их в пище людей повышается проницаемость кровеносных сосудов, сопровождающаяся кровоизлияниями и кровотечениями; у людей отмечаются, кроме того, общая слабость, быстрая утомляемость и боли в конечностях.

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на рутин и кверцетин

Материалы, посуда, реактивы:

рутин, насыщенный водный раствор;

рутин, порошкообразный;

кверцетин, насыщенный раствор в этиловом спирте;

1% раствор хлорида железа (III);

серная кислота, концентрированная ($\rho_{20} = 1,836$);

магний металлический, лента или порошок;

соляная кислота, концентрированная ($\rho_{20} = 1,188$);

растворы Фелинга I и II;

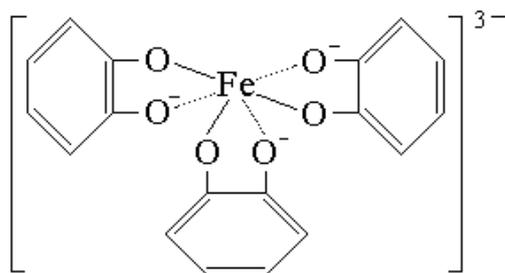
0,5% раствор соляной кислоты;

10% раствор гидроксида натрия.

А) Реакция с хлоридом железа (III)

Хлорид железа (III) образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет. Реакция характерна для многих полифенолов. Обычно зеленую окраску дают соединения содер-

жащие ортодифенольные группы. Окрашенный комплексный ион, образующийся при реакции рутина или кверцетина с хлоридом железа (III), имеет следующее строение:



К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1% раствора хлорида железа (III). Появляется зеленое окрашивание.

Б) Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота образует с флавонами или флавонолами (например, рутином) оксониевые (флавилиевые) соли, растворы которых характерны ярко-желтой окраской. Флавононы (например, гесперидин) дают с серной кислотой малиновое окрашивание.

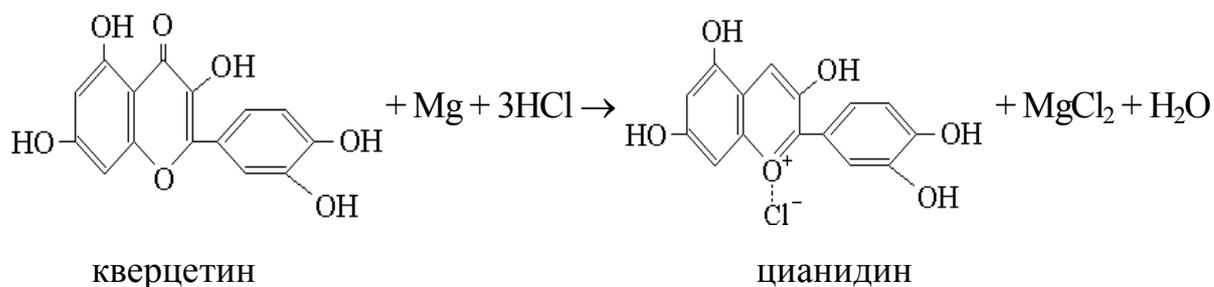
К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно, по стенке пробирки, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки окрашивается в желтый цвет.

В) Реакция с магнием и концентрированной соляной кислотой

Флавоноиды, реагируя с металлическим магнием и концентрированной соляной кислотой, легко восстанавливаются, давая окрашенные соединения. Окраска зависит от строения флавоноида. Кверцетин образует соединения, характеризующиеся красно-розовой или фиолетово-красной окраской (в зависимости от концентрации вещества).

К 1 мл насыщенного спиртового раствора кверцетина добавляют кусочек магниевой ленты или на кончике скальпеля порошок металлического магния и 3-4 капли концентрированной соляной кислоты. Жидкость вначале окрашивается в розовый цвет, но при стоянии интенсивность окраски усиливается, доходя до малиновой или фиолетово-малиновой.

При восстановлении кверцетина образуется цианидин:



Г) Реакция рутина с фелинговой жидкостью

К 0,5 г рутина добавляют 50 мл 0,5% раствора соляной кислоты, нагревают до кипения, кипятят в течение 1 минуты после чего фильтруют. К к мл фильтрата приливают 3 мл 10% раствора гидроксида натрия и 3 мл фелинговой жидкости (которую готовят непосредственно перед употреблением, смешивая равные объемы I и II растворов Фелинга) и снова нагревают до кипения. Выпадает красный осадок оксида меди (I).

Лабораторная работа № 2

Определение суммарного количества Р-витаминных веществ в чае

В листьях растения витамин Р в основном представлен катехинами и их производными (чайным танином).

В основу метода количественного определения витамина Р в чае положена способность бесцветных катехинов окисляться марганцовокислым калием с образованием окрашенных соединений.

Материалы, посуда, реактивы:

чай, черный или зеленый;

0,1 н раствор перманганата калия $KMnO_4$: 1,58 г (навеска на аналитических весах) растворяют в прокипяченной и остуженной дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 500 мл, раствор доводят до метки той же водой. Поправку на титр раствора $KMnO_4$ устанавливают по химически чистому щавелевокислороду натрию или аммоний;

раствор индигокармина: 0,5 г индигокармина растирают в фарфоровой ступке и растворяют в 25 мл концентрированной серной кислоты. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 500 мл и доводят водой до метки, затем фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Хранят в холодном месте в склянке из темного стекла; срок годности раствора – не более 10 дней.

А) Экстракция катехинов

Навеску чая (0,5-0,6 г) переносят в коническую колбу, заливают 200 мл кипящей воды, колбу закрывают пробкой с воздушным холодильником и продолжают кипячение в течение 5 мин., после чего охлаждают. Измеряют общий объем водного экстракта.

Б) Титрование экстракта катехинов

В большую фарфоровую чашку наливают 500 мл дистиллированной воды, 25 мл раствора индигокармина и 10 мл водного экстракта из листьев чая (пипеткой). Раствор в чашке, окрашенный в синий цвет, титруют 0,1 н раствором марганцовокислого калия до появления желтого окрашивания. Раствор марганцовокислого калия прибавляют небольшими порциями, все время перемешивая жидкость в чашке стеклянной палочкой.

Одновременно проводят контрольный опыт: в чашку наливают 500 мл дистиллированной воды, 25 мл раствора индигокармина и титруют 0,1 н раствором перманганата. Опытное и контрольное титрования повторяют 3-4 раза.

Суммарное содержание веществ Р-витаминного действия в чае (в процентах) x вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 0,0064 \cdot V_1 \cdot 100}{d \cdot V},$$

где a — количество 0,1 н раствора KMnO_4 , израсходованное на титрование опытного раствора, мл;

b — то же для контрольного опыта;

K — поправка на титр 0,1 н раствора марганцовокислого калия;

0,0064 — количество чайного танина, окисляемое 1 мл 0,1 н раствора KMnO_4 , г;

V_1 — объем водного экстракта из листьев чая, мл;

V_2 — количество водного экстракта, взятое для титрования, мл;

d — навеска чая, г.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Рекомендуемая суточная потребность в витаминах

(Борисова О.А., Половинко А.Е., Жиглявская О.А. *Современные лекарственные средства, витамины и минералы – СПб.: Сова, М.: Эскмо, 2003 – 1120 с.*)

Категория	Возраст, годы	Витамины												
		жирорастворимые				водорастворимые								
		А, МЕ	Е, МЕ	Д, МЕ	К, мкг	С, мг	В ₁ , мг	В ₂ , мг	В ₃ , мг	В ₆ , мг	В _С , мг	В ₁₂ , мг	РР, мг	Н, мкг
Грудные дети	0 – 0,5	1250	3	300	5	30	0,3	0,4	2	0,3	0,025	0,3	5	10
	0,5 – 1	1250	4	400	10	35	0,4	0,5	3	0,6	0,035	0,5	6	15
Дети	1 – 3	1335	6	400	15	40	0,7	0,8	3	1,0	0,050	0,7	9	20
	4 – 6	1665	7	400	20	45	0,9	1,1	4	1,1	0,075	1,0	12	25
	7 – 10	2335	7	400	30	45	1,0	1,2	5	1,4	0,10	1,4	7	30
Лица мужского пола	11 – 14	3333	10	400	45	50	1,3	1,5	4,7	1,7	0,15	2,0	17	30-100
	15 – 18	3333	10	400	65	60	1,5	1,8	4,7	2	0,20	2,0	20	30-100
	19 – 24	3333	10	400	70	60	1,5	1,7	4,7	2	0,20	2,0	19	30-100
	25 – 50	3333	10	200	80	60	1,5	1,7	4,7	2	0,20	2,0	19	30-100
	51 и старше	3333	10	200	80	60	1,2	1,4	4,7	2	0,20	2,0	15	30-100
Лица женского пола	11 – 14	2667	8	400	45	50	1,1	1,3	4,7	1,4	0,15	2,0	15	30-100
	15 – 18	2667	8	400	55	60	1,1	1,3	4,7	1,5	0,18	2,0	15	30-100
	19 – 24	2667	8	400	60	60	1,1	1,3	4,7	1,6	0,18	2,0	15	30-100
	25 – 50	2667	8	200	65	60	1,1	1,3	4,7	1,6	0,18	2,0	15	30-100
	51 и старше	2667	8	200	65	60	1,0	1,2	4,7	1,6	0,18	2,0	13	30-100
В период беременности		2667	10	400	65	70	1,5	1,6	4,7	2,2	0,40	2,2	17	30-100
В период лактации		4333	12	400	65	95	1,6	1,8	4,7	2,1	0,28	2,6	20	30-100

Соматоскопические признаки недостаточности питания

№	Признаки	Витамины												
		A	E	D	K	C	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B _C	B ₁₂	PP	H
1	Общая слабость	+				+	+	+		+			+	
2	Быстрая утомляемость (умств. и физ.)	+				++	++	+		+			++	
3	Боли в мышцах ног при ходьбе	-				++	+							
4	Ухудшение сна						+	+		+			++	
5	Одышка при движении					+	++	+					±	
6	Ухудшение аппетита						++							
7	Шелушение кожи	++				++								
8	Бледность кожи	+				++	+	+		+				
9	Цианоз кожи	±				++	±	±		+				
10	Повышенная секреция сальных желез (крылья носа, лоб, мочка уха)	±					++	+					+	
11	Петехии, кровоточивость десен					++								
12	Ороговение кожи в областях локтевых и коленных суставов	++											++	
13	Ороговение волосяных фолликулов (фолликулярный гиперкератоз)					++								
14	Коричневая пигментация (скулы, глазные впадины)												++	
15	Депигментация кожи					±								
16	Сухость конъюнктивы, роговицы	++						+						
17	Слущивание эпителия в уголках глаз (ангулярный пальпебрит)	+						±						
18	Васкуляризация роговицы («красный глаз»)							++						
19	Болезненные вертикальные трещины губ	-				-	+	++		++			++	
20	Слущивание эпит. по линии смыкания губ, внутр. пов-ть ярко-красная						±	++		+			+	
21	Атрофия десен, обнажение корней зубов					++								
23	«Лакированный» язык						+	+		+			++	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии. – М.: Высшая школа, 1988. – 239 с.
2. Биохимия: практикум. – К.: Выща школа. Изд-во при Киев.унив-те, 1988. – 128 с.
3. Витаминные ресурсы и их использование. – М.: Изд-во АН СССР, 1955. – 195 с.
4. Добрынина В.Н., Свешникова Е.Я. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Медицина, 1967. – 343 с.
5. Дроздов Н.С., Матеранская Н.П. Практикум по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1970. – 256 с.
6. Землянухин А.А. Малый практикум по биохимии. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1985. – 128 с.
7. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
8. Лебедева П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. – М.: Россельхозиздат, 1965. – 711 с.
9. Мелентьева Г.А. Фармацевтическая химия. Т. II. – М.: Медицина, 1976. – 827 с.
10. Методы анализа пищевых, сельскохозяйственных продуктов и медицинских препаратов. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 743 с.
11. Методы определения витаминов. – М.: Пищепромиздат, 1951. – 96 с.
12. Петров К.П. Практикум по биохимии пищевого сырья растительного происхождения. – М.: Пищевая промышленность, 1965. – 30 с.
13. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – 255 с.
14. Практикум по биохимии сельскохозяйственных животных. – М.: Высшая школа, 1980. – 3-3 с.
15. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. – М.: 1976. – 294 с.
16. Смирнов М.И. Витамины – М.: Медгиз, 1974. – 495 с.
17. Физиология человека. В 3-х томах. Пер. с англ. / Под ред. Р.Шмидта и Г.Тевса. – М.: Мир, 1996. – 198 с.
18. Филлипович Б.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение, 1975. – 318 с.
19. Холод В.М., Ермолаев Г.Ф. Справочник по ветеринарной биохимии. – Мн.: Ураджай, 1988. – 168 с.
20. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. – Мн.: Высшая школа, 1976. – 288 с.
21. Экспериментальная витаминология: справочное руководство. – Мн.: Наука и техника, 1979. – 552 с.

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

**БОБРИК Татьяна Владимировна
ТОРОП Елена Ивановна**

ВИТАМИНОЛОГИЯ

**Практическое пособие
для студентов IV курса специальности 1-31 01 01-04
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»**

Лицензия ЛВ № 02330/0133208 от 30.04.2004 г.

Подписано в печать _____. Формат 60 x 84 1/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Гарнитура «Таймс». Усл.печ. л. 2,5. Уч.-изд. л. 1,9.
Тираж 100 экз.

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»
246019, г. Гомель, ул. Советская, 104

Отпечатано на ризографе с оригинал-макета
учреждения образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»
Лицензия ЛП № 02330/0056611 от 16.02.2004 г.
246019, г. Гомель, ул. Советская, 104