

**В.А. СМИРНОВ, Ю.Н. КЛИМОЧКИН**

# **ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ**

**Учебное пособие**

**Часть 2**

**Самара**  
**Самарский государственный технический университет**  
**2008**



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

---

В.А. СМИРНОВ, Ю.Н. КЛИМОЧКИН

# ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ

*Утверждено*

*редакционно-издательским советом университета  
в качестве учебного пособия*

Самара

Самарский государственный технический университет

2008

УДК 571.1. + 577.1  
С50

Рецензент: канд. мед. наук С. А. Тумаков

**Смирнов В.А.**

**С50 Витамины и коферменты:** учеб. пособ. Ч. 2 / В.А. Смирнов, Ю.Н. Кли-  
мочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2008. – 91 с.: ил.

ISBN 978-5-7964-1103-2

Рассмотрены классификация, номенклатура, строение, биологическая роль и потребность взрослого человека в витаминах, физико-химические свойства, методы качественного и количественного анализа витаминов и коферментов. Приведены методики качественного и количественного титриметрического и спектрального анализа витаминов.

Предназначено для студентов, обучающихся по специальностям 020101, 260202, 260204, 260401, 240901.

УДК 571.1. + 577.1  
С50

ISBN 978-5-7964-1103-2

© Смирнов В.А., Климочкин Ю.Н., 2008

© Самарский государственный  
технический университет, 2008

## ВВЕДЕНИЕ

Во второй части пособия рассмотрены витамины и коферменты. Витамины являются неотъемлемой составной частью здорового питания. Все витамины входят в ассортимент современных лекарственных средств. Производители продуктов питания все большее внимание уделяют вопросам применения витаминов при производстве пищевых продуктов. Как самостоятельная группа продуктов питания возникла группа биологически активных добавок (БАД) к пище. Все большее применение витамины находят в косметологии.

Эффективная разработка и совершенствование лекарственных средств немислимы без понимания биохимических процессов в организмах, в подавляющем большинстве которых участвуют витамины.

Производство полезных и доброкачественных продуктов питания включает вопросы использования и контроля содержания витаминов в продуктах питания.

В связи с этим в настоящей работе показаны функции витаминов в обмене веществ человека и животных и на основании этого рассмотрено их биологическое действие на организм.

Все это указывает на актуальность и необходимость изучения студентами витаминов в лабораторном практикуме по биохимии.

Таким образом, содержание пособия обусловлено спецификой деятельности специалистов в области фармацевтической химии и переработки пищевых продуктов.

Целями настоящей работы являются следующие:

- ознакомление студентов с витаминами и коферментами;
- обучение их основным методам качественного и количественного определения витаминов в пищевом и лекарственном сырье и продуктах его переработки;
- формирование навыков и умений, необходимых для определения содержания витаминов в лекарственных средствах и продуктах пищевой промышленности.

# 1. ВНЕАУДИТОРНАЯ ПОДГОТОВКА

## 1.1. ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ

### 1.1.1. КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ВИТАМИНОВ

В конце XIX в. сформировалось представление о том, что для полноценного питания человеку необходимы не только белки, жиры и углеводы, но и какие-то дополнительные факторы питания, содержание которых в пищевых продуктах весьма незначительно, но обязательно. Было установлено, что при отсутствии этих веществ развиваются тяжёлые заболевания, порой оканчивающиеся смертельным исходом, такие, как цинга, пеллагра, бери-бери, рахит, тяжелые неврозы и др.

Победа над болезнью бери-бери, была достигнута благодаря работам английских биохимиков Ф. Хопкинса\* и Х. Эйкмана\*, а также польского биохимика К. Функа\*\*, основные работы которых были посвящены вопросам рационального питания. К 1911 г. Ф. Хопкинс собрал обширный экспериментальный материал и опубликовал свою теорию о дополнительных питательных веществах. В этом же 1911 г. К. Функ выделил из рисовой шелухи в чистом кристаллическом виде вещество, излечивающее болезнь бери-бери, и назвал его витамином. К. Функ ввел также понятия «гиповитаминоз» и «авитаминоз» и разработал теорию этих состояний организма.

В 1929 г. вопрос о витаминах предстал в новом свете, а именно выяснилось, что витамины связаны с ферментами, являясь для них коферментами или предшественниками коферментов. В связи с этим Ф. Гоп-

---

\* Фредерик Гоулэнд Хопкинс – английский биохимик. Основные работы относятся к биохимии азотистого обмена. Ввел понятие о заменимых и незаменимых аминокислотах, о полноценных белках. Один из основателей витаминологии. Открыл в составе молока витамины А и D. Открыл аминокислоту триптофан, выделил из живой ткани глутатион и показал его роль в окислительно-восстановительных процессах в клетке. Нобелевская премия (1929 г., совместно с Христианом Эйкманом).

\*\* Казимеж Функ – польский биохимик. Основные работы относятся к биохимии витаминов. Один из основоположников учения о витаминах. Выделил витамин В<sub>1</sub> из рисовых отрубей. Разработал методы предупреждения и лечения авитаминозов.

кинсу и Х. Эйкману, как пионерам в области изучения витаминов, была присуждена Нобелевская премия по медицине и физиологии.

Как показали многочисленные исследования, витамины в организме человека и животных не образуются, поэтому для нормальной жизнедеятельности необходимо поступление их в организм извне.

Продуцировать витамины могут лишь растения и микроорганизмы, поэтому вначале витамины готовили, концентрируя экстракты из различных растений. В то время было решено называть их по алфавиту по мере их открытия. Впоследствии оказалось, что некоторые препараты представляли собой смеси нескольких веществ, некоторые из которых сами оказались витаминами. В связи с этим была введена система индексов. Так появились витамины А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, А<sub>3</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub> и т.д. По мере выяснения строения витаминов появилась возможность использования химических систематических и тривиальных названий. В области химии витаминов работали крупнейшие химики и биохимики, некоторые из них были удостоены Нобелевской премии.

Практически все витамины, известные в настоящее время, были открыты в течение 30 лет, предшествовавших второй мировой войне. Это указывает на большую научную и практическую значимость этого вопроса. За этот же период было определено строение большинства витаминов, разработаны методы органического синтеза и налажено промышленное производство витаминов.

К числу самых известных исследователей витаминов относится швейцарский химик-органик П. Каррер\*, который занялся витаминами сразу после того, как в 1929 г. шведский биохимик Ханс фон Эйлер-Хельпин показал, что пигмент каротин оказывает то же воздействие на организм, что и витамин А.

Уже в 1930 г. П. Каррер установил структуру β-каротина и показал, как из него образуется витамин А. Это позволило разработать

---

\* Пауль Каррер – швейцарский химик-органик и биохимик (родился в Москве). Основные работы посвящены исследованию каротиноидов, флавинов и витаминов. Из печени рыб выделил витамин А и установил его строение. Установил строение витамина В<sub>2</sub> и получил его синтетическим путем. Синтезировал витамин Е. Открыл 50 новых алкалоидов, многие из которых нашли применение в медицине. Нобелевская премия (1937 г.).

методы получения витамина А. Другое открытие П. Каррера также связано с пигментами. Занимаясь «желтыми ферментами», открытыми Отто Генрихом Варбургом и Вальтером Кристианом, он выделил рибофлавин, установил его строение и показал, что он идентичен уже известному витамину В<sub>2</sub>. П. Каррер исследовал также строение витаминов Е и К.

Р. Кун\* через год после П. Каррера также стал лауреатом Нобелевской премии за исследования в области каротиноидов и флавинов, а в 1939 г. он с сотрудниками выделил витамин В<sub>6</sub> и определил его строение.

Витамин К был открыт Х. Дамом\*\* еще в 1929 г. В 1935 г. Х. Дам стал работать совместно с П. Каррером над выяснением строения витамина К, однако первым эту задачу решил Э. Дойзи\*\*\*. В 1939 г. он выделил в чистом виде из семян люцерны и из рыбной муки два витамина – К<sub>1</sub> (филлохинон) и К<sub>2</sub> (менахинон) – и установил их строение. Изучение зависимости биологической активности этих витаминов от строения позволило получить синтетический аналог – витамин К<sub>3</sub> (менадион) и затем растворимую форму менадиона (в России известен под названием викасол), которые стали широко применяться в медицине. За свои работы в области химии природных соединений Э. Дойзи удостоен Нобелевской премии.

В 1932 г. А. Сент-Дьёрдьи\*\*\*\* выделил из лимонного сока вещество, предотвращающее цингу (скорбут), получившее название ас-

---

\* Рихард Кун – немецкий биохимик. Основные работы посвящены исследованию каротиноидов и витаминов. Выделил витамин В<sub>2</sub> из молока и яиц. Синтезировал рибофлавин-5-фосфат. Установил строение флавинадениндинуклеотида (кофермент ФАД). Выделил витамин В<sub>6</sub> из дрожжей и установил его строение. Нобелевская премия (1938 г.).

\*\* Хенрик Карл Петер Дам – датский биохимик. Основные работы посвящены биохимии стерина, жиров, а также витаминов К и Е. Открыл витамин К при изучении метаболизма холестерина у цыплят и разработал методы его выделения. Нобелевская премия совместно с Э. Дойзи (1943 г.).

\*\*\* Эдуард Адельберт Дойзи – американский биохимик. Основные работы посвящены химии природных соединений. Установил строение витаминов группы К. Выделил из фолликул женский половой гормон эстрон. Нобелевская премия совместно с Х. Дамом (1943 г.).

\*\*\*\* Альберт Сент-Дьёрдьи – американский химик-органик и биохимик венгерского происхождения. Основные работы посвящены химии витаминов, изучению биологического окисления, углеводного обмена и механизма мышечного сокращения. Установил строение и изучил метаболизм витамина С. Нобелевская премия (1937 г.).

корбиновая кислота (витамин С), и установил его строение. Исследуя различное растительное сырьё А. Сент-Дьёрдьи показал, что больше всего витамина С содержит сладкий болгарский перец.

Последним из известных в настоящее время витаминов был открыт витамин В<sub>12</sub> (цианокобаламин) в 1948 г. Было установлено, что этот витамин синтезируется различными микроорганизмами, прежде всего обитающими в кишечнике животных, в том числе и человека. Вскоре после открытия витамина В<sub>12</sub> выяснением его строения занялась англичанка Д. Кроуфут-Ходжкин\* – профессор Оксфордского университета.

Строение витамина В<sub>12</sub> оказалось настолько сложным, что обычные методы органической химии не позволили определить его структуру. Д. Кроуфут-Ходжкин применила разработанный ею метод рентгеноструктурного анализа для определения строения витамина В<sub>12</sub>. Через 8 лет напряженной работы ей удалось установить строение этого витамина. За эту работу Д. Кроуфут-Ходжкин была удостоена Нобелевской премии.

## 1.1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ

### 1.1.2.1. Витамины

**Витамины** (от лат. *Vita* – жизнь) – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, необходимые для осуществления жизненно важных биохимических и физиологических процессов в живых организмах. Организм человека и животных не синтезирует витамины или синтезирует в недостаточном количестве, поэтому он должен получать их в готовом виде с пищей. Витамины обладают исключительно высокой биологической активностью и требуются организму в очень небольших количествах – от нескольких мкг до нескольких мг в день.

---

\* Дороти Кроуфут-Ходжкин – английский химик и биохимик. Основные работы посвящены рентгеноструктурным исследованиям сложных биологически активных веществ. Совместно с Дж.Д.Берналом разработала метод рентгеноструктурного анализа. Методом рентгеноструктурного анализа установила строение инсулина, холестерина, пенициллина и витамина В<sub>12</sub>. Нобелевская премия (1964 г.).

Витамины, участвующие в биохимических процессах, являются **предшественниками коферментов** (например витамин В<sub>1</sub>) или собственно коферментами (например липоамид). **Коферменты** – органические природные соединения небелковой природы, необходимые для осуществления каталитического действия ферментов.

Коферменты вместе с функциональными группами аминокислотных остатков фермента формируют активный центр фермента, на котором происходит связывание с субстратом и образование активированного фермент-субстратного комплекса.

Некоторые витамины обеспечивают осуществление физиологических процессов, например: витамин А<sub>2</sub> участвует в процессе зрительного восприятия; витамин А<sub>3</sub> – в процессе дифференцировки клеток; витамин D – в процессе формирования костной ткани; витамин E – антиоксидант.

Известно более 20 соединений, которые могут быть отнесены к витаминам. Наряду с витаминами, необходимость которых для человека и животных бесспорно установлена, в пище содержатся биологически активные вещества, которые по своим функциям ближе не к витаминам, а к другим незаменимым пищевым веществам. Эти вещества называют **витаминоподобными**. К ним обычно относят биофлавоноиды, холин, инозит, оротовую, пангамовую и *пара*-аминобензойную кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты и др.

Соединения, которые не являются витаминами, но могут служить предшественниками их образования в организме, называются **провитаминами**. К ним относятся, например, каротины, расщепляющиеся в организме с образованием витамина А, и некоторые стерины (эргостерин, 7-дегидрохолестерин и др.), превращающиеся в витамин D.

Некоторые аналоги и производные витаминов способны занимать место витамина в активном центре фермента, однако при этом не способны выполнять коферментную функцию, что ведет к снижению активности данного фермента и развитию соответствующей витаминной недостаточности. Такие соединения называются **антивитаминами**. Так, например, производные 4-гидроксикумарина (дикумарин и др.), предупреждающие возникновение тромбов, – антагонисты витамина К. Сульфаниламидные препараты, оказывающие бактериостатическое действие,

– антагонисты *para*-аминобензойной кислоты; аминоптерин и метотрексат (противоопухолевые препараты) – антагонисты фолиевой кислоты. К антивитаминам относятся также вещества, связывающие или разрушающие витамины, например ферменты тиаминаза I и II, инактивирующие тиамин; белок яйца авидин, связывающий биотин.

Ряд витаминов представлен не одним, а несколькими соединениями, обладающими сходной биологической активностью (витамеры), например, витамин B<sub>6</sub> включает пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин. Для обозначения подобных групп родственных соединений используют слово «витаин» с буквенными обозначениями (витаин А, витамин Е и т.д.).

Для индивидуальных соединений, обладающих витаминной активностью, рекомендуется использовать рациональные названия, отражающие их химическую природу, например рибофлавин (витаин B<sub>2</sub>), никотинамид и никотиновая кислота (витаин РР), ретинол (витаин А<sub>1</sub>).

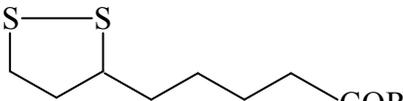
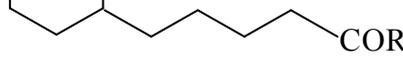
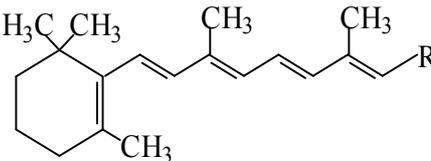
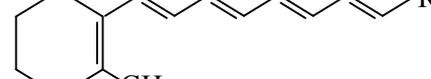
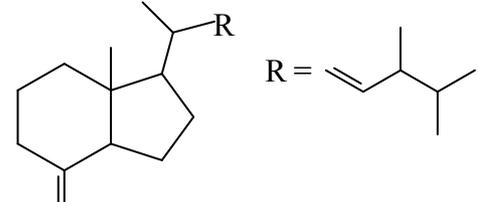
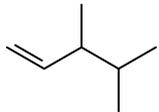
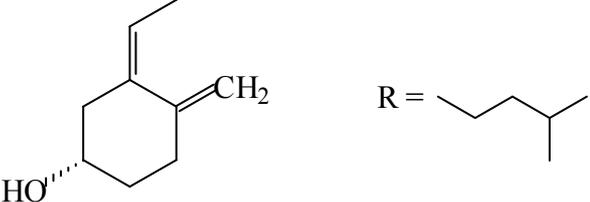
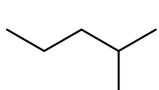
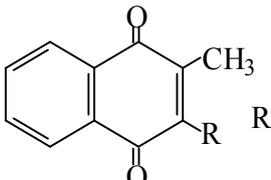
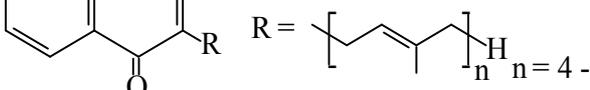
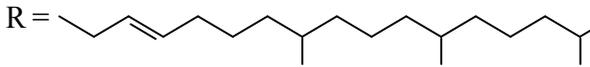
Витамины классифицируют по их растворимости, а именно различают водорастворимые (гидрофильные) и жирорастворимые (липофильные) витамины. С момента открытия первых витаминов и до настоящего времени используется буквенная классификация.

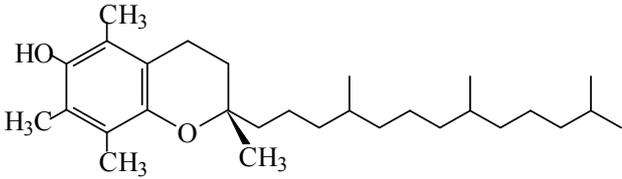
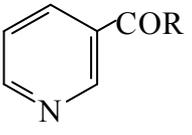
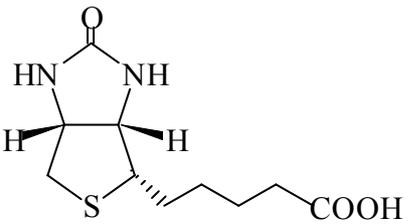
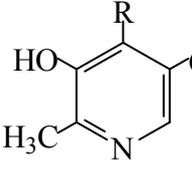
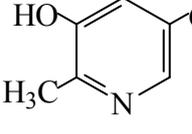
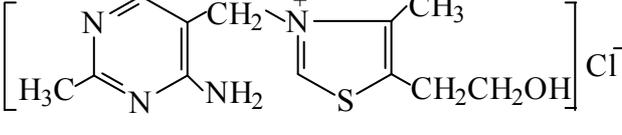
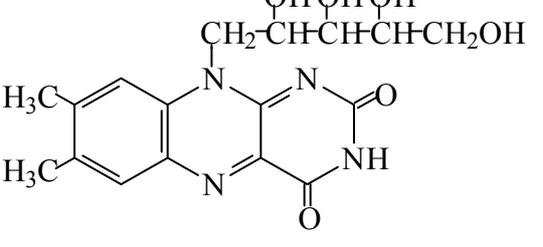
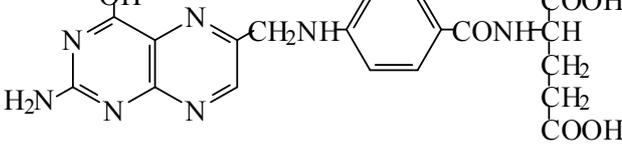
В табл. 1.1 приведены строение, номенклатура и классификация витаминов по химическому строению и растворимости.

Таблица 1.1

### Строение, номенклатура и классификация витаминов

№ п/п	Структурная формула	Тривиальное название	Буквенное обозначение	Растворимость
<b>Витамины алифатического ряда</b>				
1		Аскорбиновая кислота	С	Вода

№ п/п	Структурная формула	Тривиальное название	Буквенное обозначение	Растворимость
2	$\text{HOCH}_2-\overset{\text{H}_3\text{C}}{\underset{\text{H}_3\text{C}}{\text{C}}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Пантотеновая кислота	B <sub>3</sub>	Вода
3	$\left[ \text{CH}_3-\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \right] \text{Cl}^-$	S-Метилметионин-сульфония хлорид	U	Вода
4	 R = OH	Липоевая кислота	-	Вода
5	 R = NH <sub>2</sub>	Липоамид	-	Вода
<b>Витамины алициклического ряда</b>				
6	 R = CH <sub>2</sub> OH	Ретинол	A <sub>1</sub>	Жиры
7	 R = CHO	Ретиналь	A <sub>2</sub>	Жиры
8	 R = COOH	Ретиноевая кислота	A <sub>3</sub>	Жиры
9	 R = 	Эргокальциферол	D <sub>2</sub>	Жиры
10	 R = 	Холекальциферол	D <sub>3</sub>	Жиры
<b>Витамины ароматического ряда</b>				
11	 R = H	Менадион	K <sub>3</sub>	Жиры
12	 R = $\left[ \text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2 \right]_n$ n = 4 - 9	Менахиноны	K <sub>2</sub>	Жиры
13		Филлохинон	K <sub>1</sub>	Жиры

№ п/п	Структурная формула	Тривиальное название	Буквенное обозначение	Растворимость
<b>Витамины гетероциклического ряда</b>				
14		α-Токоферол	Е	Жиры
15	 R = OH	Никотиновая кислота	РР	Вода
16	 R = NH <sub>2</sub>	Никотинамид	РР	Вода
17		Биотин	Н	Вода
18	 R = CH <sub>2</sub> OH	Пиридоксин	В <sub>6</sub>	Вода
19	 R = CHO	Пиридоксаль	В <sub>6</sub>	Вода
20	 R = CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Пиридоксамин	В <sub>6</sub>	Вода
21		Тиамин хлорид (тиамин)	В <sub>1</sub>	Вода
22		Рибофлавин	В <sub>2</sub>	Вода
23		Фолиевая кислота	В <sub>с</sub>	Вода

№ п/п	Структурная формула	Тривиальное название	Буквенное обозначение	Растворимость
24	<p>R = CH<sub>3</sub></p>	Метилкобаламин	B <sub>12</sub>	Вода
25	<p>R = CN</p>	Цианокобаламин	B <sub>12</sub>	Вода
26	<p>R = OH</p>	Оксикобаламин	B <sub>12</sub>	Вода

### 1.1.2.2. Коферменты

**Коферменты (коэнзимы)** – органические природные соединения, необходимые для осуществления каталитического действия ферментов. Коферменты выполняют функцию переносчиков электронов, атомов или функциональных групп с одного субстрата на другой.

**Ферментами** называют белки, выполняющие в организмах функции катализаторов химических реакций в клетках.

Большинство ферментов состоят из белкового компонента (**апофермента**) и кофермента, имеющего сравнительно небольшую молекулярную массу. Коферменты вместе с функциональными группами аминокислотных остатков апофермента формируют активный центр фермента, на котором происходит связывание с субстратом и образование активированного фермент-субстратного комплекса.

Сами по себе коферменты каталитически неактивны, так же, как и апоферменты без коферментов. Таким образом, образование комплекса апофермента с коферментом – один из способов регуляции активности фермента в организме.

Следует также иметь в виду, что в проявлении каталитического действия ферментов большую роль играют различные неорганические ионы, например  $K^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и др. В большинстве случаев катионы металлов взаимодействуют с апоферментной частью молекулы фермента, при этом структура фермента меняется таким образом, что собственно и формируется его активный центр. Такие ионы хотя и активируют фермент, но не входят в состав его активного центра. Известны ферменты, например карбоангидраза, в которых катионы металлов (в данном случае  $Zn^{2+}$ ) входят в состав активного центра. В любом случае такие неорганические ионы, необходимые для проявления каталитической активности ферментов, называют **кофакторами**.

Коферменты обладают как минимум двумя функциональными группами или реакционноспособными участками, обуславливающими специфическое связывание с апоферментом с одной стороны и с субстратом – с другой. Известны десятки органических соединений, выполняющих функции коферментов. Эти вещества, как правило, содержат системы сопряженных  $\pi$ -связей и (или) гетероатомы. Многие коферменты включают в качестве структурного компонента остаток молекулы витамина (коферментные формы витаминов).

По способам взаимодействия с апоферментом различают растворимые коферменты и простетические группы.

**Растворимый кофермент** присоединяется к молекуле фермента во время реакции, химически изменяется и затем снова освобождается. Первоначальная форма растворимого кофермента регенерируется во второй, независимой реакции. Поскольку такие же стадии взаимодействия проходит и субстрат, некоторые авторы называют растворимые коферменты ко-субстратами. Однако этот термин неоправдан, поскольку субстрат взаимодействует в реакции данного типа лишь с определенным ферментом (субстратная специфичность ферментов), в то время как растворимый кофермент взаимодействует с широким кругом ферментов данного класса.

**Простетической группой** называют кофермент, который прочно связан с апоферментом (обычно ковалентными связями) и во время реакции постоянно находится в активном центре фермента. После ос-

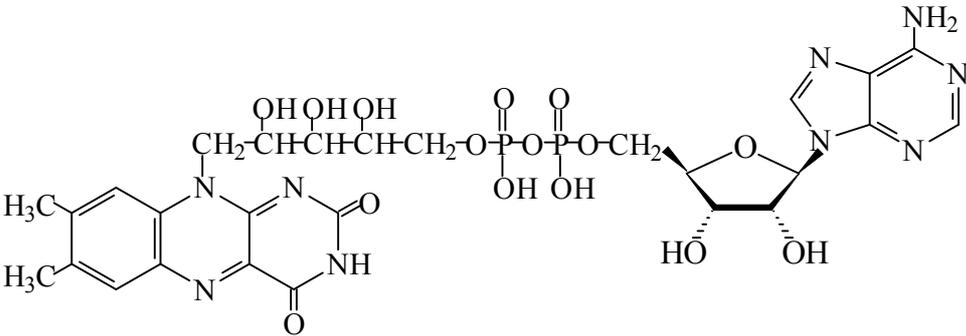
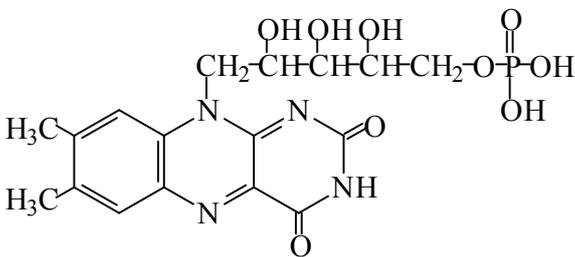
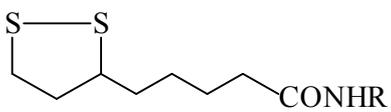
вобождения субстрата регенерация простетической группы происходит при взаимодействии с другим коферментом или субстратом.

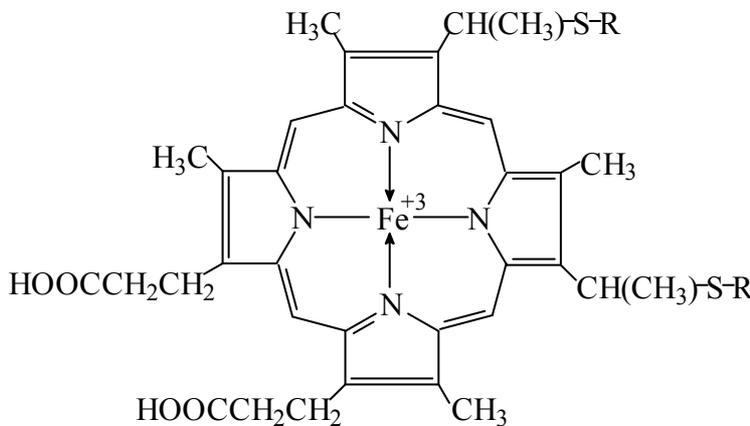
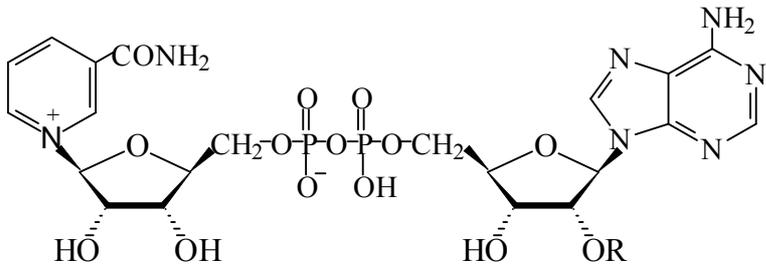
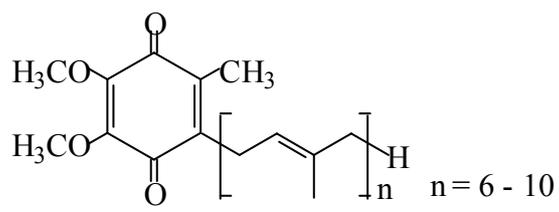
Все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, т.е. перенос восстановительных эквивалентов – протонов и (или) электронов (оксидоредуктазы), и все ферменты, катализирующие реакции переноса различных групп (трансферазы), нуждаются в коферментах. По этому признаку коферменты делятся на две группы – окислительно-восстановительные коферменты и коферменты переноса групп.

В табл.1.2 приведены формулы и названия коферментов оксидоредуктаз, переносимые ими восстановительные эквиваленты и тип кофермента (П – простетическая группа, Р – растворимый кофермент).

Таблица 1.2

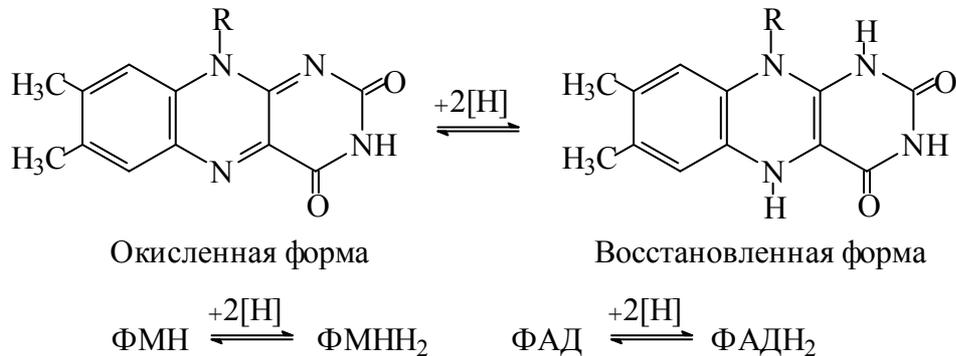
### Коферменты оксидоредуктаз и их функции

Структурная формула, рациональное название и буквенное обозначение	Перенос	Тип
 <p>Флавинадениндинуклеотид – ФАД (FAD)</p>	2ē и 2H <sup>+</sup>	П
 <p>Флавинмононуклеотид – ФМН (FMN)</p>	2ē и 2H <sup>+</sup>	П
 <p>Липоамид R = Остаток лизина в молекуле фермента</p>	2ē и 2H <sup>+</sup>	П

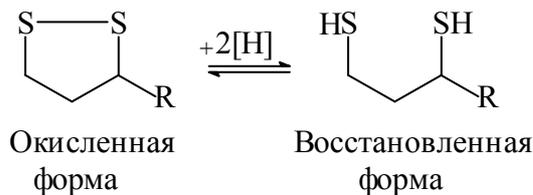
Структурная формула, рациональное название и буквенное обозначение	Перенос	Тип
 <p style="text-align: center;">R = Остаток цистеина в цитохроме С</p> <p style="text-align: center;">Гем</p>	1ē	II
 <p>R = H Никотинамидадениндинуклеотид - НАД<sup>+</sup> (NAD<sup>+</sup>) R = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> Никотинамидадениндинуклеотид-2-фосфат - НАДФ<sup>+</sup> (NADP<sup>+</sup>)</p>	2ē и 1H <sup>+</sup>	P
 <p style="text-align: center;">Убихинон - КоQ (CoQ)</p>	2ē и 2H <sup>+</sup>	P

**Флавиновые коферменты ФМН и ФАД** найдены в дегидрогеназах, оксидазах и монооксигеназах. Обычно оба соединения ковалентно связаны с ферментами. Активной группой обоих коферментов является флавин (изоаллоксазин), имеющий сопряженную систему из трех колец, которая может при восстановлении принимать два электрона и два протона.

В ФМН к флавиону присоединен фосфорилированный спирт – рибит. ФАД состоит из ФМН, связанного с аденозинмонофосфатом (АМФ). Оба соединения являются функционально близкими коферментами:



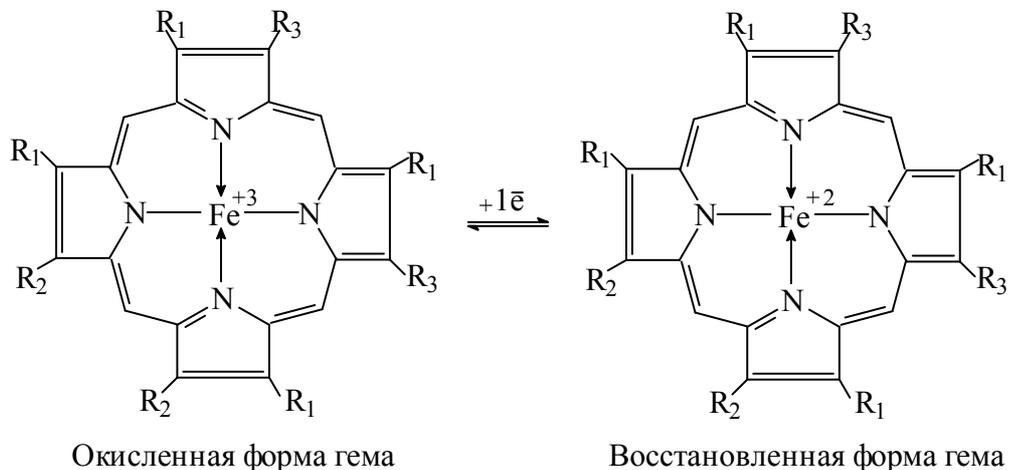
В **липоамиде** функцию окислительно-восстановительного центра выполняет внутримолекулярный дисульфидный мостик. Липоевая кислота ковалентно связана с остатком лизина молекулы фермента:



Остаток липоевой кислоты прежде всего участвует в окислительном декарбоксилировании 2-кетокислот.

Группа **гема** является окислительно-восстановительным коферментом в дыхательной цепи, фотосинтезе, а также в монооксигеназах и пероксидазах.

В отличие от гемоглобина в этих случаях ион железа меняет валентность:



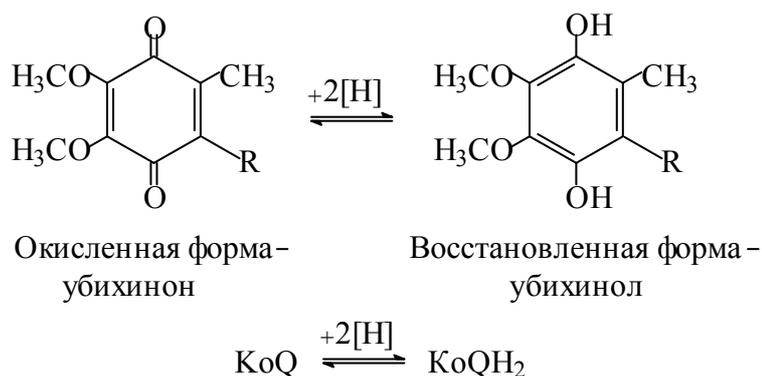
Гем в цитохроме С, ковалентно связан с двумя остатками цистеина молекулы фермента.

**Коферменты НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>** широко распространены как коферменты дегидрогеназ. Они переносят гидрид-ион (Н<sup>-</sup>) и действуют всегда в растворимой форме:



НАД<sup>+</sup> передает восстановительный эквивалент из катаболического пути в дыхательную цепь и тем самым участвует в энергетическом обмене. НАДФ<sup>+</sup>, напротив, является самым важным восстановителем при биосинтезе.

**Убихинон** является переносчиком восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи. При восстановлении хинон превращается в ароматический гидрохинон (убихинол):



Аналогичные системы хинон/гидрохинон принимают участие в реакциях фотосинтеза. К этому классу окислительно-восстановительных систем принадлежат также витамины Е и К.

Из сопоставления табл. 1.1 и 1.2 видно, что такие витамины, как рибофлавин, липоевая кислота, липоамид, никотиновая кислота и никотинамид, являются предшественниками коферментов оксидоредуктаз.

Гем в чистом виде не применяется в медицинской практике из-за сложности его выделения и синтеза. В качестве препарата, содержащего гем, в медицине применяется препарат крови – гематоген.

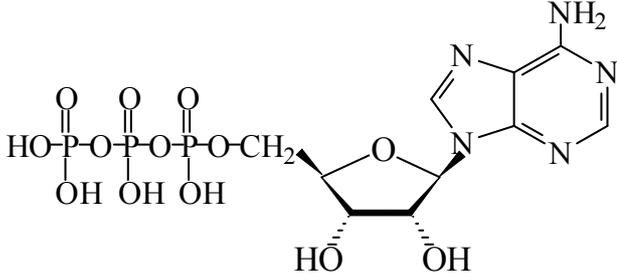
Хотя методы синтеза убихинонов разработаны, до настоящего времени окончательно не установлены пути их биосинтеза. Коферменты Q<sub>6</sub>–Q<sub>9</sub> обнаружены в различных микроорганизмах, а кофермент Q<sub>10</sub> – в человеческом организме. Интересно отметить, что кофермент Q<sub>10</sub> в последнее время нашел применение в косметологии.

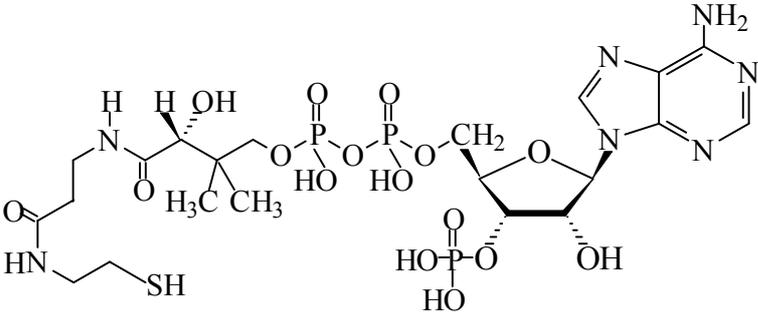
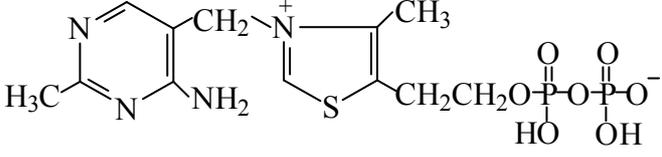
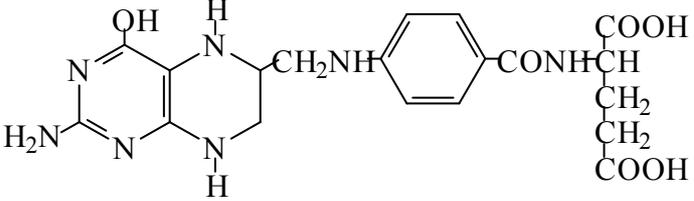
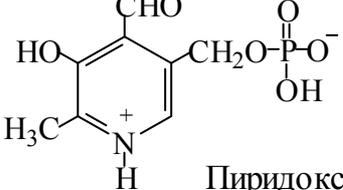
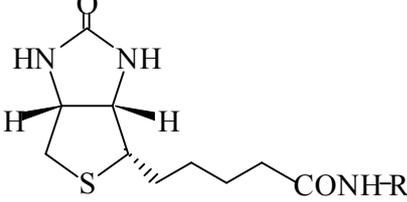
**Аскорбиновую кислоту** также целесообразно отнести к растворимому коферменту, поскольку она принимает участие в реакциях окисления некоторых субстратов кислородом, главным образом в реакциях гидроксирования. Из биохимических процессов с участием аскорбиновой кислоты следует отметить окисление тирозина, синтеза катехоламинов и желчных кислот. Она является коферментом фермента проколлагенпролин-4-диоксигеназы, катализирующего окисление остатков пролина, входящих в структуру проколлагена, до 4-гидроксипролина в процессе созревания коллагена (Смирнов, В.А. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособ. Ч. I/ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара. Самар. гос. техн. ун-т, 2007. С.10).

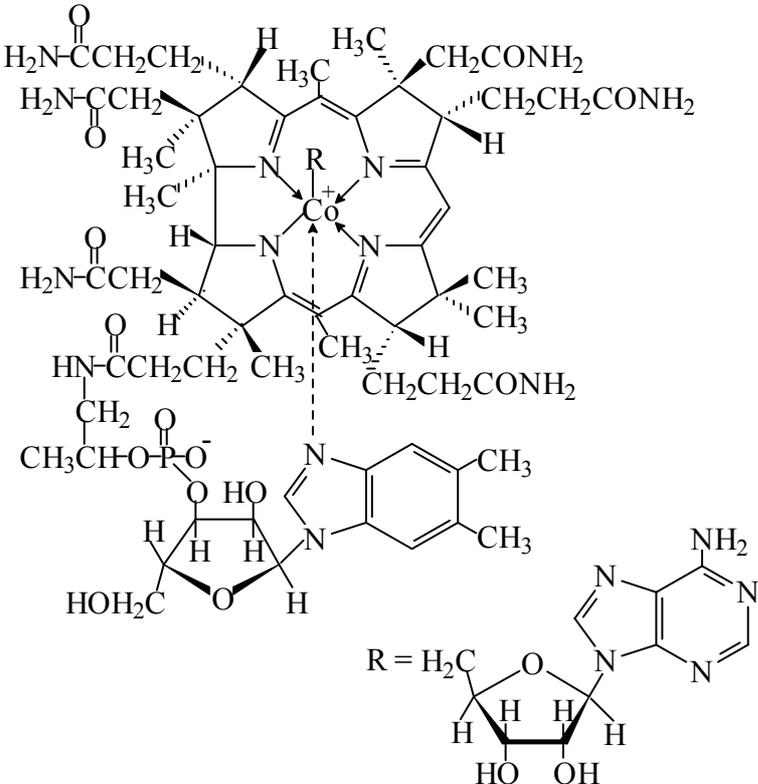
В табл. 1.3 приведены структурные формулы, названия и буквенные обозначения коферментов, участвующих в реакциях переноса функциональных групп, а также соответствующие ферменты и переносимые ими группы.

Таблица 1.3

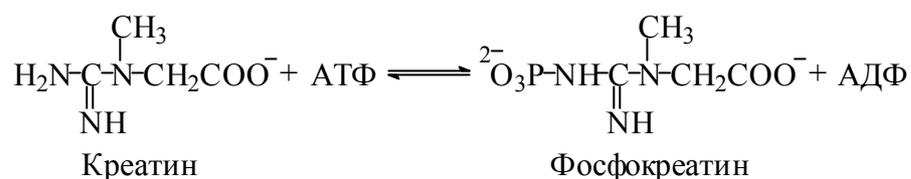
### Коферменты трансфераз и их функции

Структурная формула, рациональное название и буквенное обозначение	Ферменты	Переносимые группы
 <p>Аденозин-5'-трифосфат - АТФ (АТФ)</p>	<p>Фосфотрансферазы, нуклеотидилтрансферазы, лигазы</p>	<p>Фосфат, дифосфат, трифосфат, аденозил, аденозилфосфат, аденозилдифосфат</p>

Структурная формула, рациональное название и буквенное обозначение	Ферменты	Переносимые группы
 <p>Кофермент А - КоА (CoA)</p>	<p>Ацилтранс- феразы, КоА-транс- феразы</p>	<p>-CO-R, -КоА</p>
 <p>Тиаминпирофосфат - ТПФ (TPP)</p>	<p>Транскетола- зы, декарбок- силазы, де- гидрогеназы кетокислот</p>	<p>-CH(R)OH</p>
 <p>Тетрагидрофолиевая кислота - ТГФ (THF)</p>	<p>C<sub>1</sub>-транс- феразы</p>	<p>-CHO, &gt;CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub></p>
 <p>Пиридоксальфосфат - (PLP)</p>	<p>Трансамина- зы, лиазы</p>	<p>-NH<sub>2</sub> &gt;CR(COOH)</p>
 <p>Биотин - КоR (CoR)      R = остаток лизина в молекуле фермента</p>	<p>Карбоксилазы</p>	<p>CO<sub>2</sub></p>

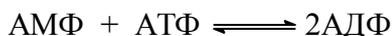
Структурная формула, рациональное название и буквенное обозначение	Ферменты	Переносимые группы
 <p>5'-Дезоксиаденозилкобаламин - V<sub>12</sub></p>	<p>Изомеразы, метилмалонил: КоА-мутаза</p>	<p>Реакции изомеризации, например изомеризация метилмалоновой кислоты в янтарную</p>

**Аденозин-5'-трифосфат (АТФ)** и другие нуклеозидтрифосфаты – гуанозин-5'-трифосфат (ГТФ), уридин-5'-трифосфат (УТФ), тимидин-5'-трифосфат (ТТФ) и цитидин-5'-трифосфат (ЦТФ) – являются коферментами и переносят фосфатные и нуклеозидные группы на субстраты. Например, в мышцах в значительном количестве присутствует фосфокреатин, образующийся из креатина и АТФ:

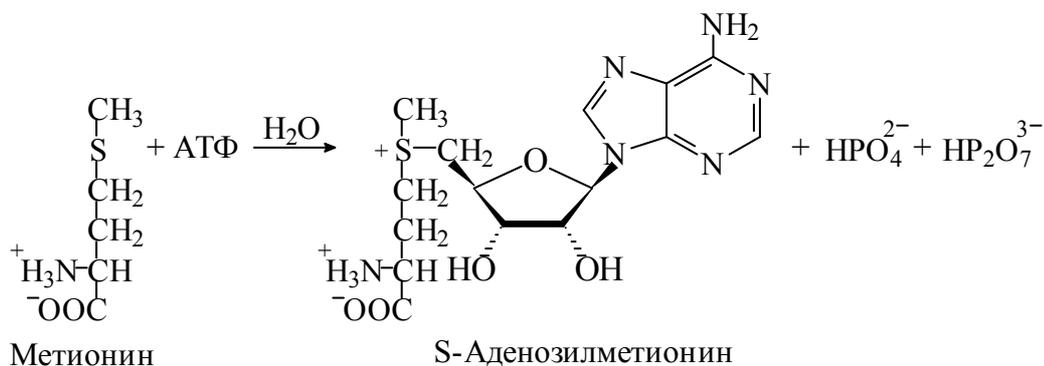


Вследствие того, что эта реакция обратима, при интенсивной мышечной работе фосфокреатин быстро пополняет расходуемые запасы АТФ, передавая остаток фосфорной кислоты на накапливающийся аденозин-5'-дифосфат (АДФ). Поскольку при использовании

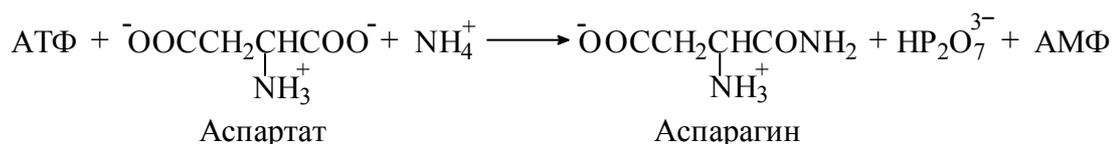
АТФ в ряде реакций образуется аденозин-5'-монофосфат (АМФ), а для регенерации АТФ необходим АДФ, то в местах интенсивного расходования АТФ обычно присутствует фермент аденилаткиназа, катализирующий реакцию образования АДФ из АМФ:



Кроме того, нуклеозидтрифосфаты, обладая макроэргическими связями (связи, при гидролизе которых выделяется большое количество энергии), участвуют в реакциях активации различных метаболитов, а также являются исходными соединениями в биосинтезе нуклеиновых кислот. Метаболиты становятся реакционноспособными (активированными) при присоединении фосфатных или аденозильных остатков. Примером переноса нуклеозидного остатка может служить реакция переноса 5'-аденозильной группы на метионин, в результате которой образуется S-аденозилметионин (активированный метионин):

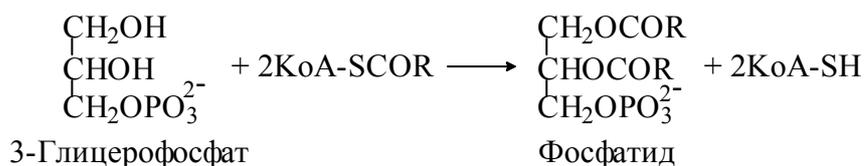


Лигазы катализируют сшивание соединений за счет энергии нуклеозидтрифосфатов, например, в реакции образования аспарагина из аспарагиновой кислоты и иона аммония участвует АТФ:



**Кофермент А** является водорастворимым коферментом ацилтрансфераз – ферментов, катализирующих реакции переноса ацильных групп. Сокращенно его обозначают как КоА (СоА) или, если

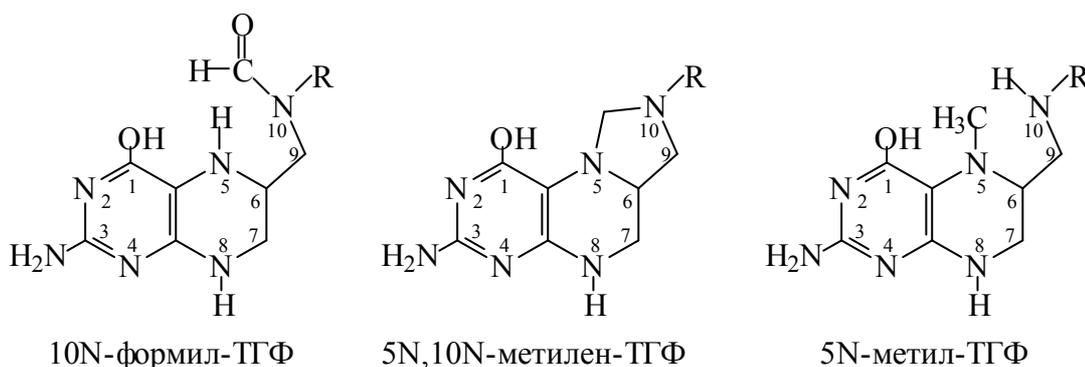




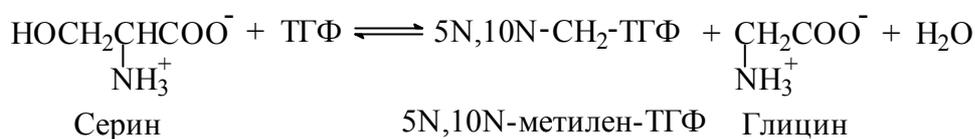
**Тетрагидрофолат (ТГФ)** является коферментом, который может переносить  $\text{C}_1$ -остатки в различных степенях окисления. ТГФ образуется из витамина фолиевой кислоты в результате двойного гидрирования птеринового кольца.

$\text{C}_1$ -фрагменты присоединяются к атомам  $\text{N}^5$ ,  $\text{N}^{10}$  или к обоим атомам азота в виде мостика. Наиболее важными производными тетрагидрофолата, переносящими  $\text{C}_1$ -фрагменты, являются 10N-формил-ТГФ, 5N,10N-метилен-ТГФ и 5N-метил-ТГФ. Формильное производное ТГФ используется в качестве донора формильных групп, в первую очередь в биосинтезе пуриновых нуклеотидов. Метиленовое производное ТГФ является исходным для образования формильного и метильного производных ТГФ. Метильное производное используется для метилирования главным образом по сульфгидрильным группам метоболитов.

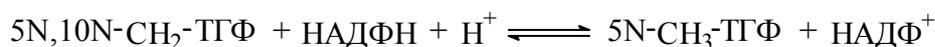
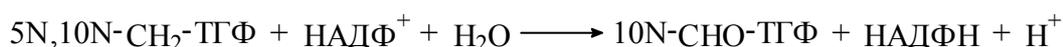
Ниже приведены структурные фрагменты  $\text{C}_1$ -производных ТГФ (R – заместитель, структура которого одинакова в ТГФ и фолиевой кислоте, см. табл. 1.1 и 1.3):



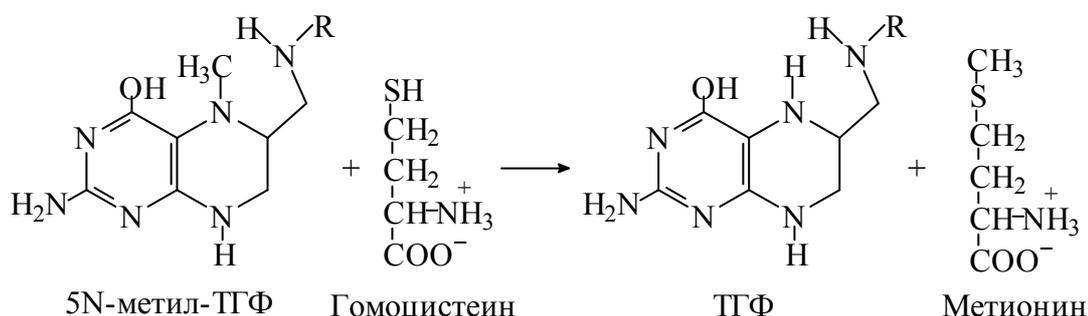
Главным процессом, в результате которого ТГФ «заряжается» одноуглеродным фрагментом, является его реакция с серином с образованием 5N,10N-метилен-ТГФ, катализируемая ферментом гидроксиметилтрансферазой:



5N,10N-Метилен-ТГФ далее может окисляться, образуя 10N-формил-ТГФ, или восстанавливаться, образуя 5N-метил-ТГФ:



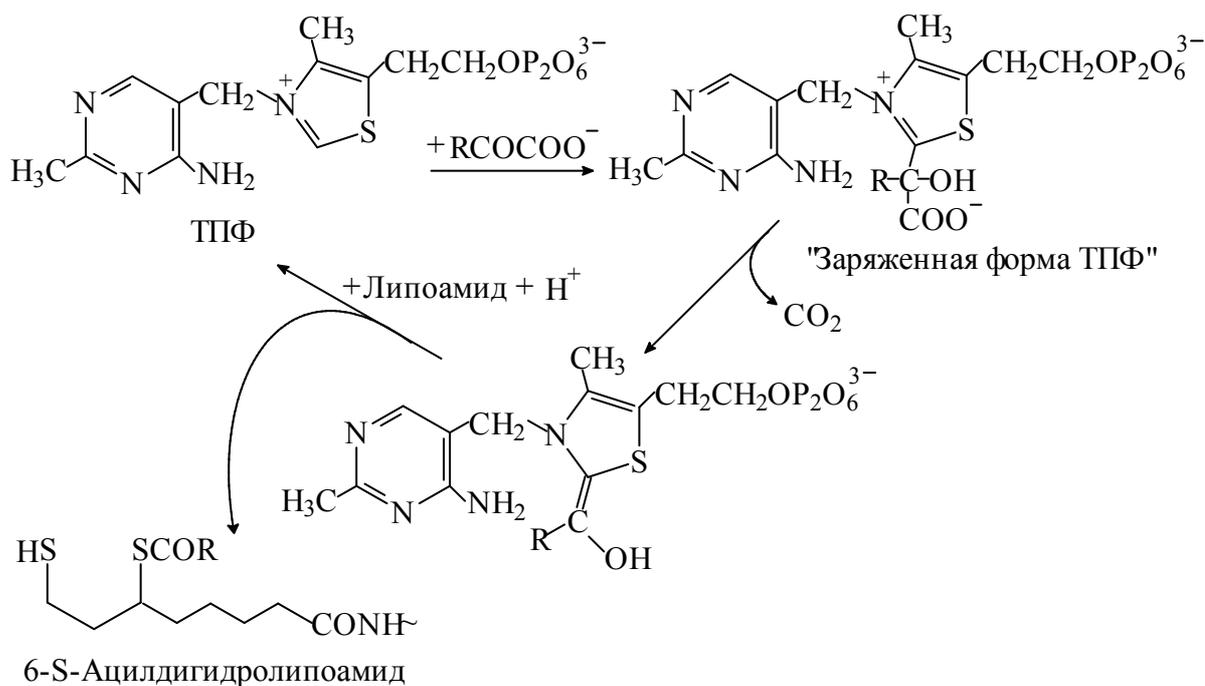
В качестве примера переноса метильной группы рассмотрим реакцию, в которой главным образом расходуется 5N-метил-ТГФ (синтез метионина из гомоцистеина):



**Тиаминпирофосфат (ТПФ)** активирует альдегиды и кетоны и переносит их в виде гидроксиалкильных групп на другую молекулу. Этот способ переноса важен, например, в транскетолазной реакции. Гидроксиалкильные остатки участвуют также в декарбоксилировании кетокислот. Они либо высвобождаются в виде альдегидов, либо переносятся на липоамидные остатки, как в случае дегидрогеназ 2-кетокислот. Ниже приведена схема реакций 2-кетокислот с участием ТПФ в качестве кофермента (рис.1.2).

Молекула ТПФ имеет подвижный атом водорода в положении 2 тиазольного кольца, благодаря чему легко присоединяется к карбонильным соединениям, образуя «заряженные» формы ТПФ.

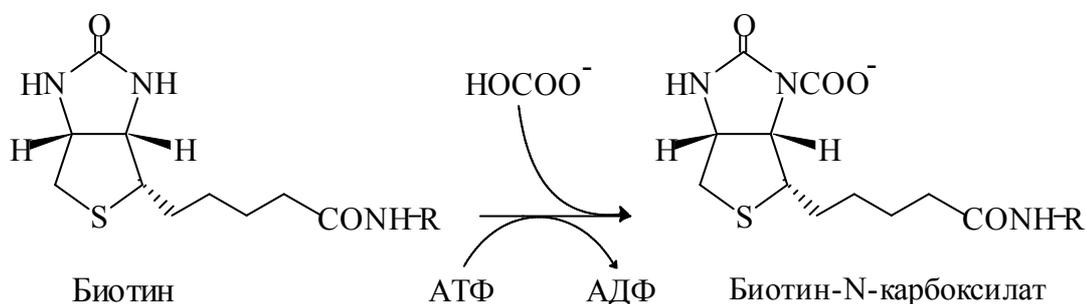
**Пиридоксальфосфат** – наиболее важный кофермент в метаболизме аминокислот. Его роль при трансаминировании была подробно рассмотрена авторами ранее (Смирнов, В.А. Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособ. Ч. I/ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара. Самар. гос. техн. ун-т, 2007. С. 31-33).



Р и с. 1.2. Взаимодействие ТПФ с 2-кетокислотами и перенос ацильной группы на липоамид

Пиридоксальфосфат принимает участие и в других реакциях аминокислот, таких, как декарбоксилирование и дегидратирование. Представленная здесь альдегидная форма в свободном виде не встречается. В отсутствие субстрата альдегидная группа связана с аминогруппой лизинового остатка фермента в виде альдимины.

**Биотин** реагирует с гидрокарбонатом ( $\text{HCO}_3^-$ ) в присутствии АТФ с образованием биотин-N-карбоксилата:



Эта активированная форма диоксида углерода может быть перенесена на другую молекулу. Примерами биотинзависимых реакций являются образование оксалоацетата из пирувата и синтез малонил-КоА из ацетил-КоА. Примерами биотинзависимых реакций являются реакции карбоксилирования пирувата с образованием оксалоацетата,

ацетил-КоА с образованием малонил-КоА, пропионил-КоА с образованием метилмалонил-КоА:



С помощью первой из рассматриваемых реакций осуществляется непрерывное пополнение щавелевоуксусной кислоты, необходимой для работы цикла Кребса. Вторая реакция – важнейший этап в биосинтезе жирных кислот. Третья реакция обеспечивает утилизацию пропионовой кислоты, образующейся при  $\beta$ -окислении жирных кислот с разветвленным углеродным скелетом или нечетным числом атомов углерода.

**5'-Дезоксиаденозилкобаламин** (коферментная форма витамина В<sub>12</sub>) принимает участие в реакции изомеризации метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА, биосинтезе метионина из гомоцистеина, восстановлении рибонуклеотидов бактериями до дезоксирибонуклеотидов.

### 1.1.3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ

Возникновение в организме дефицита того или иного витамина вызывает развитие соответствующей болезни витаминной недостаточности. Различают две основные степени такой недостаточности – авитаминоз и гиповитаминоз. **Авитаминоз** характеризуется глубоким дефицитом данного витамина в организме и развернутой клинической картиной его недостаточности (болезни – цинга, рахит, бери-бери, пеллагра, злокачественная анемия и др.). К **гиповитаминозам** относят состояния умеренного дефицита со стёртыми неспецифическими проявлениями (потеря аппетита, усталость, раздражительность) и отдельными симптомами (кровоточивость десен, гнойничковые заболевания кожи и т.д.). Наряду с дефицитом одного какого-либо витамина на практике более часто встречаются полигипо- и полиавитаминозы, при которых организм испытывает недостаток нескольких витаминов.

Прием ряда витаминов в дозах, существенно превышающих физиологическую потребность, может давать нежелательные эффекты, а

в ряде случаев привести к серьезным патологическим расстройствам (гипервитаминоз). Особенно в этом отношении опасны витамины D и A. Водорастворимые витамины гипервитаминоз не вызывают, их избыток просто выводится из организма.

Потребность человека в витаминах находится в зависимости от таких факторов, как возраст, состояние здоровья, климатическая зона, условия труда, питания и др.

Препараты витаминов широко используют не только при гипо- или авитаминозах, но и в терапии сердечно-сосудистых, нервных, кожных, глазных, желудочно-кишечных заболеваний, при лучевой болезни, после операций и т.д.

Источником промышленного получения витаминов служит растительное и животное сырье, а также микроорганизмы. Чрезвычайно перспективны синтетические методы получения витаминов. Они разработаны для витаминов C, A, E, D, K<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>15</sub>, U, PP и др. Преимущества этих методов заключаются в сравнительно невысокой стоимости исходного сырья и высоких выходах конечных продуктов.

Ряд сложных по химической структуре витаминов, например кобаламины, менахиноны, выделяют как побочный продукт при микробиологическом синтезе антибиотиков.

В табл. 1.4 приведены данные по основным функциям витаминов, их суточной потребности для взрослого человека и пищевым источникам.

*Таблица 1.4*

**Основные функции витаминов, их потребность и пищевые источники**

Вита-мин	Функция в организме	Суточная потребность для взросло-го человека, мг	Пищевые источники
<b>Водорастворимые витамины</b>			
B <sub>1</sub>	Образование кофермента ТПФ	1,5	Зерновые, дрожжи, свинина
B <sub>2</sub>	Образование коферментов ФМН и ФАД	1,8	Молоко, яйца

Витамин	Функция в организме	Суточная потребность для взрослого человека, мг	Пищевые источники
B <sub>3</sub>	Образование кофермента А и простетической группы ацилпереносящего белка (АПБ)	7,0	Во многих пищевых продуктах
B <sub>6</sub>	Образование кофермента пиридоксальфосфата	2,0	Мясо, овощи, зерновые
B <sub>12</sub>	1. Образование кофермента 5'-дезокси-аденозилкобаламина. 2. Участие в восстановлении рибонуклеотидов бактериями	0,002	Кишечная микрофлора, мясо, печень, яйца, молоко
B <sub>c</sub>	Образование кофермента ТГФ	0,2	Свежая зелень, овощи, печень
C	1. Участие в процессах синтеза коллагена, катехоламинов, желчных кислот и деградации тирозина. 2. Антиоксидант	60	Фрукты, овощи
H	Кофермент карбоксилаз	0,1	Дрожжи, орехи, бобы
PP	Образование коферментов НАД <sup>+</sup> и НАДФ <sup>+</sup>	20	Мясо, овощи, фрукты, дрожжи
<b>Водорастворимые витамины</b>			
U	Участие в метилировании биогенных аминов	50	Капуста, мясо, бобы
Липоевая кислота и ее амид	Кофермент мультиферментных дегидрогеназ (ПДГ, ОДГ и др.)	10	Печень
<b>Жирорастворимые витамины</b>			
A <sub>1</sub>	1. Участие в процессах роста и дифференциации эпителиальных и костных тканей. 2. Увеличение проницаемости мембран для углеводов. 3. Стимуляция образования спермы	1,0	Фрукты, овощи

Витамин	Функция в организме	Суточная потребность для взрослого человека, мг	Пищевые источники
A <sub>2</sub>	Простетическая группа светочувствительного белка родопсина	1,0	Молоко, желток яйца, печень
A <sub>3</sub>	Участие в процессе дифференциации клеток (в 10 раз активнее A <sub>1</sub> )		Рыбий жир
D <sub>2</sub>	Образование гормона кальцитриола, поддерживающего в организме постоянство концентрации ионов Ca <sup>2+</sup> и фосфата	0,01	Рыбий жир, молоко, желток
D <sub>3</sub>		Для птиц	
E	Антиоксидант	15	Растительные масла, печень, яйца, зерновые
K <sub>1</sub>	Коферменты в реакциях $\gamma$ -карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в предшественнике протромбина и в других факторах свёртывания крови	0,3	Кишечная микрофлора, овощи, печень
K <sub>2</sub>			
K <sub>3</sub>			

За последние годы возрос интерес к витаминам и так называемой «здоровой пище». Получили широкое распространение биологически активные добавки (БАДы), содержащие витамины.

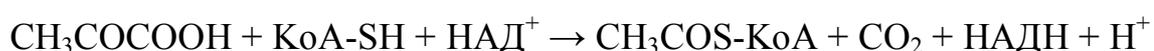
В производство пищевых продуктов все шире внедряется обогащение их витаминными препаратами. В связи с этим актуальной является разработка научно обоснованных норм по содержанию витаминов в пищевых продуктах, БАДах и лекарственных препаратах. Все витамины применяют в медицинской практике как лекарственные средства.

Основной специфической функцией водорастворимых витаминов в организме является образование коферментов. Из жирорастворимых витаминов лишь витамины К и A<sub>2</sub> осуществляют коферментную функцию, а остальные участвуют не в ферментативных реакциях, а в различных физиологических процессах.

Знание функций витаминов позволяет понять причину возникновения различных патологических состояний, связанных с нарушением метаболизма веществ. Общим положением является то, что дефицит того или иного витамина приводит к снижению активности соответствующего фермента и, следовательно, к торможению соответствующей ферментативной реакции. Поскольку организм является сбалансированной саморегулирующейся системой, изменение метаболизма какого-либо вещества влечет за собой изменение обмена и других метаболитов. Наблюдаемые изменения организма в целом проявляются не сразу, поскольку организм в начальном этапе дефицита какого-либо витамина компенсирует возникшее отклонение, изменяя метаболизм других веществ так, чтобы снизить отрицательное влияние дефицита витамина (состояние гиповитаминоза). Если дефицит витамина устранен, организм возвращается в нормальное состояние. В том случае, если дефицит витамина большой и длится длительное время, возникает авитаминоз, и когда компенсаторные ресурсы организма исчерпаны наступает летальный исход.

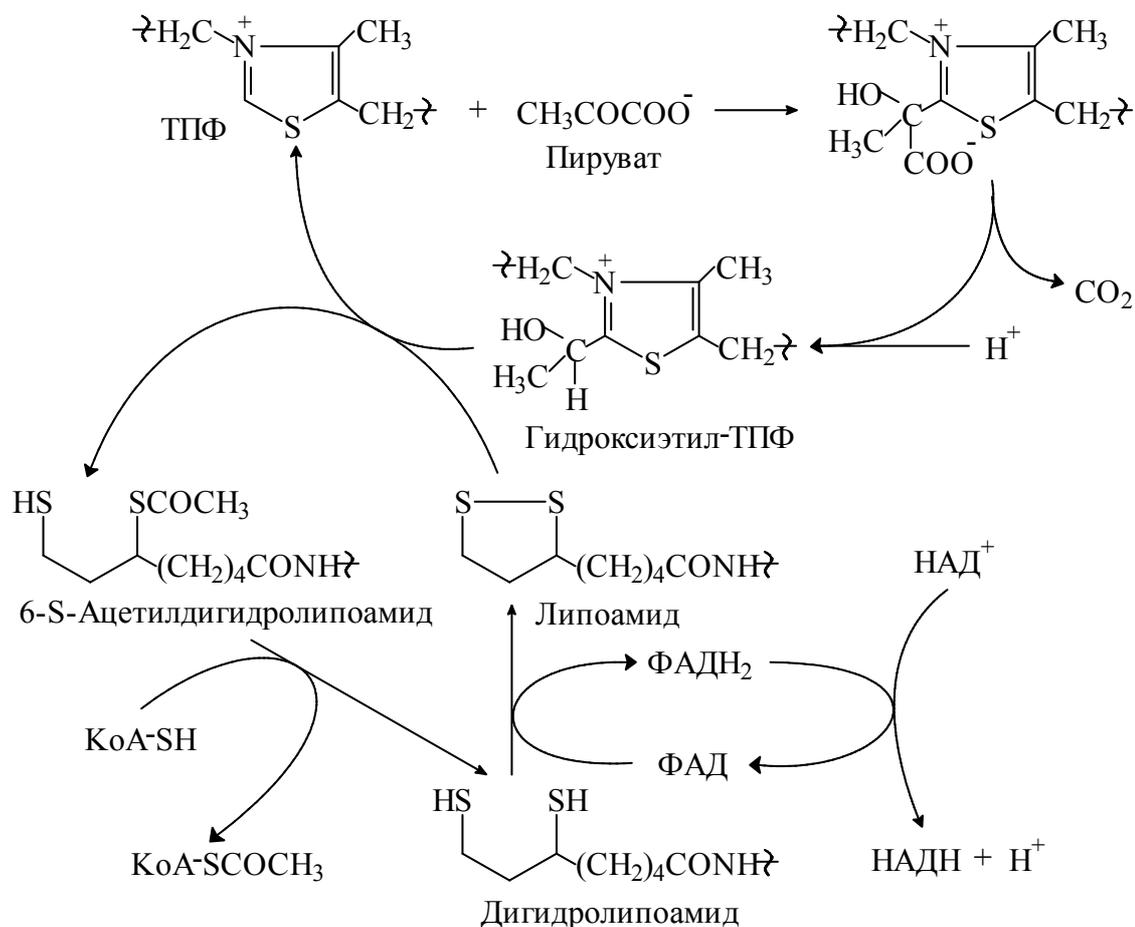
Важнейшей реакцией, связывающей гликолиз с цитратным циклом, является реакция превращения конечного продукта гликолиза пирувата в ацетил-КоА, являющегося исходным соединением для цитратного цикла. Эта сложная многостадийная реакция катализируется пируватдегидрогеназным комплексом ферментов (ПДГ комплекс). В пируватдегидрогеназной реакции участвуют три фермента – пируватдегидрогеназа ( $E_1$ ), дигидролипоацетилтрансфераза ( $E_2$ ) и дигидролипоамиддегидрогеназа ( $E_3$ ), а также пять коферментов – ТПФ, липоамид, ФАД, НАД<sup>+</sup> и КоА. Эти коферменты различными способами ассоциированы с белковыми компонентами ферментов. ТПФ нековалентно связан в активном центре  $E_1$ , липоамид ковалентно связан с остатком лизина  $E_2$  и ФАД также прочно ассоциирован с  $E_3$ . НАД<sup>+</sup> и КоА взаимодействуют с комплексом в виде растворимых коферментов.

В общем виде эта реакция описывается следующим уравнением:



Из этого уравнения видно, что в этой реакции участвуют два водорастворимых кофермента – КоА и НАД<sup>+</sup>. Однако процесс на самом

деле гораздо сложнее. Совокупность процессов, происходящих при пируватдегидрогеназной реакции, показана на рис. 1.3.



Р и с. 1.3. Механизм пируватдегидрогеназной реакции

Пируватдегидрогеназа ( $E_1$ ) катализирует декарбоксилирование пирувата, перенос образованного гидроксиэтильного остатка на ТПФ и окисление гидроксиэтильной с образованием ацетильного остатка, который переносится на липоамид. Следующий фермент, дигидролипоаминацетилтрансфераза ( $E_2$ ), переносит ацетильный остаток с липоамида на КоА, при этом липоамид восстанавливается до дигидролипоамида. Последний вновь окисляется до липоамида  $\text{НАД}^+$  под действием третьего фермента – дигидролипоамид-дегидрогеназы ( $E_3$ ), простетической группой которого является ФАД.

Все три типа ферментов объединены в один мультиферментный комплекс, состоящий из 60 субъединиц ( $E_1$  – 24 молекулы,  $E_2$  – 24 молекулы и  $E_3$  – 12 молекул).

Таким образом, при детальном рассмотрении этой реакции видно, что для ее осуществления необходимы 5 различных коферментов, а следовательно и пять витаминов: тиамин, липоевая кислота, рибофлавин, пантотеновая кислота и никотинамид.

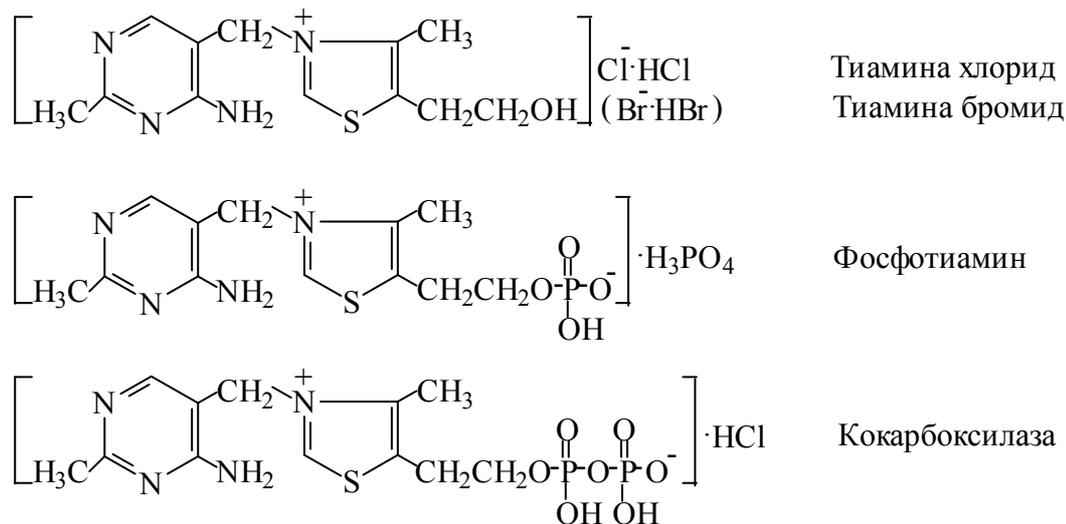
К каким же последствиям приведет недостаток хотя бы одного из них? Ответ очевиден – к торможению пируватдегидрогеназной реакции и, следовательно, к снижению выработки ацетил-КоА ( $\text{CoA-SCoCH}_3$ ) и накоплению пирувата.

Ацетил-КоА является ключевым метаболитом цикла Кребса. Этот циклический процесс происходит в матриксе митохондрий и поддерживает работу дыхательной цепи, функционирование которой обеспечивает процесс окислительного фосфорилирования. Следовательно, дефицит рассматриваемых витаминов приведет к угнетению клеточного дыхания и снижению выработки АТФ. Уменьшение выработки АТФ будет проявляться в снижении интенсивности обменных процессов в организме в целом, что проявляется в вялости, быстрой утомляемости, отсутствии аппетита, расстройстве центральной нервной системы и т.д.

Таким образом, биологическое действие того или иного витамина однозначно определяется его функцией в организме. В задачу настоящего пособия не входит детальное рассмотрение всех биохимических реакций в организме, в каждой из которых в конечном итоге принимают участие витамины. Ниже мы кратко рассмотрим лишь биологическое действие рассматриваемых витаминов и их применение в качестве лекарственных и профилактических средств.

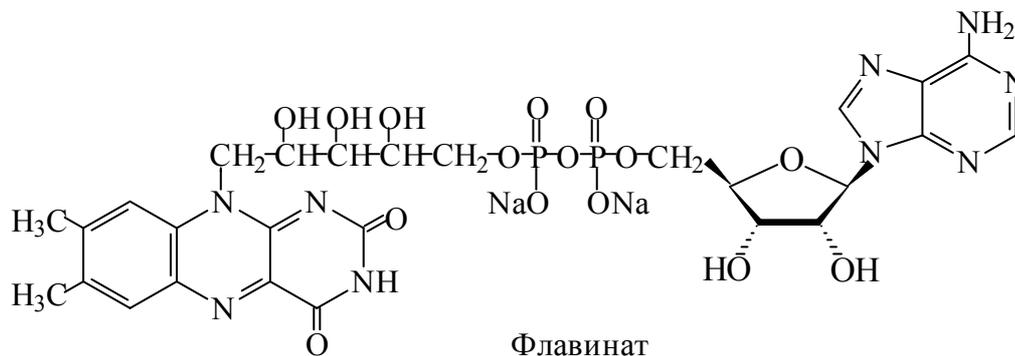
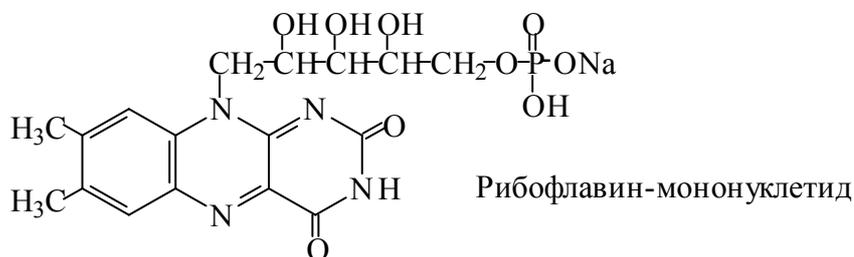
**Витамин В<sub>1</sub>** регулирует в организме процессы, связанные с обменом углеводов. Препараты витамина В<sub>1</sub> применяются как фармакотерапевтические средства с широким спектром действия при самых различных заболеваниях. Основные показания к применению этих препаратов – нарушение функций центральной нервной системы, легкие формы склероза, нарушение сердечного ритма, недостаточность коронарного кровообращения и другие сердечно-сосудистые заболевания.

Фармацевтической промышленностью выпускаются следующие препараты тиамина: тиамина хлорид, тиамина бромид, фосфотиамин, кокарбоксилаза. Ниже представлены структурные формулы этих препаратов:



В медицинской практике применяют также пивные дрожжи в качестве источника витамина В<sub>1</sub>.

**Группа витамина В<sub>2</sub>**, кроме рибофлавина (см. табл. 1.1), включает в себя еще два лекарственных препарата – рибофлавин-моноклеотид и флавионат. Рибофлавин-моноклеотид представляет собой моносодиевую соль кофермента ФМН; флавионат является динатриевой солью кофермента ФАД:



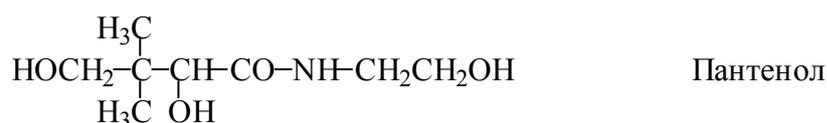
При поступлении в организм рибофлавин взаимодействует с аденозинтрифосфатом (АТФ) и образует коферменты ФМН и ФАД.

Эти коферменты связываются ковалентно с флавинопротеинами и участвуют в переносе водорода в окислительно-восстановительных

реакциях. Рибофлавин, ФМН и ФАД принимают участие в процессах углеводного, белкового и липидного обмена. Они играют также важную роль в поддержании нормальной зрительной функции глаза и в синтезе гемоглобина.

В медицинской практике препараты рибофлавина применяют при различных заболеваниях глаз, длительно не заживающих язвах и ранах, лучевой болезни, желтухе, отсутствии аппетита и др.

**Группа витамина В<sub>3</sub>** представлена двумя лекарственными препаратами – кальция пантотенат (кальциевая соль D (+)-пантотеновой кислоты) и пантенол:



Витамин В<sub>3</sub> выпускают в виде кальциевой соли в связи с тем, что пантотеновая кислота в ходе синтеза образуется в виде густого сиропа и с трудом подвергается очистке. Пантенол является провитамином витамина В<sub>3</sub>. В организме из пантотеновой кислоты и пантенола образуется кофермент А (см. табл. 1.3.), который играет ключевую роль в обмене жиров, углеводов и белков, а также в процессах ацетилирования и β-окисления высших жирных кислот.

Применяют кальция пантотенат при различных патологических состояниях, связанных с нарушением обменных процессов. Пантенол применяют наружно при различных поражениях кожного покрова.

**Группа витамина В<sub>6</sub>** представлена близкими по строению производными пиридина, структурные формулы которых представлены в табл. 1.1.

В организме они легко превращаются друг в друга и образуют кофермент – пиридоксальфосфат (см. табл. 1.3.).

Пиридоксальфосфат является коферментом ферментов, катализирующих реакции декарбоксилирования и трансаминирования. В связи

с этим он играет ключевую роль в процессах липидного, белкового и аминокислотного обмена.

В качестве лекарственных препаратов применяются пиридоксина гидрохлорид и пиридоксальфосфат. Основные показания к применению – нарушения белкового и липидного обмена. Например, пиридоксальфосфат проявляет высокую эффективность при различных кожных заболеваниях (крапивница, экзема, нейродермиты, псориаз и др.).

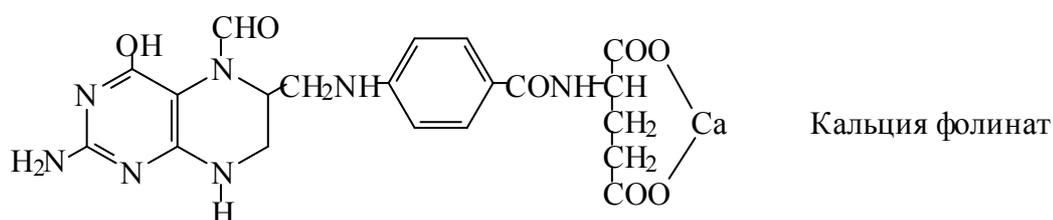
**Группа витамина В<sub>12</sub>** представлена четырьмя соединениями: коферментной формой витамина В<sub>12</sub> – 5'-дезоксаденозилкобаламином (см. табл. 1.3.) и тремя витамерами – цианокобаламином, метилкобаламином, оксикобаламином (см. табл.1.1).

В качестве лекарственных средств выпускаются цианокобаламин и коферментная форма витамина В<sub>12</sub> – 5'-дезоксаденозилкобаламин под названием «кобабамид».

Витамеры В<sub>12</sub> синтезируются почти исключительно микроорганизмами, особенно актиномицетами и зелеными водорослями. Они найдены практически во всех животных тканях. В организме человека кобаламины синтезируются микрофлорой кишечника, однако в недостаточном количестве. Дополнительные количества этого витамина должны поступать с пищевыми продуктами животного происхождения.

Витамин В<sub>12</sub> является фактором роста, необходим для нормального кроветворения, активизирует обмен углеводов, липидов и аминокислот. Он активизирует свертывающую систему крови, понижает содержание холестерина в ней, оказывает выраженный лечебный эффект при злокачественной анемии.

**Группа витамина В<sub>c</sub> (группа фолиевой кислоты)** представлена двумя лекарственными препаратами – фолиевой кислотой (см. табл.1.1) и кальция фолинатом:



В организме фолиевая кислота восстанавливается до тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФ), являющейся коферментом  $C_1$ -трансфераз, катализирующих перенос одноуглеродных фрагментов (см. табл. 1.3).

Прежде всего фолиевая кислота необходима для нормального образования клеток крови. Вместе с витамином  $B_{12}$  ТГФ стимулирует эритропоэз, участвует в синтезе аминокислот, нуклеиновых кислот, пуринов, в обмене холина и других метаболических процессах.

Кальция фолиат – кальциевая соль фолиевой кислоты, которая является активным метаболитом фолиевой кислоты. Кальция фолиат применяется как антагонист побочного действия противоопухолевого препарата метатрексата.

**Витамин С (аскорбиновая кислота)** содержится в значительных количествах в продуктах растительного происхождения (сладкий перец, плоды шиповника, цитрусовые, капуста, хрен, хвоя, фрукты, ягоды и др.). Организм человека не способен сам синтезировать витамин С.

Аскорбиновая кислота является коферментом оксигеназ, а также обладает свойствами антиоксиданта.

Одной из важных физиологических функций аскорбиновой кислоты является ее участие в синтезе коллагена и нормализации проницаемости капилляров. Она участвует также в регулировании углеводного обмена, окислительно-восстановительных процессов, свертываемости крови, регенерации тканей, образовании стероидных гормонов, обеспечивает нормальный гематологический и иммунологический статус организма и его устойчивость к инфекции и стрессу.

Как антиоксидант аскорбиновая кислота используется при производстве жиров и фруктовых соков; для предотвращения образования в мясных и колбасных изделиях канцерогенных нитрозаминов из нитрита натрия, добавляемого к этим продуктам для сохранения их природного цвета; для витаминизации молока и молочных продуктов и др.

**Витамин Н (биотин)** является коферментом карбоксилаз – ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования. Он ковалентно связан через аминогруппу остатка лизина с ферментом. Биотин реагирует с гидрокарбонат-ионом ( $HCO_3^-$ ) в присутствии АТФ с образо-

ванием N-карбоксибиотина. Эта активная форма диоксида углерода переносит далее карбоксильную группу на акцептор.

Биотин широко распространен в природе. Особенно им богаты печень, почки, яичный желток, зерна ржи и цветная капуста. Недостаток биотина в организме вызывает шелушение кожи, пепельную бледность лица, мышечные боли, облысение. В медицине его применяют при церрозе печени, сахарном диабете и в дерматологической практике.

Биотин синтезируется микрофлорой кишечника, в связи с чем в нормальных условиях дефицит биотина не наблюдается. Следует иметь в виду, что в сыром яичном белке находится гликопептид авидин, который связывает биотин в нерастворимый комплекс и нарушает его всасывание из кишечника.

Биотин является исключительно высокоактивным стимулятором роста дрожжей, при изучении роста которых он и был открыт.

**Группа витамина РР** (от «preventive pellagra» – предупреждающий пеллагру) представлена двумя лекарственными препаратами – никотиновой кислотой и её амидом (никотинамид). Никотиновая кислота и её амид используются организмом для синтеза важнейших растворимых коферментов – никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) и никотинамидадениндинуклеотид-фосфата (НАДФ<sup>+</sup>) (см. табл. 1.2).

Витамин РР обладает не только противопеллагрическим действием; он улучшает углеводный обмен, действует положительно при диабете, заболеваниях печени, сердца, язве желудка, вяло заживающих ранах и язвах, оказывает сосудорасширяющее действие.

**Витамин U (метилметионинсульфония хлорид)** представляет собой активированную форму метионина (см. табл. 1.1) Он участвует в реакциях метилирования биогенных аминов. Например, метилируя гистамин, витамин U превращает его в неактивный N-метилгистамин, что способствует уменьшению желудочной секреции и обуславливает обезболивающий эффект.

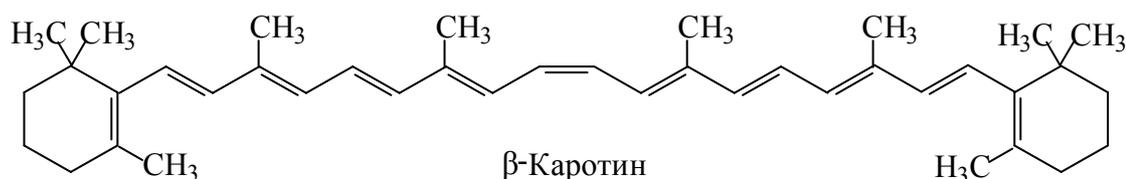
Применяют витамин U при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, хроническом гастрите.

**Липоевая кислота и ее амид**, взаимодействуя с аминогруппой остатка лизина молекулы фермента, связываются с ним с ковалентной амидной связью, образуя так называемую «липоамидную ручку». Дисульфидный мостик «липоамидной ручки» выполняет функцию окислительно-восстановительного центра. Липоамид является простетической группой всех мультиферментных комплексов (ПДГ, ОДГ и др.), осуществляющих окислительное декарбоксилирование 2-кетокислот.

Липоевая кислота и липоамид (см. табл.1.1) выпускаются в качестве лекарственных средств, которые применяются в комплексной терапии коронарного атеросклероза, заболеваний печени и различных интоксикаций.

**Группа витамина А** представлена тремя природными соединениями – А<sub>1</sub> – ретинол, А<sub>2</sub> – ретиналь, А<sub>3</sub> – ретиноевая кислота (см. табл.1.1), каждое из которых играет в организме свою роль.

В организме витамины А<sub>1</sub> и А<sub>2</sub> легко превращаются друг в друга, и в конечном итоге – в ретиноевую кислоту. Ретинол, таким образом, является предшественником ретиналя и ретиноевой кислоты. Ретинол в организме образуется при окислительном расщеплении провитамина – β-каротина, содержащегося в свежих овощах и фруктах:



Ретиналь и ретиноевая кислота содержатся в продуктах животного происхождения. В связи с тем, что ретинол легко окисляется на воздухе, его выпускают в виде эфиров с уксусной и пальмитиновой кислотами (лекарственные препараты – ретинола ацетат и ретинола пальмитат).

Основные функции витаминов группы А приведены в табл. 1.4. Ретиналь частично изомеризуется в организме в 11-*цис*-ретиналь, который, взаимодействуя с аминогруппой остатка лизина белка опсина, образует светочувствительный хромопептид – родопсин.

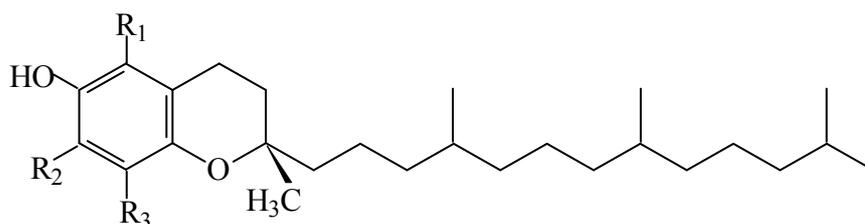


вует в пищевых продуктах, возникает D-гиповитаминоз. Основное следствие недостаточности витамина D – нарушение минерализации костной ткани (рахит у детей, остеомаляция, т.е. размягчение костей, у взрослых).

Кроме лечения и профилактики рахита кальциферолы применяют для лечения заболеваний кожи и слизистых оболочек. Кальциферолы применяют также в зоотехнической практике для предупреждения рахита у цыплят, поросят, телят и другого молодняка.

Витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> высокотоксичны. Они вызывают развитие D-гипервитаминоза, характеризующегося кальцификацией внутренних органов и тканей, что ведет к необратимым нарушениям их функций и в наиболее тяжелых случаях – к летальному исходу.

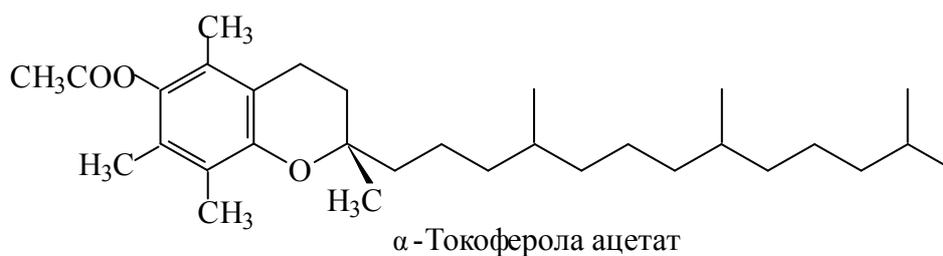
**Витамины группы E (токоферолы)** представляют собой группу близких по строению производных хромана, включающую в себя 7 соединений, общая формула которых приведена ниже:



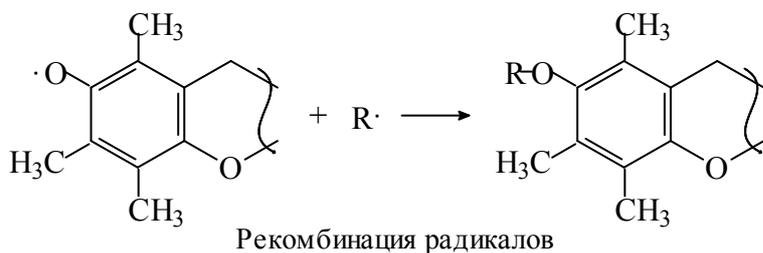
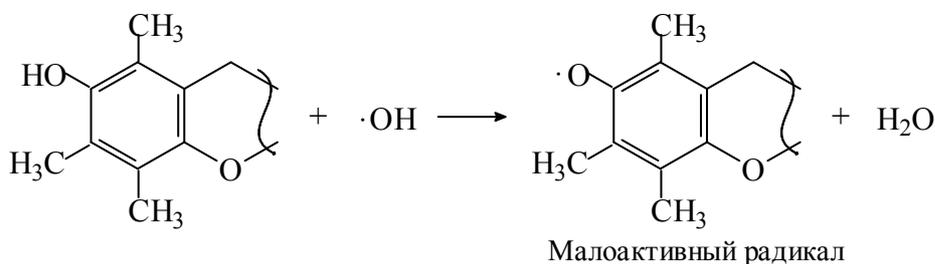
**Токоферолы (витамин E)**

Название	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α-токоферол	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-токоферол	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ-токоферол	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
ζ-токоферол	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
δ-токоферол	H	H	CH <sub>3</sub>
ε-токоферол	CH <sub>3</sub>	H	H
η-токоферол	H	CH <sub>3</sub>	H

Все эти токоферолы выделены из растений и все они обладают E-витаминной активностью. В медицинской практике применяется наиболее активный из токоферолов – α-токоферол. Его получают синтетическим путем и выпускают в форме ацетата:



В организме витамин Е выполняет функцию антиоксиданта. Его антиоксидантные свойства основаны на способности образовывать устойчивые малореакционноспособные свободные радикалы в результате отщепления атома водорода от гидроксильной группы при взаимодействии с активными радикалами. Эти малореакционноспособные радикалы далее вступают во взаимодействие с активными свободными радикалами, образуя при окислении веществ кислородом (рекомбинация радикалов). Например, при окислении α-аминокислот кислородом образуется перекись водорода, которая легко распадается на два активных гидроксильных радикала. Гидроксильные радикалы, реагируя с различными метаболитами, нарушают протекание нормальных реакций в клетке и генерируют другие активные радикалы (R·). Таким образом, развивается цепная радикальная реакция, что приводит к нарушению метаболизма:



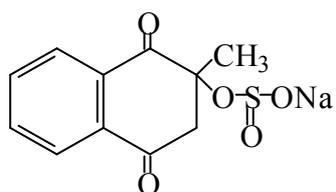
Витамин Е является своеобразной «ловушкой» для активных радикалов, он легко реагирует с ними, образуя малоактивный радикал, который далее рекомбинирует, и таким образом цепной радикальный процесс обрывается.

Витамин Е находится главным образом в мембранах клеток и субклеточных органелл и благодаря своим свойствам дезактивировать активные радикалы предотвращает окисление ненасыщенных липидов мембран, защищая их от разрушения. Кроме этого он участвует в синтезе гема и белков, пролиферации клеток, в тканевом дыхании и других процессах клеточного метаболизма.

При недостатке витамина Е наблюдаются дегенеративные изменения в скелетных мышцах, мышце сердца, нервных окончаниях и печени. Наблюдается также повышение ломкости капилляров и перерождение эпителия семенных канальцев и яичек.

**Витамины группы К – противогеморрагические витамины** способствуют нормальному свертыванию крови. В природе существуют две формы витамина К – К<sub>1</sub> (филлохинон) и К<sub>2</sub> (менахиноны) (см. табл.1.1). Все они являются 3-замещенными производными 2-метил-1,4-нафтохинона.

Филлохинон синтезируется растениями и содержится в листьях шпината, цветной капусты, плодах шиповника, зеленых томатах и



Викасол–растворимая форма менадиона

других зеленых овощах. Менахиноны синтезируются кишечной микрофлорой человека, а также печенью животных. Менадион (К<sub>3</sub>) является синтетическим аналогом природных витаминов К.

В нашей стране применяется в медицинской практике водорастворимая форма менадиона – викасол. Викасол представляет собой бисульфитное производное менадиона. Менадион и викасол проявляют К-витаминную активность.

Витамин К является коферментом, принимающим участие в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты белков плазмы крови, что является необходимым этапом процесса свертывания крови.

Общими показаниями к применению витамина К в лечебных и профилактических целях являются патологические состояния, сопровождающиеся геморрагическим синдромом и пониженным содержанием протромбина в крови.

#### 1.1.4. ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИТАМИНОВ И ИХ АНАЛИЗ

Физические свойства витаминов используются прежде всего для анализа субстанций витаминов. Определение таких констант, как температура плавления (т.пл.), удельное вращение ( $[\alpha]_D^{20}$ ) и молярный ( $\epsilon$ ) или удельный ( $E_{1\text{см}}^{1\%}$ ), показатели поглощения в УФ-области спектра, применяется для идентификации витаминов в субстанциях.

Метод УФ-спектроскопии используется как для идентификации, так и для количественного анализа витаминов в субстанциях, лекарственных формах, природных и пищевых продуктах.

В анализе пищевых продуктов, лекарственных средств и сложных биологических объектов наряду с традиционными хроматографическими методами (тонкослойная и бумажная хроматография) все более широкое применение находят методы хромато-масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В табл. 1.5 приведены основные физические свойства витаминов.

Таблица 1.5

#### Физические свойства витаминов

Название и буквенное обозначение	Внешний вид и физические свойства
Тиаминхлорида гидрохлорид – В <sub>1</sub>	Бесцветные пластинки; гигроскопичен; т.пл. 247-8°C с разл.; растворимость в воде 100 г/100 мл; УФ-спектр в воде при рН 7, $\lambda_{\text{max}}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 235, (11300); 267, (8300)
Рибофлавин – В <sub>2</sub>	Желтые иглы; разлагается около 280°C; $[\alpha]_D^{20}$ -117 в 0,1М NaOH; растворимость в воде 0,01 г/100 мл; рK <sub>a</sub> 9,69; УФ-спектр в воде при рН 7, $\lambda_{\text{max}}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 266, (32500); 373, (10600); 445, (12500)
Пантотеновая кислота – В <sub>3</sub>	Гигроскопичное вязкое масло; $[\alpha]_D^{20}$ +37,5 в воде; хорошо растворим в воде, спирте
Пантотенат кальция – В <sub>3</sub>	Белые кристаллы; т.пл. 196°C с разл.; $[\alpha]_D^{20}$ +28,2 в воде; растворимость в воде 14,5 г/100 мл
Пиридоксина гидрохлорид – В <sub>6</sub>	Белые пластинки; т.пл. 205-12°C с разл.; растворимость в воде 22 г/100 мл; УФ-спектр в воде при рН 6,8, $\lambda_{\text{max}}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 254, (3700); 324, (7100)

Название и буквенное обозначение	Внешний вид и физические свойства
Пиридоксаль гидрохлорид – В <sub>6</sub>	Белые ромбические кристаллы; т.пл. 165°C с разл.; растворимость в воде 50 г/100 мл; УФ-спектр в воде при pH 7,0, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 252; 318, (8200)
Фолиевая кислота – В <sub>9</sub>	Оранжево-желтые кристаллы; т.пл. 250°C с разл.; $[\alpha]_D^{20}$ +23 в 0,1М NaOH; растворимость в кипящей воде 0,05 г/100 мл; УФ-спектр в воде при pH 7, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 282, (27000); 350, (7000); инактивируется под действием УФ-света
Цианокобаламин – В <sub>12</sub>	Красные гигроскопичные кристаллы; разл. выше 300°C; растворимость в воде 1,2 г/100 мл; УФ-спектр в воде, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 278, (16300); 305, (9700); 322, (7900); 361, (28100); 518, (7400); 550, (8700)
Аскорбиновая кислота – С	Белые кристаллы; т.пл. 192°C с разл.; $pK_a$ 4,04; $[\alpha]_D^{20}$ +23 в H <sub>2</sub> O; растворимость в воде 33,3 г/100 мл; УФ-спектр в воде, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 265, (7000)
Биотин – Н	Белые иглы; т.пл. 232-3°C; $[\alpha]_D^{20}$ +92 в 0,1М NaOH; растворимость в воде 0,02 г/100 мл
Никотинамид – РР	Белые иглы; т.пл. 128-31°C; растворимость в воде 100 г/100 мл, в спирте – 66 г/100 мл; УФ-спектр в воде, $\lambda_{\max}$ , нм: 261,5, ( $\epsilon$ зависит от pH)
Никотиновая кислота – РР	Белые иглы; т.пл. 236-7°C (возгоняется); растворимость в воде 1,7 г/100 мл, растворим в спирте; УФ-спектр в воде, $\lambda_{\max}$ , нм: 261,5.
Метилметионинсульфония бромид – U	Белые иглы; т.пл. 139-41°C с разл.; растворим в воде, в этаноле 0,012 г/100 мл
Липоевая кислота	Светло-желтые пластинки; т.пл. 47,5°C; $pK_a$ 4,76; $[\alpha]_D^{20}$ +104 в бензоле; нерастворим в воде, хорошо растворим в бензоле, спирте; УФ-спектр в метаноле, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 333, (150)
Ретинол – А <sub>1</sub>	Желтые призмы; т.пл. 64°C; растворим в эфире, хлороформе; УФ-спектр в спирте, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 325, (52480); легко окисляется на воздухе и разрушается под действием УФ-света
Ретинола ацетат, синтетический аналог – А <sub>1</sub>	Бледно-желтые кристаллы со слабым запахом; т.пл. 53-57°C
Ретиналь – А <sub>2</sub>	Оранжевые кристаллы; т.пл. 61-4°C; растворим в эфире, хлороформе; УФ-спектр в спирте, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 325, (52480) по стабильности аналогичны ретинолу

Название и буквенное обозначение	Внешний вид и физические свойства
Ретиноевая кислота – А <sub>3</sub>	Желтые иглы; т.пл. 179-80°C; растворима в спирте, эфире, хлороформе; УФ-спектр в спирте, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 350, (45400); по стабильности аналогична ретинолу
Холекальциферол – D <sub>3</sub>	Тонкие бесцветные иглы; т.пл. 84-5°C; $[\alpha]_D^{20}$ +51,9 в хлороформе; растворим в спирте, эфире, хлороформе; УФ-спектр в гексане, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 265, (18200); чувствителен к свету
Эргокальциферол – D <sub>2</sub>	Бесцветные иглы; т.пл. 121°C; $[\alpha]_D^{20}$ +106 в спирте; растворим в спирте, эфире, хлороформе; чувствителен к свету
$\alpha$ -Токоферол – E	Светло-желтое масло; т.пл. 2,5-3,5°C; растворим в эфире, хлороформе, спирте; УФ-спектр в спирте $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 292, (3260); темнеет на воздухе, чувствителен к УФ-свету
$\alpha$ -Токоферола ацетат, синтетический аналог – E	Желтые кристаллы; т.пл. 28°C; растворим в эфире, хлороформе, спирте; УФ-спектр в спирте, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 284, (2050)
Филлохинон – K <sub>1</sub>	Желтое вязкое масло; растворим в эфире, спиртах, бензоле; УФ-спектр в петролейном эфире, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 242, (17850); 248, (18880); 260, (17260); 269, (17440); 325, (30656)
Менахинон-6 – K <sub>2</sub>	Желтые кристаллы; т.пл. 50°C; растворим в бензоле, эфире, гексане; УФ-спектр в гексане, $\lambda_{\max}$ , нм, ( $\epsilon$ ): 243, (17850); 248, (18870); 261, (17050); 270, (17150); 326, (3100)
Викасол – синтетический аналог витамина K <sub>3</sub>	Белый кристаллический порошок; легко растворим в воде

В самое последнее время всё больше завоевывает признание метод иммуноферментного анализа (ИФА метод) витаминов, позволяющий быстро и достаточно точно определять содержание витаминов в пищевых продуктах, растительном сырье, тканях организма, биологических жидкостях и т.д.

Методы ИФА основаны на том, что исследуемый объект обрабатывается специфическим для каждого витамина набором реагентов, включающим в себя фермент, субстрат для данного фермента и реактивы для перевода витамина в кофермент данного фермента. В результате такой обработки начинается специфическая ферментативная реакция с участием кофермента, образовавшегося из витамина, скорость которой про-

порциональна активности фермента, а соответственно и концентрации витамина. Контроль за ходом реакции осуществляется обычно спектральным методом. Для экспресс-ИФА-анализа витаминов в различных жидких объектах выпускаются тест-полоски, уже обработанные необходимыми реагентами. О содержании витамина судят по интенсивности окраски, развивающейся на полоске.

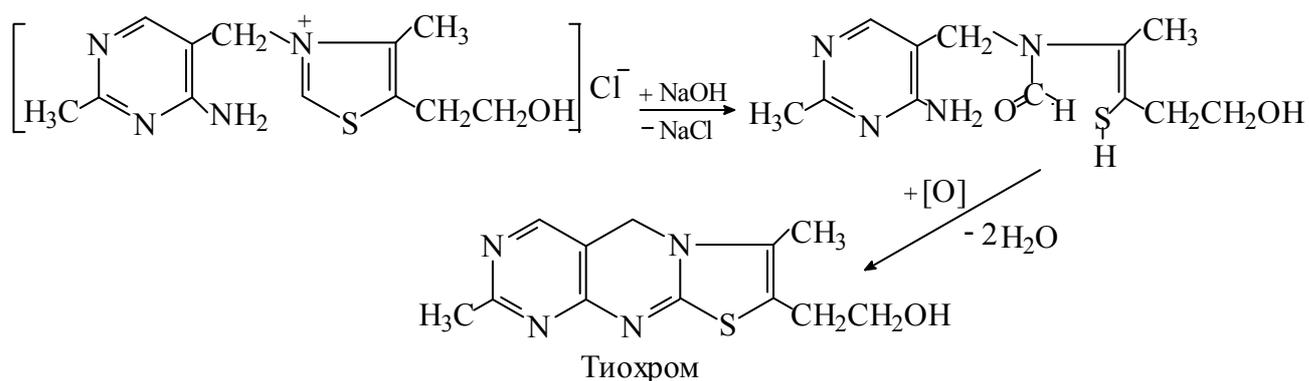
### 1.1.5. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИТАМИНОВ И ИХ АНАЛИЗ

В связи с большим разнообразием строения витаминов и, соответственно, их химических свойств целесообразно рассмотреть химические свойства наиболее важных витаминов отдельно.

#### 1.1.5.1. Витамины группы В<sub>1</sub>

В состав молекул витаминов группы В<sub>1</sub> входят два гетероциклических кольца – пиримидиновый и тиазольный, связанные метиленовой группой. Кроме того, в молекулах препаратов тиамин содержит первичную ароматическую аминогруппу. Эти общие элементы структуры обуславливают общие химические свойства препаратов этой группы.

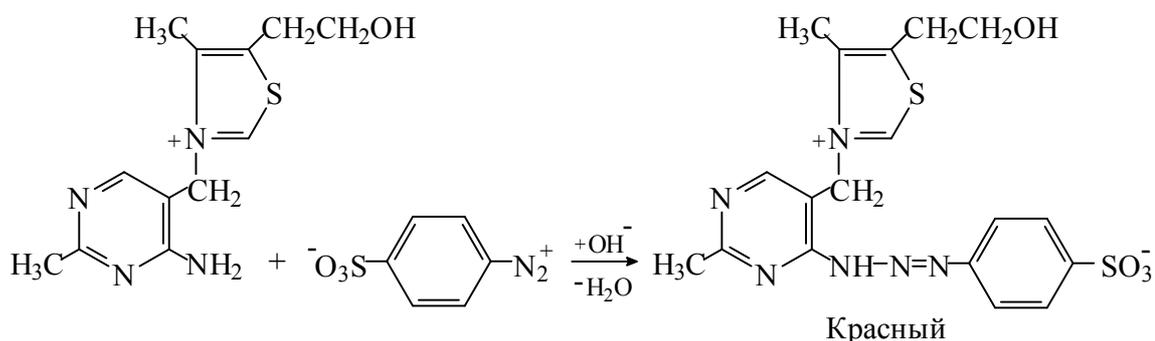
Препараты тиамин легко окисляются в щелочной среде, образуя тиохром, который в УФ-свете имеет характерную синюю флюоресценцию, исчезающую при подкислении и вновь возникающую при подщелачивании. Эта реакция известна под названием тиохромной пробы и является специфической для препаратов группы тиамин:



Окисление обычно проводят красной кровяной солью, а тиохром извлекают из водного раствора бутиловым или изоамиловым спиртом.

Тиохромную пробу используют для качественного и количественного флюориметрического анализа витамина В<sub>1</sub> в лекарственных препаратах, растительном сырье и пищевых продуктах.

Тиамин в нейтральной или слабощелочной среде реагирует с солями диазония с образованием окрашенных в красный цвет триазенов:



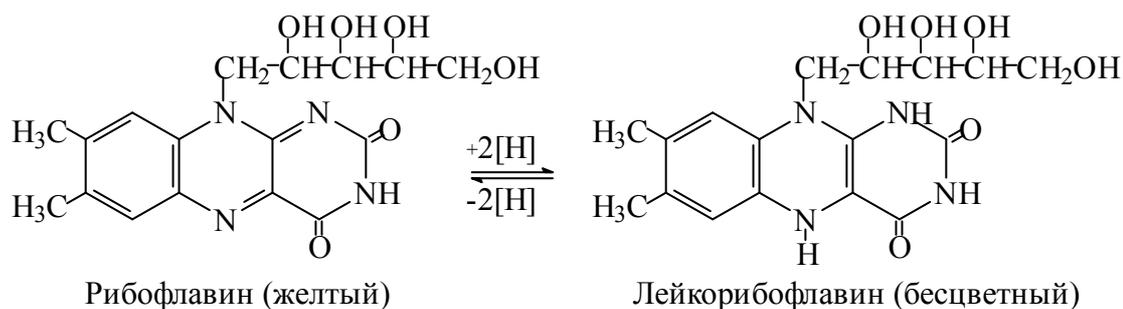
Эта реакция неспецифична, её проведению мешают фенолы и ароматические амины. Для проведения этой реакции обычно используют диазореактив, полученный из сульфаниловой кислоты.

Эта реакция применяется для спектрофотометрического и фотоэлектроколориметрического количественного анализа тиамина в растворах.

#### 1.1.5.2. Витамины группы B<sub>2</sub>

Витамин B<sub>2</sub> – рибофлавин – является производным спирта рибитола и гетероцикла изоаллоксазина. Его систематическое название – 6,7– диметил-9-(1-D-рибитил)изоаллоксазин. Химическая структура этого витамина высоко-специфична, даже незначительные её изменения вызывают полную потерю витаминной активности.

Рибофлавин легко восстанавливается, принимая два атома водорода, до лейкорибофлавина. При этом нарушается сопряженная система связей, что сопровождается исчезновением окраски. Лейкорибофлавин легко окисляется (в организме под действием НАД<sup>+</sup>) до рибофлавина. Благодаря этим химическим свойствам коферменты, образующиеся в организме из рибофлавина ФМН и ФАД (см. табл. 1.2), участвуют в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в организме:

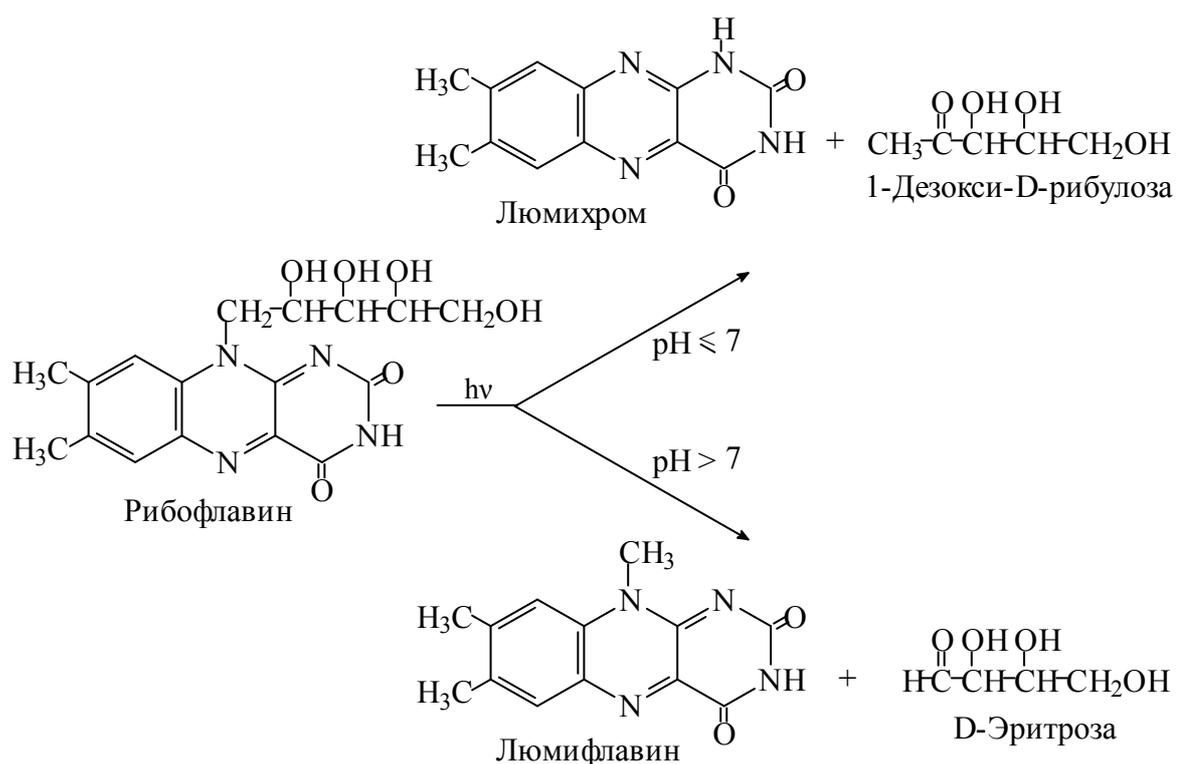


Водные растворы рибофлавина имеют зеленовато-желтую окраску и интенсивную зеленую флюоресценцию в ультрафиолетовом свете. При подкислении или подщелачивании раствора флюоресценция исчезает, но зеленовато-желтая окраска сохраняется. При добавлении к водному раствору рибофлавина какого-либо восстановителя, например, гидросульфита натрия, исчезают и флюоресценция, и окраска вследствие восстановления рибофлавина до бесцветного лейкорибофлавина, не обладающего флюоресценцией. Эти специфические свойства используются как для идентификации, так и для количественного определения рибофлавина флюориметрическим методом в лекарственных препаратах, пищевых продуктах и биологических объектах.

Характерной особенностью рибофлавина является его чрезвычайная фотолабильность. Рибофлавин в водном растворе претерпевает ряд фотохимических превращений в зависимости от pH среды.

При действии ультрафиолетового света на нейтральные или кислые растворы рибофлавина происходит его распад с образованием 1-дезоксид-*D*-рибулозы и люмихрома, имеющего желтую окраску, но не флюоресцирующего.

В щелочной среде при облучении раствора рибофлавина образуются в основном люмифлавин и *D*-эритроза (частично образуется и люмихром):



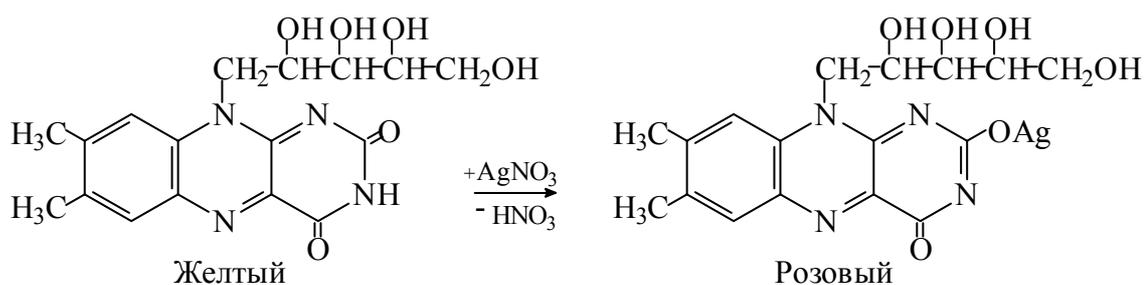
Люмифлавин в растворах имеет окраску и флюоресценцию, аналогичные рибофлавиону, но отличается от него тем, что растворяется в хлороформе, а рибофлавин нет.

Зависимость флюоресценции рибофлавина от pH раствора, а также изменение её с течением времени вследствие происходящих фотохимических реакций накладывают определенные ограничения на условия количественного флюоресцентного анализа (максимум флюоресценции  $F = 525-530$  нм, максимальная интенсивность при pH 3,5-7,5).

Более воспроизводимые результаты дает спектрофотометрический метод количественного анализа препаратов рибофлавина, основанный на измерении оптической плотности растворов рибофлавина в присутствии ацетатного буфера при длине волны 267 нм.

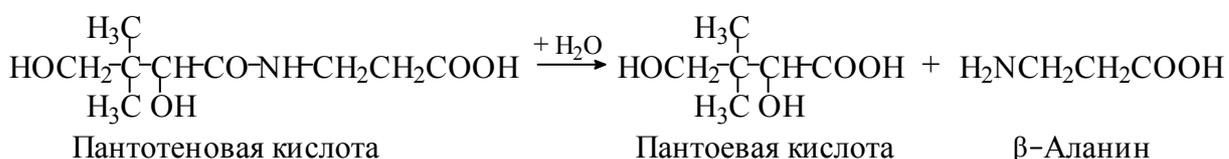
Рибофлавин проявляет очень слабые кислые свойства (см. табл. 1.5,  $pK_a$  9,69), но образует устойчивые окрашенные соли с ионами тяжелых металлов. При добавлении к водному раствору рибофлавина раствора нитрата серебра или ацетата ртути возникает розовое или оранжевое окрашивание соответственно.

Реакции с солями серебра или ртути используются для качественного и количественного фотоэлектроколориметрического анализа рибофлавина:

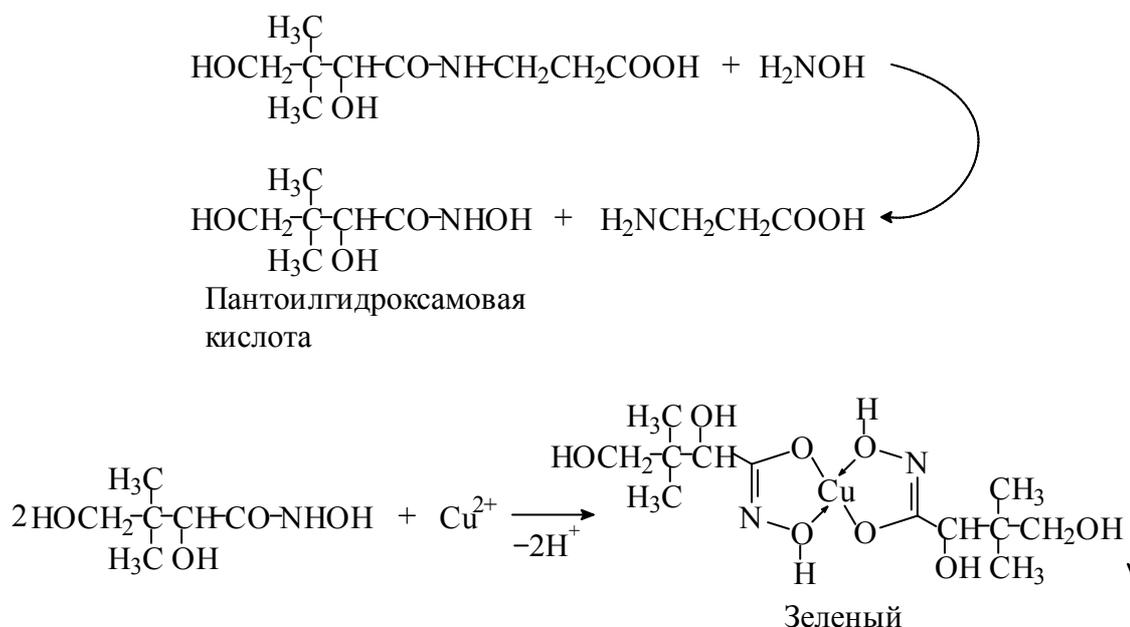


### 1.1.5.3. Витамины группы B<sub>3</sub>

Пантотеновая кислота представляет собой амид пантоевой кислоты и β-аланина. Она подвергается кислотному и щелочному гидролизу, при этом образуются β-аланин и пантоевая кислота:



Наличие амидной связи в пантотеновой кислоте можно обнаружить по реакции образования соответствующего гидроксамата железа или меди. При действии на пантотеновую кислоту гидроксилamina образуется пантоилгидроксамовая кислота, которая с солями меди образует зеленый осадок соответствующего гидроксамата меди, а с солями железа (III) – красное окрашивание соответствующего гидроксамата железа:

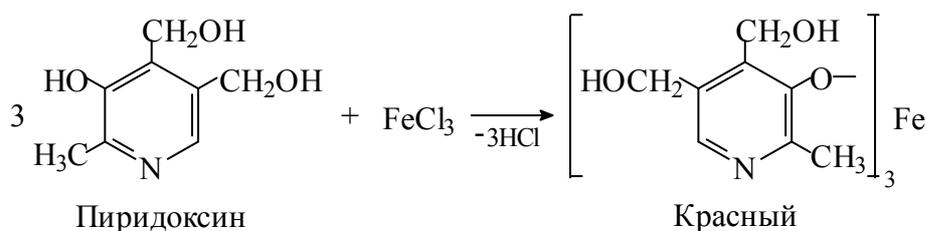


Пантотеновая кислота образует окрашенное в зелено-желтый цвет соединение при взаимодействии с 2,7-дигидрокси-нафталином в присутствии концентрированной серной кислоты. Эта реакция используется для количественного спектрофотометрического определения пантотеновой кислоты ( $\lambda_{\text{max}} = 464 \text{ нм}$ ).

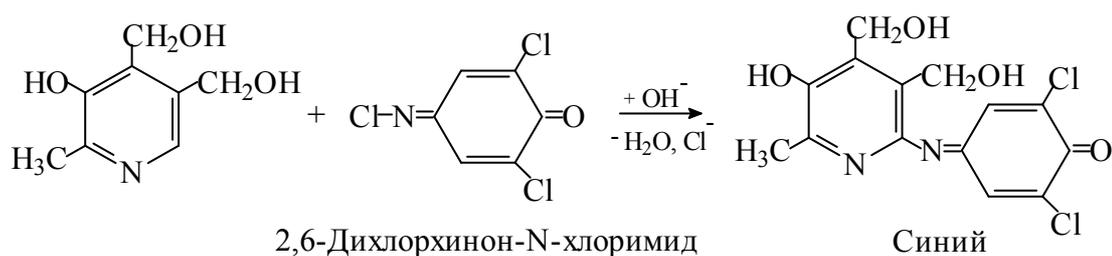
Витамин В<sub>3</sub> выпускается в виде кальциевой соли – кальция пантотената, идентификация которого кроме описанных выше способов включает в себя также открытие иона кальция.

#### 1.1.5.4. Витамины группы В<sub>6</sub>

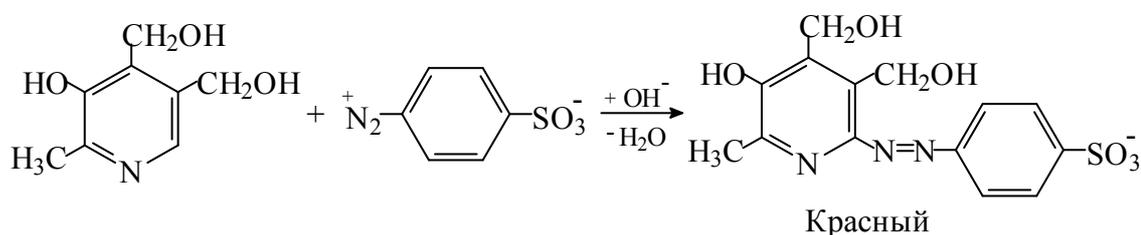
Все представители группы витаминов В<sub>6</sub> проявляют свойства, характерные для фенолов, в частности они дают общую реакцию подлинности на фенолы с хлорным железом, легко вступают в реакции электрофильного замещения по свободному *para*-положению к фенольному гидроксилу. На примере пиридоксина приведем ряд реакций использующихся для идентификации и количественного анализа витамина В<sub>6</sub>:



При взаимодействии пиридоксина с 2,6-дихлорхинон-N-хлоримидом в щелочной среде образуется окрашенный в синий цвет индофенольный краситель, растворимый в бутиловом спирте:



Также легко пиридоксин вступает в реакцию азосочетания с солями диазония с образованием окрашенных в красный цвет азокрасителей:

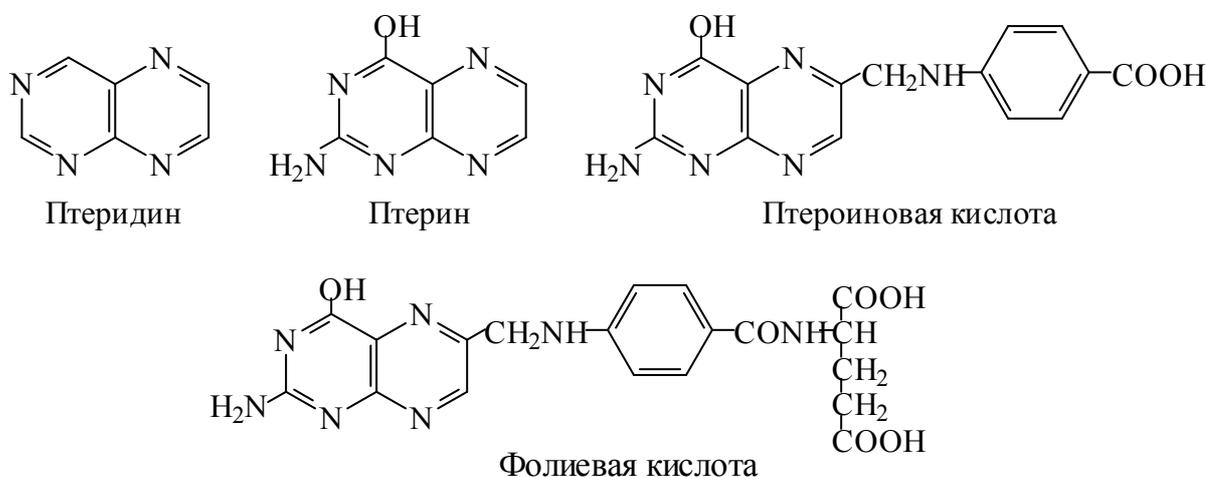


Реакция образования азокрасителя при взаимодействии с солью диазония, полученной из сульфаниловой кислоты, применяется также для количественного фотоэлектроколориметрического анализа витаминов группы В<sub>6</sub>.

#### 1.1.5.5. Витамины группы В<sub>с</sub>

Строение основного представителя этой группы витаминов – фолиевой кислоты (В<sub>с</sub>) – было установлено в 1946 г. Фолиевая кислота является производным гетероцикла птеридина. Производное птеридина – 2-амино-4-гидроксиптеридин (птерин) – является составной частью молекулы фолиевой кислоты, поэтому эту группу витаминов называют *птериновой*.

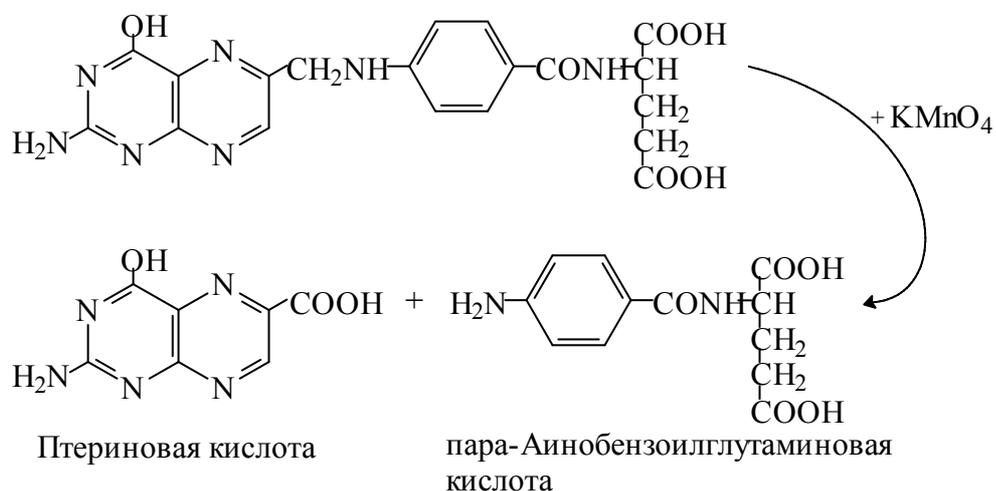
Другие представители группы птериновых витаминов отличаются от фолиевой кислоты наличием нескольких остатков глютаминовой кислоты, связанных друг с другом пептидными связями (2-7 остатков):



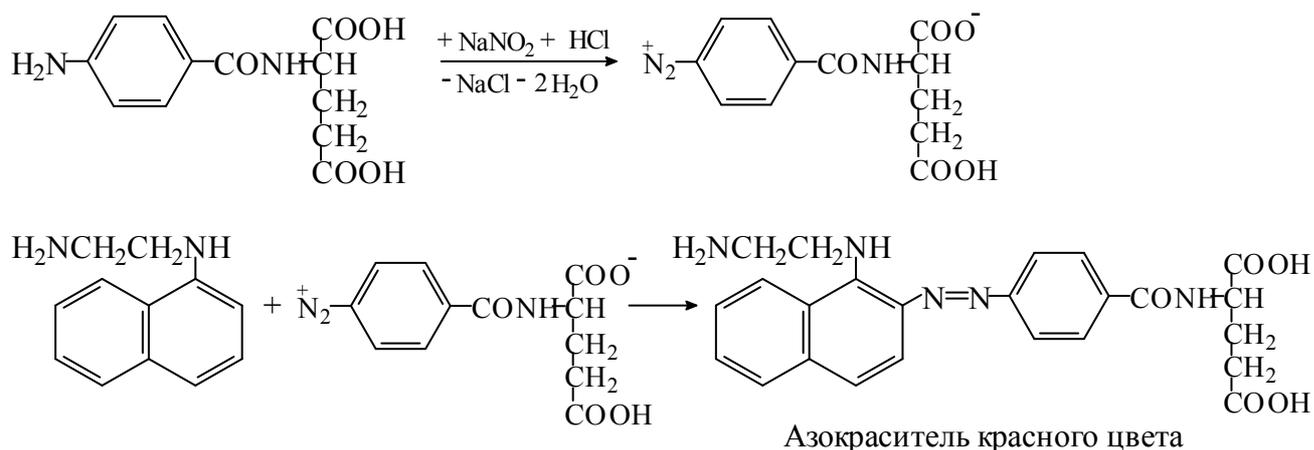
Фолиевая кислота проявляет амфотерные свойства: она хотя и трудно, но растворима в разведенных минеральных кислотах (лучше при нагревании) и легко растворима в водных растворах щелочей.

Специфической реакцией фолиевой кислоты, лежащей в основе ее качественного и количественного анализа, является ее окисление перманганатом калия в нейтральной или слабощелочной среде. При этом образуются птериновая и *пара*-аминобензоилглутаминовая кислоты. Избыток перманганата калия удаляют перекисью водорода и реакционную смесь фильтруют от диоксида марганца. Фильтрат содержит птериновую кислоту, которая имеет голубую флюоресценцию в ультрафиолетовом свете.

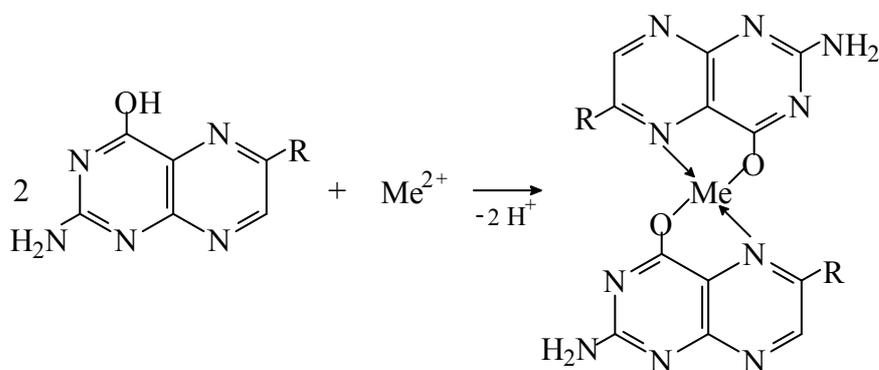
Эта реакция используется для идентификации фолиевой кислоты и для её количественного флюоресцентного анализа:



Для количественного анализа фолиевой кислоты в лекарственных формах применяется также фотоэлектроколориметрический метод анализа, основанный на образовании азокрасителя из образующейся при окислении перманганатом калия пара-аминобензоилглутаминовой кислоты, которую диазотируют и азосочетают образовавшуюся соль диазония с N-(1-нафтил)этилендиамином:



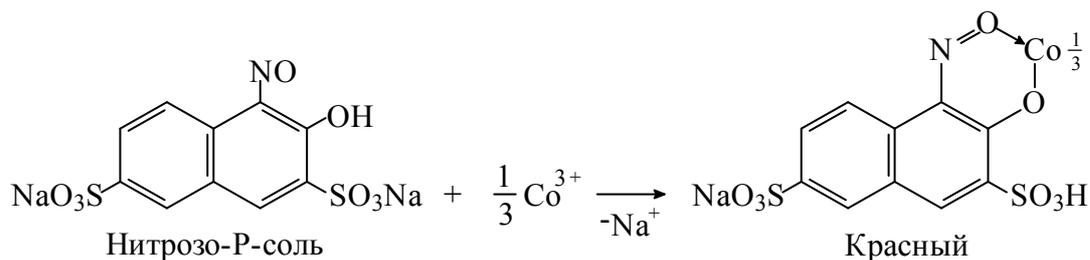
Птерин и его производные, в том числе и фолиевая кислота, образует нерастворимые в воде окрашенные комплексные соединения с ионами двухвалентных тяжелых металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и т.д.):



#### 1.1.5.6. Витамины группы $B_{12}$

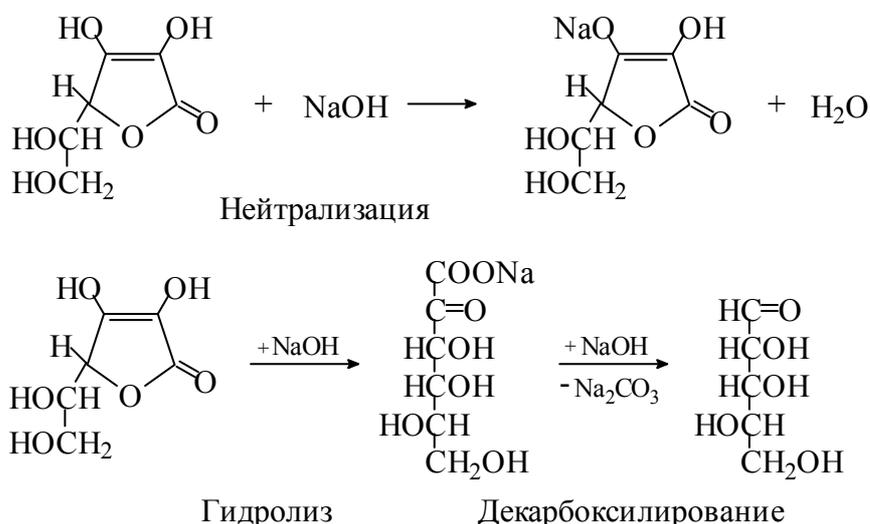
Идентификацию и количественное определение цианкобаламина осуществляют методом УФ-спектрофотометрии. Идентификацию осуществляют по положению полос в УФ-спектре, который должен иметь максимумы поглощения при  $278 \pm 1$  нм,  $361 \pm 1$  нм и  $548 \pm 2$  нм. Количественное определение проводят, измеряя оптическую плотность раствора при 361 нм.

Входящий в состав цианокобаламина кобальт открывают после минерализации препарата реакцией с нитрозо-Р-солью:

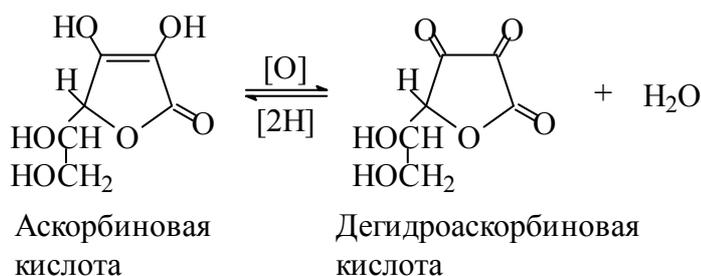


### 1.1.5.7. Витамин С

Как видно из табл. 1.5, витамин С – аскорбиновая кислота ( $pK_a$  4,04) – является более сильной кислотой, чем уксусная кислота ( $pK_a$  4,75). Хотя аскорбиновая кислота является достаточно сильной одноосновной кислотой, количественно определять ее методом нейтрализации нецелесообразно. Это обусловлено тем, что наряду с реакцией нейтрализации в некоторой степени в ходе титрования идет гидролиз лактонного кольца с образованием натриевой соли  $\alpha$ -кето-Л-гулоновой кислоты, которая далее легко декарбоксилируется, что приводит к завышенным результатам анализа:



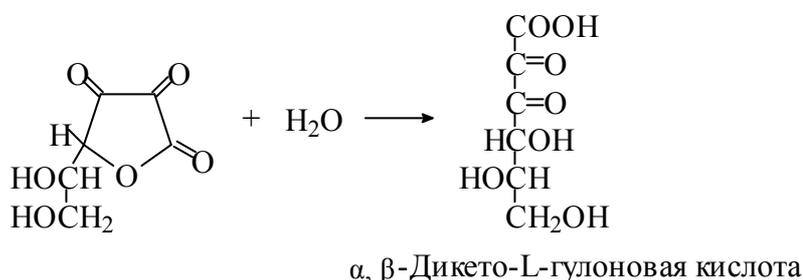
Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем. Она окисляется ионами серебра и меди, йодом, красной кровяной солью, нитратами, кислородом и др. При окислении аскорбиновой кислоты образуется дегидроаскорбиновая кислота:



Окисление аскорбиновой кислоты кислородом легко происходит в нейтральной и щелочной среде, оно катализируется ионами тяжелых металлов (меди, железа, серебра). Глюкоза, глутаминовая кислота, флавоноиды, креатинин, стабилизируют аскорбиновую кислоту в растворах.

В организме дегидроаскорбиновая кислота вновь восстанавливается НАДН до аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты являются коферментами ферментов оксидоредуктаз.

Дегидроаскорбиновая кислота еще легче, чем аскорбиновая кислота, подвергается гидролизу с образованием  $\alpha,\beta$ -дикето-L-гулоновой кислоты:

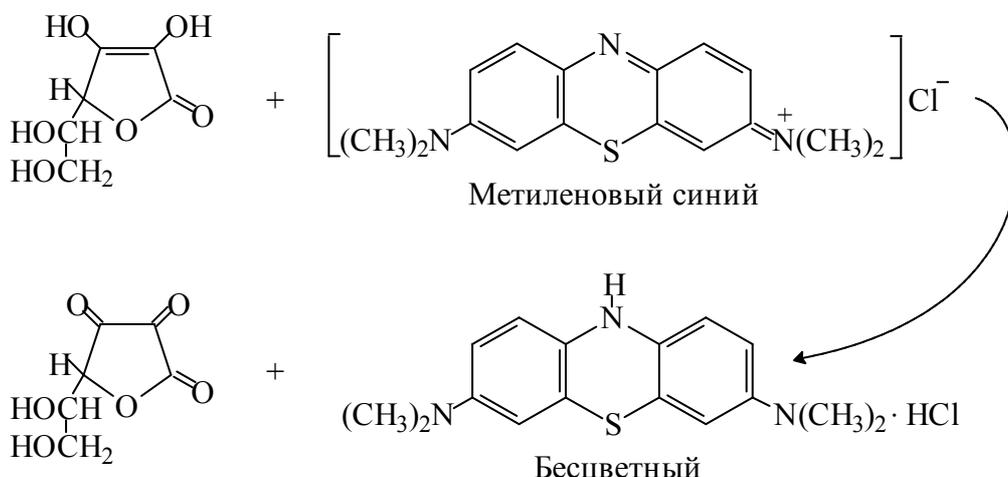


$\alpha$ -Кето- и  $\alpha,\beta$ -дикето-L-гулоновые кислоты не обладают витаминной активностью. Гидролиз лактонного кольца аскорбиновой кислоты и её окисление являются причинами резкого снижения содержания аскорбиновой кислоты при кулинарной обработке продуктов.

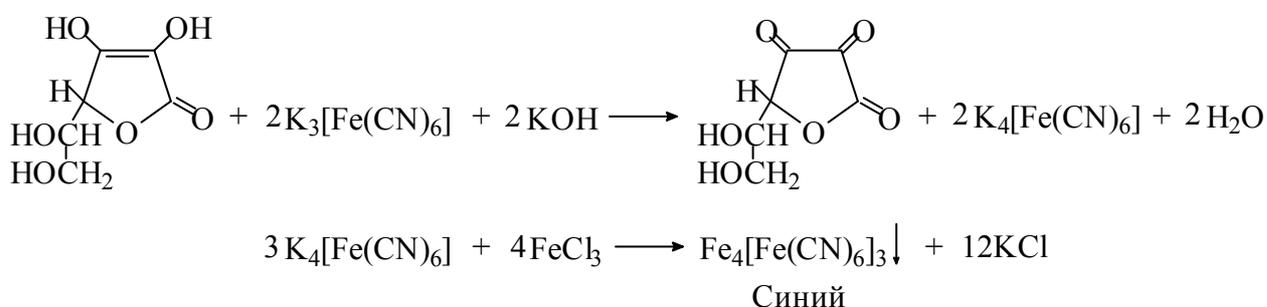
В кислой среде аскорбиновая кислота более устойчива к окислению и гидролизу, чем в щелочной.

Для идентификации аскорбиновой кислоты используются реакции с красителями – метиленовым синим и 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Реакция аскорбиновой кислоты с метиленовым синим весьма специфична и используется для открытия её в растительных и животных продуктах.

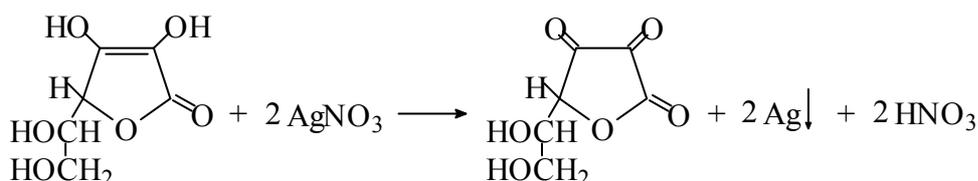
Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом применяется главным образом для количественного определения аскорбиновой кислоты в овощах, фруктах, ягодах и других растительных продуктах:



Для идентификации аскорбиновой кислоты применяют и красную кровяную соль, которая в щелочной среде восстанавливается аскорбиновой кислотой до желтой кровяной соли. После подкисления реакционной смеси и добавления раствора хлорида железа (III) образуется синий осадок берлинской лазури:

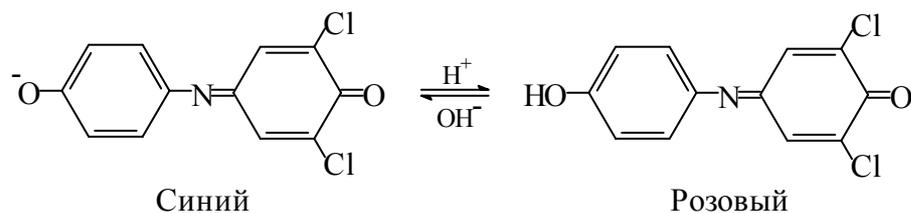


Аскорбиновая кислота восстанавливает даже такие слабые окислители, как йод, соли ртути и серебра:

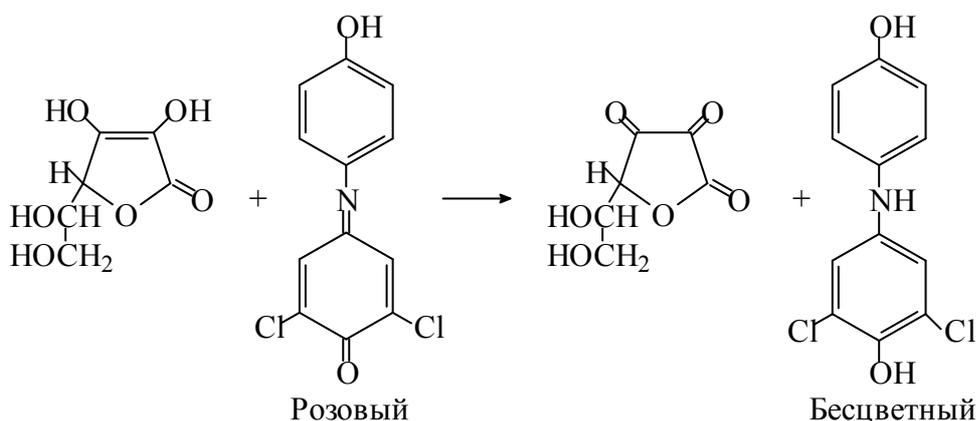


Титрование аскорбиновой кислоты 6-дихлорфенолиндофенолом (метод Тильманса) осуществляют в кислой среде, в которой 2,6-

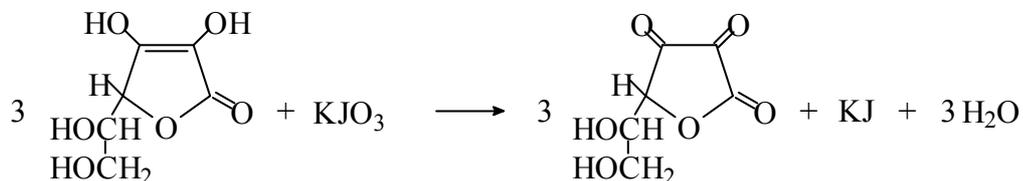
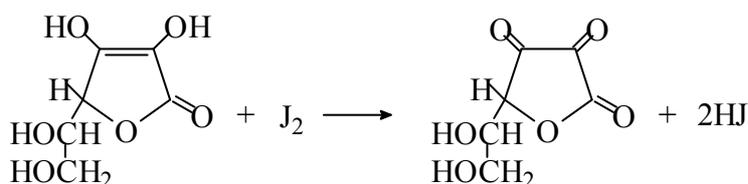
дихлорфенолиндофенол имеет розовую окраску, а в щелочной среде – синюю:



Титрование неокрашенных кислых растворов аскорбиновой кислоты проводят раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, окрашенным в синий цвет, до появления розовой окраски реакционной смеси. Этот метод является безиндикаторным. Поскольку продукт восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола – 4-гидроксифенил-4-гидрокси-3,5-дихлорфениламин бесцветен, то появление в точке эквивалентности избытка титранта вызывает розовое окрашивание. При определении аскорбиновой кислоты в окрашенных смесях (ягоды, окрашенные овощи) к анализируемой смеси добавляют хлороформ и титруют раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски хлороформного слоя:



Для количественного анализа лекарственных средств – растворов, порошков, таблеток, субстанций аскорбиновой кислоты – применяются йодометрический и йодатометрический методы анализа, в основе которых лежат приведенные ниже реакции:



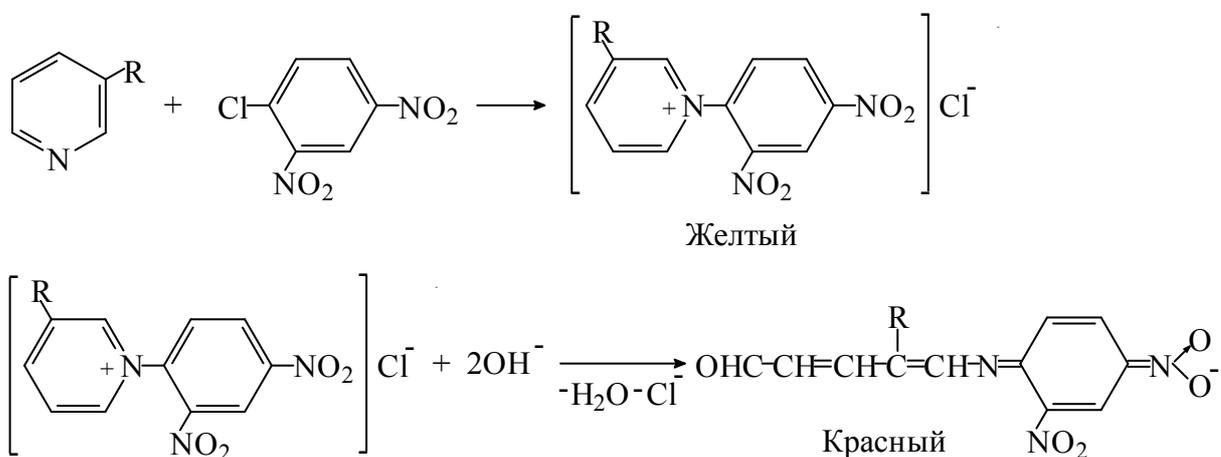
Во всех методах количественного анализа, основанных на окислении аскорбиновой кислоты, молярная масса эквивалента аскорбиновой кислоты равна половине её молекулярной массы ( $\Xi = M/2$ ).

#### 1.1.5.8. Витамины группы PP

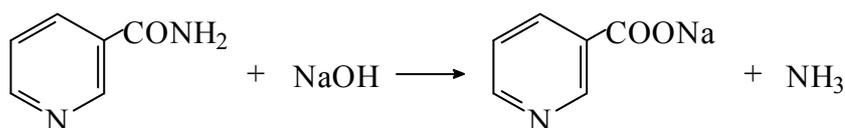
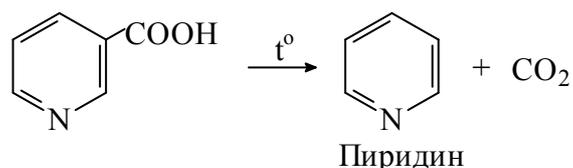
Никотиновая кислота была получена еще в 1867 г., но её витаминное действие было установлено лишь в 1937 г. В качестве витаминного препарата применяется и амид никотиновой кислоты.

Общей цветной реакцией на производные пиридина, и в том числе на никотиновую кислоту и ее амид, является реакция образования производных глутаконового альдегида (полиметиновых красителей). При кипячении производного пиридина с 2,4-динитрохлорбензолом в спирте образуется соответствующий N-(2,4-динитрофенилпиридиний хлорид желтого цвета.

При действии щелочи происходит гидролиз N-(2,4-динитрофенилпиридиний хлорида с раскрытием пиридинового кольца и образованием *аци*-нитросоли красного цвета:

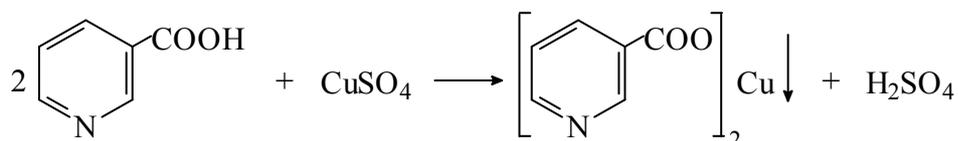


Никотиновая кислота и её амид при нагревании с карбонатом натрия образуют пиридин, обладающий характерным неприятным запахом, что используется для идентификации витамина РР. Отличить никотиновую кислоту от её амида можно с помощью реакции гидролиза никотинамида 0,1М раствором гидроксида натрия. При этом в случае никотинамида ощущается запах аммиака, а в опыте с никотиновой кислотой запах отсутствует:

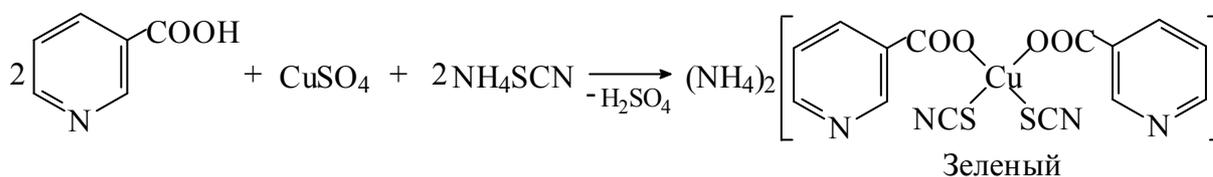


Никотиновая кислота проявляет выраженные и кислые, и основные свойства; амид никотиновой кислоты обладает лишь основными свойствами. Эти различия в свойствах также используются для отличия одного препарата от другого.

Никотиновая кислота образует малорастворимые соли с ионами тяжелых металлов. Например, при реакции с сульфатом меди образуется осадок синего цвета:

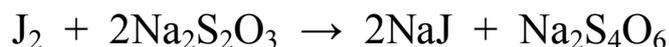


В присутствии роданид-ионов образуется комплексная соль зеленого цвета:



Никотинамид синего осадка с сульфатом меди не дает.

Реакция никотиновой кислоты с сульфатом меди используется и для количественного йодометрического анализа растворов никотиновой кислоты. После осаждения никотината меди избыток сульфата меди определяют йодометрически:

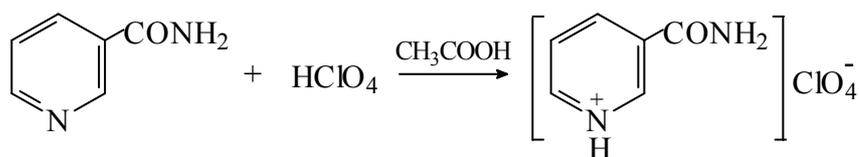


Молярная масса эквивалента никотиновой кислоты в этом методе равна двум молекулярным массам никотиновой кислоты ( $\Theta = 2M$ ).

Никотиновую кислоту можно количественно определять алкалиметрическим методом (титрованием 0,1М раствором едкого натра в спиртовой среде).

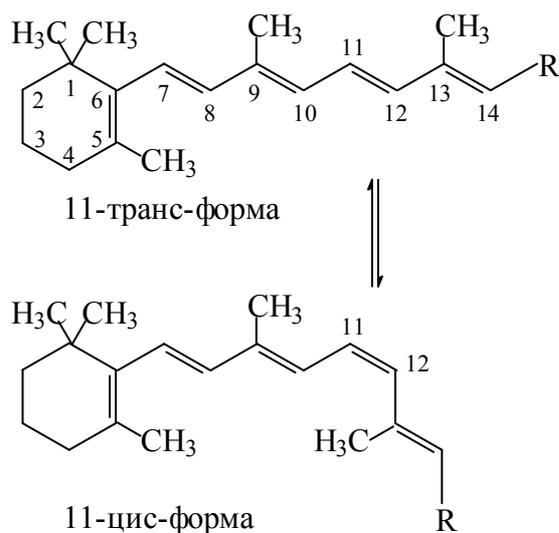
Молярная масса эквивалента никотиновой кислоты в методе нейтрализации равна молекулярной массе никотиновой кислоты ( $\Theta = M$ ).

Никотинамид количественно определяют методом неводного титрования 0,1М раствором хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте ( $\Theta = M$ ):



#### 1.1.5.9. Витамины группы А

Витамины группы А легко окисляются кислородом воздуха с потерей витаминной активности. Все они легко изомеризуются по связям 11.



Однако в организме в молекулах ретинола ( $R = \text{CH}_2\text{OH}$ ) и ретиноевой кислоты ( $R = \text{COOH}$ ) все двойные связи имеют *транс*-конфигурацию. Наиболее легко изомеризуется ретиналь по связи 11. В связи с этим в организме он находится как в *транс*-форме (кровенос), так и в *11-цис*-форме (сетчатка глаза).

Для идентификации витамина А используется его реакция с хлоридом сурьмы, при которой образуется комплексное соединение с участием сопряженной системы двойных связей и появляется синее окрашивание (галохромная реакция).

Галохромная реакция возникает при действии на сопряженные системы связей не только кислот Льюиса, но и концентрированной серной кислоты. Вода мешает галохромной реакции.

Наличие специфической системы сопряженных двойных связей позволяет надежно идентифицировать витамин А методом УФ-спектроскопии. Спектрофотометрический метод применяется и для количественного анализа витамина А как в субстанции, так и в лекарственных формах и пищевых продуктах.

#### *1.1.5.10. Витамины группы D*

Эргокальциферол ( $D_2$ ) и холекальциферол ( $D_3$ ) так же, как и витамин А, дают окрашивание с хлоридом сурьмы. Поскольку сопряженная система двойных связей кальциферолов короче, чем у витамина А, окрашивание развивается не синее, как у витамина А, а оранжево-розовое. Кальциферолы в связи с наличием в их молекулах двойных связей легко реагируют с бромом, кислородом воздуха и другими окислителями.

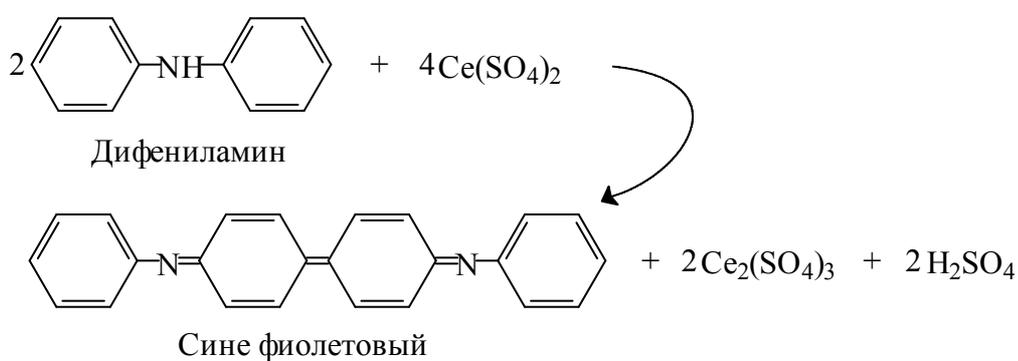
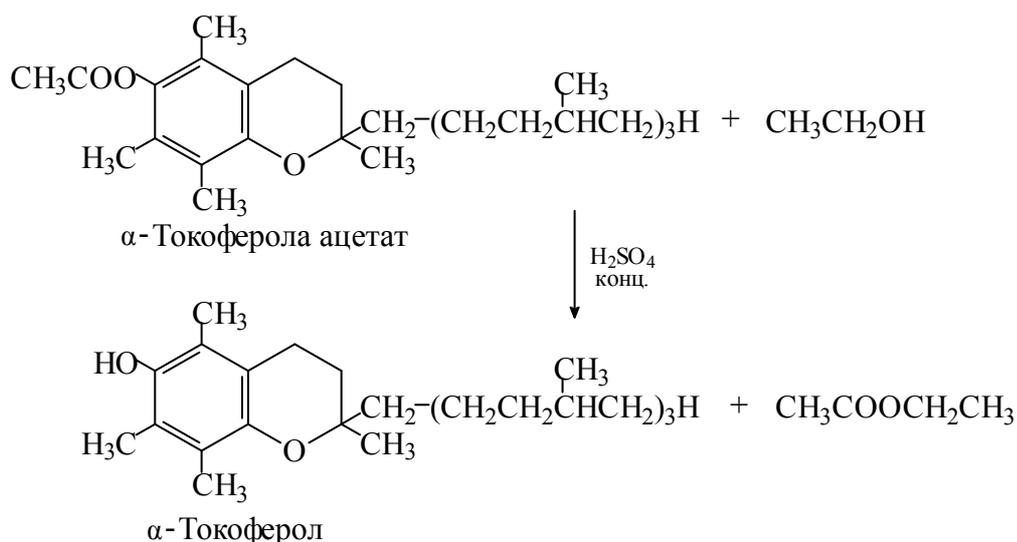
Для идентификации и количественного определения витамина D используется его реакция с хлоридом сурьмы. Количественное определение витамина D в лекарственных препаратах и пищевых продуктах включает в себя следующие операции: 1) щелочной гидролиз продукта; 2) экстракция неомыляемой части эфиром и его последующее удаление; 3) растворение остатка в хлороформе и обработка раствора хлороформным раствором хлорида сурьмы; 4) измерение оптической плотности полученного раствора при длине волны 500 нм.

#### *1.1.5.11. Витамины группы E*

Из всех семи известных природных токоферолов фармацевтической промышленностью выпускается в качестве лекарственного средства  $\alpha$ -токоферола ацетат. В форме ацетата препарат более устойчив к действию окислителей, чем сам  $\alpha$ -токоферол.

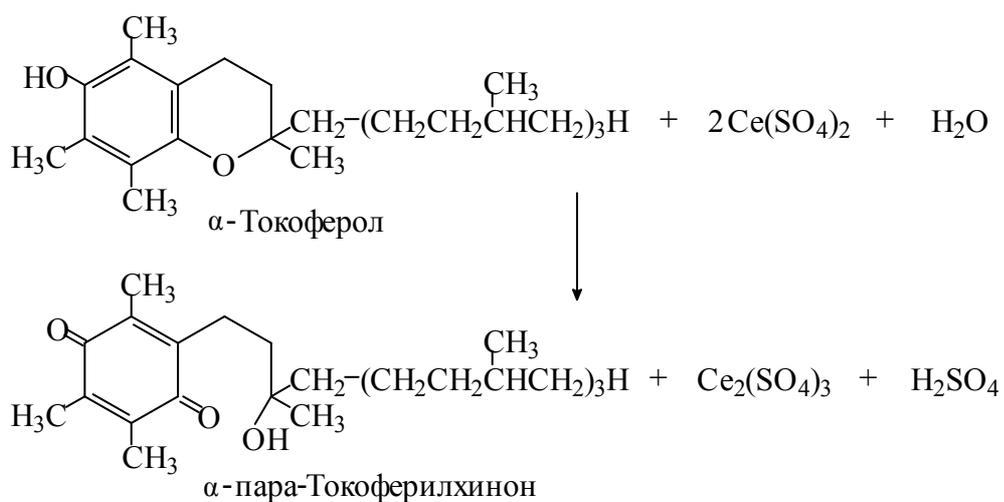
При анализе  $\alpha$ -токоферола ацетата, устойчивого к действию окислителей, его предварительно превращают в  $\alpha$ -токоферол. Обычный кислый или щелочной гидролиз в водной среде мало приемлем для этого препарата, поскольку он практически нерастворим в воде и





В точке эквивалентности дифениламин окисляется сульфатом церия с образованием продукта окисления сине-фиолетового цвета.

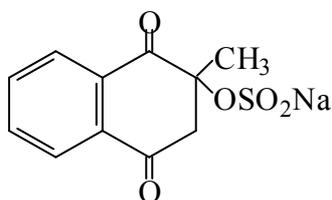
Сульфат церия (IV) окисляет  $\alpha$ -токоферол до  $\alpha$ -пара-токоферилхинона:



Как видно из уравнения реакции, молярная масса эквивалента  $\alpha$ -токоферола ацетата в цериметрическом методе равна  $\mathcal{E} = M/2$ .

### 1.1.5.12. Витамины группы К

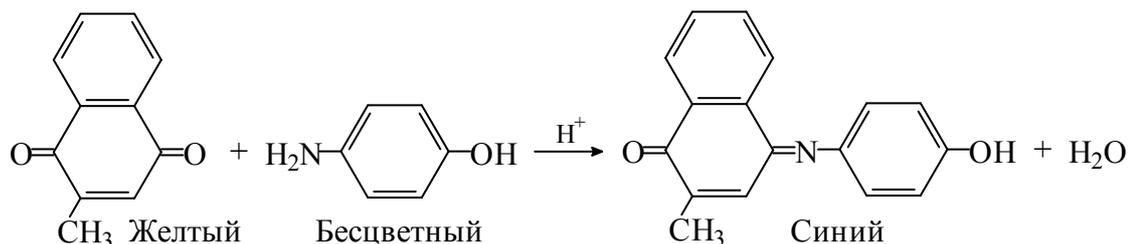
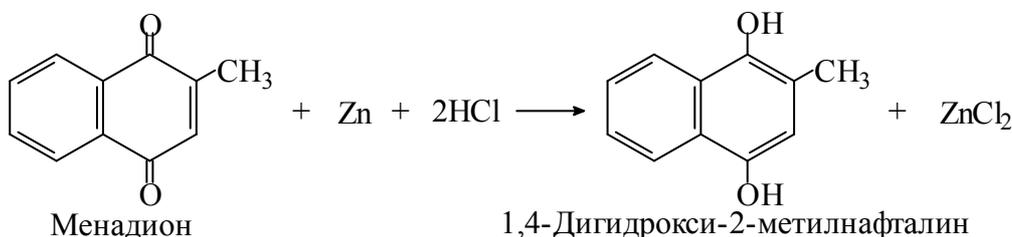
В качестве лекарственных препаратов этой группы выпускаются природные витамины К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub> под названием фитоменадион, синтетический витамин К<sub>3</sub> – менадион (см. табл.1.1) и его водорастворимая форма – викасол.



Викасол

Идентификация витаминов К<sub>1</sub>, К<sub>2</sub> и К<sub>3</sub> основана на реакции их восстановления, например, цинком в кислой среде. При этом характерная для этих витаминов желтая окраска исчезает вследствие образования бесцветного 1,4-дигидрокси-2-метилнафталина из менадиона или его 3-замещенных из витаминов К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub>:

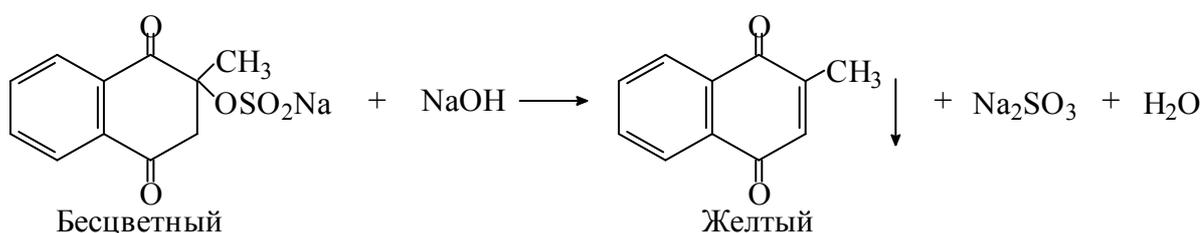
для этих витаминов желтая окраска исчезает вследствие образования бесцветного 1,4-дигидрокси-2-метилнафталина из менадиона или его 3-замещенных из витаминов К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub>:



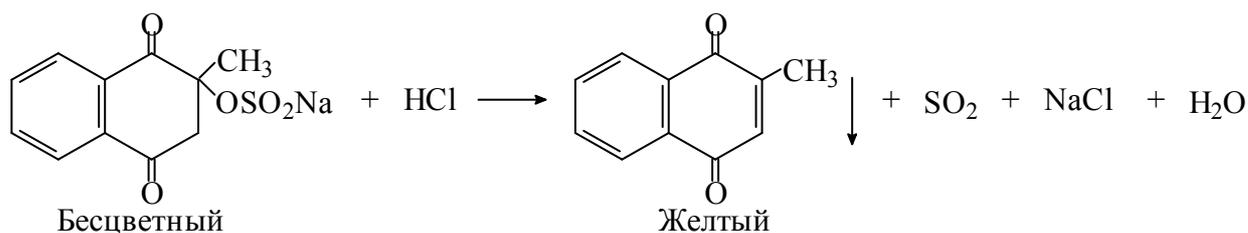
Эти соединения легко конденсируются с ароматическими аминами в кислой среде с образованием более глубоко окрашенных соединений. Например, при взаимодействии менадиона с *para*-аминофенолом в кислой среде появляется синее окрашивание, характерное для индофенолов.

Для идентификации викасола используются реакции его разложения при действии кислот и щелочей.

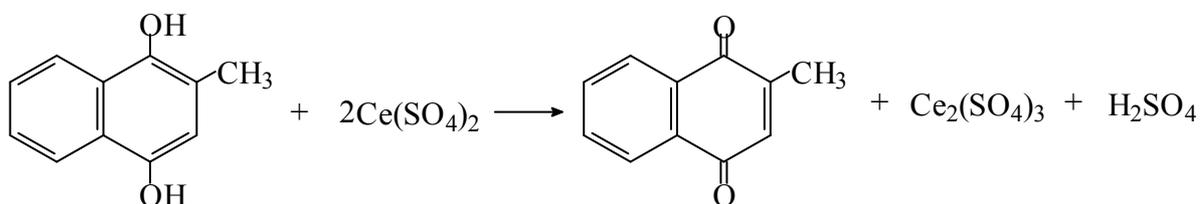
При действии на водный раствор викасола раствора щелочи выпадает желтый осадок менадиона:



При действии кислоты на раствор викасола также выпадает желтый осадок менадиона и ощущается запах сернистого газа:



Количественный анализ витаминов  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  и викасола осуществляется цериметрическим методом. Метод основан на предварительном восстановлении этих витаминов цинковой пылью в смеси хлористоводородной и ледяной уксусной кислот и окислении продуктов восстановления сульфатом церия (IV):



Как видно из уравнений реакций, лежащих в основе метода, молярные массы эквивалентов витаминов  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  и викасола в цериметрическом методе равны половине молекулярных масс соответствующих витаминов ( $\Theta = M/2$ ).

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ, ЗАДАЧИ И УПРАЖНЕНИЯ

1. Кто ввел термин витамин?
2. Чем понятие «витамин» отличается от понятия «кофермент»?
3. Есть ли среди витаминов оптически деятельные вещества? Назовите их.
4. Аскорбиновая кислота имеет 4 стереоизомера. Все ли из них обладают витаминной активностью?
5. Кем и каким образом установлено строение витамина  $B_{12}$ ?
6. Есть ли среди витаминов окрашенные соединения? Если есть, то какие?
7. Образуются ли витамины в организме человека? Если да, то какие и каким путем?
8. Какие заболевания возникают у человека при дефиците витаминов А,  $B_1$ , С, D?
9. Есть ли среди витаминов токсичные соединения?
10. С какой целью добавляют аскорбиновую кислоту в мясной фарш при изготовлении копченых колбас?
11. Какой витамин сильно стимулирует развитие дрожжей?

12. Какие витамины не растворяются в воде?
13. Чем понятие «кофермент» отличается от понятия «кофактор»?
14. Чем отличается строение кофермента ТГФ от строения фолиевой кислоты?
15. Известно, что употребление в пищу большого количества сырых яиц приводит к дефициту витамина Н. Чем это обусловлено?
16. Какие витамины не выполняют коферментную функцию? В чем заключается биологическое действие этих витаминов?
17. Какие коферменты принимают участие в пируватдегидрогеназной реакции и какие витамины необходимы для их образования?
18. Чем обусловлено применение пивных дрожжей в медицинской практике?
19. Каковы механизмы антиоксидантного действия витаминов С и Е?
20. Известно, что реакцию азосочетания ароматических аминов с солями диазония проводят обычно в слабокислой среде. Объясните, почему реакцию тиамин с солями диазония проводят не в кислой среде, как обычно, а в щелочной.
21. Каким превращениям подвергается рибофлавин в водных растворах под действием света?
22. Реагирует ли рибофлавин с солями тяжелых металлов?
23. В молекуле пиридоксина имеется фенольный гидроксил, вследствие чего он дает ряд характерных для фенолов реакций. Опишите, что будет наблюдаться при действии на пиридоксин азотной кислоты и последующей обработке щелочью. Ответ подтвердите уравнениями реакций.
24. Фолиевая кислота практически нерастворима в воде, но растворяется в растворах кислот и щелочей. Чем объясняются эти свойства?
25. Какие химические свойства аскорбиновой кислоты обуславливают существенное снижение её содержания в пищевых продуктах при их кулинарной обработке?
26. Аскорбиновая кислота имеет кислый вкус, а фолиевая кислота безвкусна. Объясните это различие.
27. Почему применяемые для анализа лекарственных форм аскорбиновой кислоты методы йодо- и йодатометрии нельзя использовать для анализа биологических объектов?
28. Каким образом с помощью лишь одного реактива – гидроксида натрия – отличить никотиновую кислоту от никотинамида? Ответ подтвердите уравнениями реакций.
29. Витамин А и витамин D реагируют с хлоридом сурьмы с образованием комплексных соединений одного типа, но окраска этих комплексов разная. Объясните это явление.
30.  $\alpha$ -Токоферол содержит в своей структуре фенольный гидроксил, так же, как и  $\beta$ -токоферол. Однако  $\alpha$ -токоферол не дает характерных для фенолов реакций, таких, как нитрование, азосочетание с солями диазония и т.д., в то время как  $\beta$ -токоферол дает. Объясните эти свойства. Ответ подтвердите уравнениями химических реакций.
31.  $\alpha$ -Токоферол окисляется сульфатом церия. Окисляется ли сульфатом церия лекарственный препарат токоферола ацетат?

32. Какие природные витамины устойчивы при кулинарной обработке пищевых продуктов? Ответ обоснуйте.
33. Чистый препарат викасол представляет собой порошок белого цвета, однако при хранении на воздухе он желтеет. Объясните происходящие изменения.
34. Объясните, почему аскорбиновую кислоту нецелесообразно определять методом нейтрализации.
35. Какова основность аскорбиновой кислоты? Напишите уравнение реакции аскорбиновой кислоты с гидроксидом натрия.
36. Почему сладкий болгарский перец, содержащий больше, чем другие фрукты и овощи, аскорбиновой кислоты, не имеет выраженного кислого вкуса?
37. Каким образом определяют содержание аскорбиновой кислоты в окрашенных растительных продуктах?
38. Как химическими методами отличить ретинола ацетат от ретиноевой кислоты?
39. Что понимается под термином «витаминоподобные» вещества? Какие витаминоподобные вещества известны?
40. Что понимается под термином «антивитамин»? Приведите примеры веществ, обладающих антивитаминным действием, и объясните его механизм.
41. Предложите химические методы, позволяющие отличить рибофлавин от фолиевой кислоты (оба витамина желтого цвета).
42. Предложите методы определения витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> в пищевых продуктах и лекарственном сырье.
43. Если к водно-щелочному раствору витамина В<sub>6</sub> добавить раствор соли диазония, полученный из сульфаниловой кислоты, то появляется красное окрашивание. Объясните наблюдаемое явление. Ответ подтвердите уравнением реакции.
44. Перечислите окрашенные витамины и укажите их цвет.
45. Как с помощью лишь серной кислоты отличить биотин от липоевой кислоты?
46. Предложите химическую реакцию, позволяющую отличить липоевую кислоту от липоамида.
47. Предложите химический метод, позволяющий отличить витамин В<sub>1</sub> от кофермента тиаминпирофосфата (ТПФ).
48. Предложите химический метод, позволяющий отличить тиаминпирофосфат от пиридоксальфосфата.
49. Объясните, каким образом витамин С предупреждает развитие цинги. Ответ подтвердите уравнениями ферментативных реакций.
50. При нагревании витамина U с концентрированным раствором едкого натра и последующем подкислении раствора хлористоводородной кислотой ощущается запах сероводорода. Объясните наблюдаемое явление. Ответ подтвердите уравнениями реакций.
51. Предложите химический метод, позволяющий отличить витамин U от метионина.
52. Предложите химические методы открытия железа в геме.

## 2. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

### 2.1. АНАЛИЗ ВИТАМИНОВ

#### 2.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В<sub>1</sub>

##### **Опыт 1.** Тиохромная реакция на тиамин

*Анализ субстанций.* 0,01 г препарата витамина В<sub>1</sub> (тиамин хлорид, тиамин бромид, фосфотиамин, кокарбоксилаза) растворяют в 5 мл воды, добавляют 1 мл 5%-ного раствора феррицианида калия (красная кровяная соль), 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, 5 мл бутилового или изоамилового спирта, хорошо встряхивают и дают отстояться. В верхнем спиртовом слое возникает наблюдаемая в ультрафиолетовом свете синяя флюоресценция, исчезающая при подкислении и вновь возникающая при подщелачивании раствора.

*Анализ таблеток, драже, поливитаминных препаратов.* Навеску растертого препарата, содержащую около 0,01 г витамина В<sub>1</sub>, встряхивают с 10 мл воды в течение 1 мин и фильтруют. 5 мл фильтрата обрабатывают, как указано выше.

*Открытие тиамина в дрожжах.* 10 г сухих дрожжей тщательно растирают в ступке, добавляя постепенно 10 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Суспензию центрифугируют, надосадочный раствор обрабатывают, как указано выше.

##### **Опыт 2.** Реакция тиамина с diazoreактивом

5-10 мг субстанции витамина В<sub>1</sub> растворяют в 1 мл воды, добавляют 1 мл раствора diazoreактива и 2 мл 5%-ного раствора карбоната натрия. Появляется желтое окрашивание, переходящее через 1-2 мин в красное.

*Приготовление раствора diazoreактива.* В мерную колбу емкостью 100 мл помещают 0,90 г сульфаниловой кислоты, 9 мл концентрированной соляной кислоты, 60-70 мл воды, перемешивают и доводят водой до метки. 5 мл приготовленного раствора помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, поставленную на лед, прибавляют 2,5 мл 10%-ного раствора нитрита натрия и смесь оставляют на льду

в течение 5 мин. Затем прибавляют ещё 10 мл 10%-ного раствора нитрита натрия, перемешивают, выдерживают на льду 5 мин и доводят водой до метки. Хранят в холодильнике. Реактив годен в день приготовления.

### **Опыт 3. Количественное определение тиамин хлорида в таблетках флюориметрическим методом**

Точную навеску порошка растертых таблеток, содержащую около 0,01 г тиамин хлорида, помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляют 70-80 мл воды и перемешивают при нагревании на теплой водяной бане в течение 1 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят водой до метки и фильтруют.

1 мл фильтрата помещают в мерную колбу ёмкостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. В четыре делительных воронки с притертыми пробками помещают: в 1-ю и 2-ю – по 1 мл приготовленного испытуемого раствора, в 3-ю и 4-ю – по 1 мл стандартного раствора тиамин хлорида. В 1-ю и 3-ю делительные воронки соответственно с испытуемым и стандартным растворами добавляют по 3 мл окислительной смеси, а в оставшиеся две делительные воронки (2-ю и 4-ю) – 3 мл 15%-ного раствора гидроксида натрия и встряхивают. К содержимому всех воронок приливают пипеткой точно по 10 мл бутилового (изобутилового или изоамилового) спирта, встряхивают в течение 2 мин и оставляют для разделения слоёв. Водные слои отделяют, а к спиртовым экстрактам добавляют по 5-7 г безводного сульфата натрия, оставляют на 5 мин и через верх воронки растворы сливают в кюветы флюориметра.

Измеряют флюоресценцию стандартного раствора и контрольной пробы к нему (растворы из делительных воронок 3-й и 4-й соответственно), затем флюоресценцию испытуемого раствора и контрольной пробы к нему (растворы из делительных воронок 1-й и 2-й соответственно).

Содержание тиамин хлорида в одной таблетке в граммах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \cdot P_{\text{ср}}}{(A_3 - A_4) \cdot m \cdot 100}$$

где:

- $A_1$  – показание флюориметра для испытуемого раствора;
- $A_2$  – показание флюориметра для контрольной пробы к испытуемому раствору;
- $A_3$  – показание флюориметра для стандартного раствора;
- $A_4$  – показание флюориметра для контрольной пробы к стандартному раствору;
- $m$  – навеска, г;
- $P_{cp}$  – средняя масса таблетки, г.

***Приготовление стандартного раствора тиамин хлорида.***

10,0 мг (точная навеска) тиамин хлорида, предварительно высушенного при 100-5°C в течение 2 ч, растворяют в мерной колбе ёмкостью 100 мл в 25%-ном спирте с добавлением 1 капли концентрированной хлористоводородной кислоты и доводят 25%-ным спиртом до метки (основной раствор годен в течение месяца при хранении в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой).

1 мл основного раствора помещают в мерную колбу ёмкостью 100 мл и доводят водой до метки (рабочий раствор годен в день приготовления). 1 мл стандартного раствора содержит 0,001 мг тиамин хлорида.

***Окислительная смесь.*** 80 мг красной кровяной соли помещают в мерную колбу ёмкостью 200 мл, растворяют в 8 мл воды и доводят 15% раствором гидроксида натрия до метки.

***Бутиловый спирт.*** Спирт проверяют на отсутствие флюоресценции. В случае наличия флюоресценции спирт очищают следующим образом: к 500 мл спирта добавляют 8-10 г активированного угля и оставляют на сутки периодически встряхивая, фильтруют и перегоняют, собирая фракцию с температурой кипения 117°C.

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Напишите уравнение реакции тиамин хлорида с красной кровяной солью в щелочной среде.
2. Выведите формулу для расчета содержания тиамин хлорида основания в размерности мг/100 г продукта, если известно что анализ проводился по методике, описанной в опыте 3.
3. Какова реакция водного раствора тиамин хлорида?

4. Объясните, почему реакцию тиамин хлорида с раствором соли диазония проводят в щелочной среде, а не в слабокислой, как это обычно делают при азосочетании солей диазония с ароматическими аминами.
5. Дает ли тиамин хлорид общую реакцию на ароматические амины, заключающуюся в диазотировании амина и последующем азосочетании образующейся соли диазония с  $\beta$ -нафтолом?

### 2.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА

#### **Опыт 4. Идентификация рибофлавина флюоресцентным методом**

1 мг препарата растворяют в 100 мл воды – раствор имеет яркую зеленовато-желтую окраску. При просматривании в ультрафиолетовом свете наблюдается интенсивная зеленая флюоресценция. Раствор разливают в три пробирки по 5 мл в каждую. В одну пробирку добавляют 1 мл 10%-ной хлористоводородной кислоты, в другую – 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, в третью – несколько кристаллов гидросульфита натрия. Пробирки просматривают в ультрафиолетовом свете.

В первых двух пробирках окраска сохраняется, но флюоресценция отсутствует; в третьей пробирке исчезают и окраска, и флюоресценция.

#### **Опыт 5. Восстановление рибофлавина**

К 1 мл 0,02%-ного раствора рибофлавина добавляют 0,5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и кусочек цинка. Окраска раствора начинает меняться сначала в зеленую, затем в малиновую, розовую, и, наконец, наступает обесцвечивание. Бесцветный раствор переливают в другую пробирку, чтобы отделить от цинка, и оставляют на несколько минут. Через несколько минут верхний слой жидкости в пробирке снова принимает желтое окрашивание.

#### **Опыт 6. Взаимодействие рибофлавина с солями серебра и ртути**

К 1 мл 0,02%-ного раствора рибофлавина добавляют 0,5 мл 0,1М раствора нитрата серебра.

Появляется розовое или красное окрашивание (интенсивность окраски пропорциональна концентрации рибофлавина). К 1 мл 0,02%-ного раствора рибофлавина добавляют 0,5 мл 0,1М раствора нитрата или ацетата ртути. Появляется оранжево-красное окрашивание.

### **Опыт 7. Количественное определение рибофлавина в таблетках**

Точную навеску порошка растертых таблеток, содержащую около 0,012 г рибофлавина, растворяют при нагревании на водяной бане в 350 мл воды, подкисленной 1мл ледяной уксусной кислоты в мерной колбе емкостью 500 мл. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют. 10 мл фильтрата переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, прибавляют 1,8 мл 0,1М раствора ацетата натрия, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 267 нм. Содержание рибофлавина, г, в одной таблетке вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot P_{\text{ср}} \cdot 25}{850 \cdot a}$$

где:

- D – оптическая плотность испытуемого раствора;
- a – навеска порошка растертых таблеток, г;
- $P_{\text{ср}}$  – средняя масса таблетки, г;
- 850 – удельный показатель поглощения  $E_{1\text{ см}}^{1\%}$  чистого рибофлавина при длине волны 267 нм.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Напишите уравнение реакции рибофлавина с цинком в кислой среде.
2. Обоснуйте множитель 25 в формуле для расчета содержания рибофлавина в таблетках (опыт 7).
3. Напишите уравнение реакции рибофлавина с гидросульфитом натрия.
4. В учебнике В.Г.Беликова (Фармацевтическая химия. М.: Высш. школа, 1985. С. 644) написано, что рибофлавин окисляется ионами серебра с образованием розового окрашивания. Согласны ли вы с интерпретацией этой

- реакции, приведенной в указанном учебнике? Объясните и обоснуйте сущность реакции рибофлавина с нитратом серебра.
5. Объясните, почему рибофлавин лучше растворяется в растворах кислот и щелочей, чем в воде.
  6. Рибофлавин количественно реагирует с нитратом серебра, образуя практически нерастворимую в воде соль. С учётом этого факта предложите метод аргентометрического количественного анализа рибофлавина.
  7. Предложите химический метод, позволяющий отличить рибофлавин от флавиномононуклеотида.

### 2.1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В<sub>6</sub>

#### **Опыт 8. Идентификация витаминов группы В<sub>6</sub>**

Около 3-4 мг пиридоксина гидрохлорида (на кончике скальпеля) растворяют в 3 мл воды и раствор разливают по 1 мл в три пробирки:

а) в первую пробирку добавляют 2 мл аммиачного буферного раствора, 1 мл 0,04%-ного раствора 2,6-дихлорхинон-N-хлоримида в бутиловом спирте, 2 мл бутилового спирта и встряхивают в течение 1 мин. Слой бутилового спирта окрашивается в голубой цвет;

б) во вторую пробирку добавляют 1-2 капли раствора хлорида железа (III); появляется красное окрашивание, исчезающее при добавлении 15%-ной серной кислоты;

в) в третью пробирку добавляют 1 мл 1М раствора гидроксида натрия и 1 мл диазореактива (приготовление диазореактива см. опыт 2); появляется красное окрашивание.

*Приготовление аммиачного буферного раствора.* 5,4 г хлорида аммония растворяют в воде, добавляют 35 мл 25%-ного раствора аммиака и доводят водой до 100 мл.

#### **Опыт 9. Количественный анализ субстанции пиридоксина гидрохлорида**

Около 0,15 г препарата (точная навеска) помещают в колбу для титрования, добавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты, 10 мл уксусного ангидрида, перемешивают до растворения и титруют 0,1М раствором хлорной кислоты\* с индикатором кристаллическим фиолетовым до перехода фиолетового окрашивания в изумрудно-зеленое.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1М раствора хлорной кислоты соответствует 0,02056 г пиридоксина гидрохлорида.

\* **Приготовление 0,1М раствора хлорной кислоты.** 11,7 мл 57%-ного или 18,1 мл 42%-ного водного раствора хлорной кислоты помещают в мерную колбу емкостью 1 л, туда же приливают 300 мл ледяной уксусной кислоты. Колбу помещают в холодную воду и прибавляют постепенно, при перемешивании, 140 мл уксусного ангидрида. После охлаждения раствор доводят до метки ледяной уксусной кислотой.

**Установка титра приготовленного раствора хлорной кислоты.** 0,1-0,15 г гидрофталата калия (точная навеска) предварительно высушенного при 120 °С в течение 2 ч, растворяют в 15-20 мл ледяной уксусной кислоты и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты из бюретки с ценой деления 0,02 мл в присутствии 1-2 капель раствора кристаллического фиолетового до перехода фиолетовой окраски в голубовато-зеленую. Поправочный коэффициент вычисляют по формуле:

$$K = A/T \cdot V$$

где:

- А – навеска гидрофталата калия, г;
- Т – титр гидрофталата калия = 0,02042 г/мл;
- V – объем хлорной кислоты, израсходованный на титрование, мл.

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Напишите уравнение реакции пиридоксина гидрохлорида с хлорной кислотой в смеси ледяной уксусной кислоты и уксусного ангидрида.
2. Объясните роль уксусного ангидрида в методе неводного титрования пиридоксина гидрохлорида хлорной кислотой. Можно ли вместо уксусного ангидрида использовать ацетат ртути?
3. Характерны ли для пиридоксина реакции электрофильного замещения, такие, как нитрование, бромирование, и могут ли они быть использованы для качественного анализа пиридоксина?
4. Объясните, почему пиридоксина гидрохлорид необходимо хранить в хорошо закупоренных банках, в защищенном от света месте.
5. Пиридоксина гидрохлорид можно количественно определять методом неводного титрования хлорной кислотой (опыт 9), а также алкалиметрическим методом в водной среде. Объясните, какой из этих методов дает более правильные результаты (валидность какого метода выше).

6. При добавлении к раствору пиридоксина гидрохлорида раствора нитрата серебра образуется белый осадок. Объясните наблюдаемое явление.

#### 2.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

##### **Опыт 10. Идентификация фолиевой кислоты**

Около 10 мг препарата растворяют в 5 мл 0,1М раствора гидроксида натрия, приливают 5 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты и 1 мл 0,1%-ного раствора перманганата калия. Раствор нагревают 3 мин на водяной бане при температуре 80-85 °С, охлаждают и прибавляют по каплям 3%-ный раствор перекиси водорода до исчезновения окраски перманганата калия (примерно 4-6 капель). Реакционную смесь фильтруют. Фильтрат имеет голубую флюоресценцию в ультрафиолетовом свете.

##### **Опыт 11. Идентификация фолиевой кислоты спектрофотометрическим методом**

УФ-спектр 0,001%-ного раствора препарата в 0,1М растворе гидроксида натрия имеет максимумы поглощения при 256, 283, 365 нм. Отношение оптических плотностей должно быть

$$D_{256 \text{ нм}} / D_{365 \text{ нм}} = 2,8-3,0$$

##### **Опыт 12. Количественный анализ таблеток фолиевой кислоты**

Около 1 г порошка растертых таблеток (точная навеска) помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды, 2 мл концентрированного раствора аммиака, перемешивают, доводят объём раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10-15 мл фильтрата. 10 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят объём до метки 3%-ным раствором гидрофосфата калия и перемешивают.

В две пробирки наливают по 5 мл стандартного раствора фолиевой кислоты (пробирки 1 и 2). В две другие пробирки наливают по 5 мл испытуемого раствора (пробирки 3 и 4). В 5-ю пробирку наливают 5 мл 3%-ного раствора гидрофосфата калия.

В пробирки 1 и 3 наливают по 1 мл 0,4%-ного раствора перманганата калия, а в пробирки 2, 4 и 5 – по 1 мл воды. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 3 мин. Затем во все пробирки приливают по 1 мл 2%-ного раствора нитрита натрия и по 1 мл 25%-ного раствора хлористоводородной кислоты, хорошо перемешивают и оставляют на 2 мин. Во все пробирки приливают по 1 мл 5%-ного раствора сульфамата аммония (или сульфаминовой кислоты, или мочевины) и осторожно перемешивают до прекращения выделения пузырьков газа. Во все пробирки приливают по 1 мл 0,1%-ного раствора N-(1-нафтил)этилендиамина дигидрохлорида, перемешивают и оставляют на 10 мин.

Измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине волны 550 нм в кювете толщиной 1 см относительно контрольного раствора (пробирка 5).

Содержание фолиевой кислоты в одной таблетке, г, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(D_3 - D_4) \cdot C \cdot 1000 \cdot P_{\text{ср}}}{(D_1 - D_2) \cdot a}$$

где:

- $D_1, D_2, D_3, D_4$  – оптические плотности растворов в пробирках 1, 2, 3, 4;
- $C$  – концентрация стандартного раствора фолиевой кислоты, мг/мл;
- $a$  – навеска препарата, г;
- $P_{\text{ср}}$  – средняя масса таблетки, г.

#### ***Приготовление стандартного раствора фолиевой кислоты.***

Около 0,05 г стандартного образца фолиевой кислоты (точная навеска) растворяют в смеси 50 мл воды и 2 мл концентрированного раствора аммиака в мерной колбе ёмкостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят объем раствора до метки 3%-ным раствором гидрофосфата калия. Раствор годен в день приготовления.

#### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Напишите уравнение реакции фолиевой кислоты с перманганатом калия в нейтральной среде.

2. Напишите уравнения реакций, лежащих в основе описанного выше метода количественного анализа фолиевой кислоты (опыт 12).
3. Обоснуйте формулу для расчета содержания фолиевой кислоты в таблетке.
4. Фолиевая кислота не флюоресцирует в ультрафиолетовом свете, однако при хранении ее кислых водных растворов на воздухе через некоторое время растворы приобретают способность флюоресцировать. Объясните наблюдаемое явление.
5. Какие реакции происходят при нагревании кислых и щелочных растворов фолиевой кислоты?

### 2.1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИАНОКОБАЛАМИНА

#### **Опыт 13. Открытие кобальта в цианокобаламине**

В фарфоровый тигель помещают такой объём ампульного раствора цианокобаламина, чтобы содержание в нем препарата было около 1 мг, добавляют 0,05 г гидросульфата калия и упаривают раствор, а затем сплавляют до осветления плава.

Охлаждают плав, прибавляют 3 мл воды и нагревают до растворения плава. Затем охлаждают, добавляют 1 каплю раствора фенолфталеина и нейтрализуют раствором едкого натра до светло-розового окрашивания. Прибавляют 0,5 г ацетата натрия, 0,5 мл 30%-ной уксусной кислоты и 0,5 мл 0,5%-ного раствора нитрозо-Р-соли; появляется красное окрашивание, сохраняющееся после прибавления 0,5 мл 25%-ной хлористоводородной кислоты.

#### **Опыт 14. Идентификация и количественное определение цианокобаламина в растворе**

Ампульный раствор цианокобаламина для инъекций разводят водой до концентрации 0,002% и измеряют на спектрофотометре УФ-спектр в кювете толщиной 1 см в зоне 240-600 нм. Раствор препарата имеет максимумы поглощения при  $278 \pm 1$  нм,  $361 \pm 1$  нм и  $548 \pm 2$  нм.

Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 361 нм в кювете толщиной 1 см, используя в качестве контрольного раствора воду.

Содержание цианокобаламина, мг, в 1 мл препарата вычисляют по формуле

$$X = \frac{D \cdot 10 \cdot V_1}{207 \cdot V_0}$$

где:

- D – оптическая плотность испытуемого раствора;
- V<sub>1</sub> – конечный объем раствора после разведения, мл;
- V<sub>0</sub> – объем препарата, взятый для разведения, мл;
- 207 – удельный показатель поглощения чистого цианокобаламина при длине волны 361 нм.

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Объясните, почему при открытии кобальта в цианокобаламине необходимо предварительно провести минерализацию препарата.
2. Каковы кислотно-основные свойства цианокобаламина?
3. Какова степень окисления кобальта в цианокобаламине?
4. Чем отличаются по строению цианокобаламин и коферментная форма витамина В<sub>12</sub>?

### 2.1.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

#### **Опыт 15. Реакция с нитратом серебра**

0,05 г препарата растворяют в 2 мл воды и прибавляют 0,5 мл 2%-ного раствора нитрата серебра. Выпадает темный осадок.

#### **Опыт 16. Реакция с метиленовым синим**

Клубень картофеля или часть кочана капусты натирают на терке из нержавеющей стали. Растертую массу отжимают через полотняную ткань. К 1 мл свежееотжатого сока картофеля или капусты добавляют 1-2 капли 0,01%-ного раствора метиленового синего, 2-3 капли 5%-ного раствора карбоната натрия и слегка подогревают. Наблюдается обесцвечивание синей окраски.

#### **Опыт 17. Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (метод Тильманса)**

К 1 мл свежееотжатого сока картофеля или капусты добавляют 3-4 капли 2%-ного раствора хлористоводородной кислоты и медленно по каплям 0,0005М раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофене-

нола. По мере добавления реактива окраска вначале исчезает, а затем появляется розовая окраска.

### **Опыт 18. Реакция с красной кровяной солью**

К 1 мл сока капусты или картофеля прибавляют 2 капли 5%-ного раствора гидроксида калия, 2 капли 5%-ного раствора красной кровяной соли и встряхивают пробирку, после чего добавляют 6-8 капель 10%-ного раствора хлористоводородной кислоты и 1-2 капли 1%-ного раствора хлорного железа. Появляется синее или зеленовато-синее окрашивание.

### **Опыт 19. Количественное определение аскорбиновой кислоты в порошках и таблетках йодометрическим методом**

Около 0,1 г препарата (точная навеска) помещают в колбу для титрования, добавляют 10 мл воды и 1 мл 2%-ного раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и титруют 0,1н раствором йода до появления слабо-синего окрашивания (индикатор крахмал добавляют в конце титрования).

1 мл 0,1н раствора йода соответствует 0,008806 г аскорбиновой кислоты.

### **Опыт 20. Количественное определение аскорбиновой кислоты в порошках и таблетках йодатометрическим методом**

Около 0,1 г препарата (точная навеска) помещают в колбу для титрования, добавляют 10 мл воды, 0,5 мл 1%-ного раствора йодида калия, 2 мл раствора крахмала, 1 мл 2%-ного раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и титруют 0,1н раствором йодата калия до появления слабо-синего окрашивания.

1 мл 0,1н раствора йодата калия соответствует 0,008806 г аскорбиновой кислоты.

**Опыт 21. Количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном сырье (методика ВНИИ растениеводства)**

*Подготовка растительного материала к анализу.* При исследовании картофеля из каждого клубня вырезают сектор наподобие лимонной дольки, чтобы захватить все слои клубня. При анализе кочанной капусты срез делают через все слои кочана.

Томаты и другие сочные плоды разрезают по вертикальной оси на 4-6 частей и для исследования берут одну часть. Пробы, взятые из нескольких клубней, кочанов, плодов, составляют среднюю пробу. Среднюю пробу плодов, овощей, листьев разрезают ножом из нержавеющей стали на стеклянной пластинке.

Мелкие плоды и ягоды растирают в ступке. При исследовании вишен, черешен, слив удаляют косточки. Листья разрезают на кусочки.

*Ход анализа.* На технических весах взвешивают 4-5 г исследуемого материала с точностью до 0,01 г. Навеску помещают в ступку, сразу же заливают 20 мл 1%-ного раствора хлористоводородной кислоты и быстро растирают до образования однородной кашицеобразной массы. Растертую гомогенную массу количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, обмывая ступку, пестик, воронку и шпатель 1%-ной щавелевой кислотой.

Содержимое колбы доводят до метки 1%-ной щавелевой кислотой, колбу закрывают пробкой, тщательно взбалтывают в течение 1-2 мин и оставляют на 8-10 мин. Содержимое мерной колбы фильтруют (первые 10 мл фильтрата отбрасывают) или центрифугируют.

В колбу для титрования помещают 10 мл фильтрата и титруют из микробюретки емкостью 5 мл 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, устойчивой в течение 30 с. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,001н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,086 мг аскорбиновой кислоты. Расчет содержания аскорбиновой кислоты (X мг/100 г продукта) проводят по формуле:

$$X = K \cdot (V_{\text{оп}} - V_{\text{конт}}) \cdot 0,086 \cdot 100 \cdot 100 / 10 \cdot A$$

где:

- $K$  – поправочный коэффициент к нормальности раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;
- $V_{\text{оп}}$  – объём титранта, пошедший на опытное определение, мл;
- $V_{\text{конт}}$  – объём титранта, пошедший на контрольное определение, мл;
- 0,086 – титр 0,001н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, г/мл;
- 100 – объём мерной колбы, мл;
- 100 – масса объекта, в котором рассчитывается содержание, г;
- 10 – объём пипетки, мл;
- $A$  – навеска для анализа, г.

**Приготовление 0,001н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.** 30-35 мг сухой натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола помещают в мерную колбу емкостью 200 мл, добавляют 120-150 мл воды и 4-5 капель 0,01 н раствора едкого натра, взбалтывают в течение 10-15 мин и оставляют на ночь. Раствор доводят водой до метки и фильтруют в склянку из темного стекла. При хранении в холодильнике раствор годен в течение недели. Титр раствора проверяют ежедневно.

**Установка поправочного коэффициента к нормальности раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.** В химический стаканчик помещают несколько кристаллов чистой аскорбиновой кислоты (примерно 1-1,5 мг, взвешивать не надо) и растворяют их в 50 мл 2%-ной хлористоводородной кислоты. 5 мл полученного раствора титруют из микробюретки приготовленным приблизительно 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания. Снова берут той же пипеткой в другую колбу 5 мл раствора аскорбиновой кислоты, добавляют несколько кристалликов иодистого калия, 2-3 капли раствора крахмала и титруют 0,001 н раствором иодата калия до появления голубого окрашивания. Поправочный коэффициент к нормальности раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола ( $K$ ) вычисляют по формуле

$$K = A/V$$

где:

- $A$  – количество миллилитров 0,001 н раствора йодата калия, израсходованное на титрование раствора аскорбиновой кислоты;

- В – количество миллилитров раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование того же объёма того же раствора аскорбиновой кислоты.

## **Опыт 22. Количественное определение аскорбиновой кислоты в окрашенном растительном сырье**

Взятие пробы на анализ проводят, как указано в опыте №21. Окрашенную пробу помещают в стаканчик для титрования, добавляют 5 мл хлороформа и титруют при постоянном перемешивании до появления розовой окраски в хлороформном слое. Этот метод неприемлем в том случае, если хлороформный слой окрашивается еще до титрования. Расчет результатов проводят по формуле, представленной в опыте №21.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Объясните, почему аскорбиновую кислоту нецелесообразно определять методом нейтрализации?.
2. На каких свойствах аскорбиновой кислоты основаны её реакции с нитратом серебра, метиленовой синью, красной кровяной солью? Ответ подтвердите уравнениями реакций.
3. Если к раствору пиридоксина гидрохлорида добавить раствор хлорида железа (III), появляется красное окрашивание (см. опыт 8), которое исчезает после добавления аскорбиновой кислоты. Объясните это явление.
4. Какие химические реакции происходят с аскорбиновой кислотой при тепловой обработке пищевых продуктов.

### **2.1.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И НИКОТИНАМИДА**

#### **Опыт 23. Идентификация никотиновой кислоты**

А. 0,15 г препарата растворяют в 15 мл воды при нагревании.

1. К 3 мл теплого раствора препарата прибавляют 1 мл 5%-ного раствора сульфата меди. Выпадает синий осадок.

2. К 10 мл такого же раствора прибавляют 0,5 мл 10%-ного раствора сульфата меди и 2 мл 5%-ного раствора роданида аммония. Появляется зеленое окрашивание.

Б. 0,1 г препарата нагревают с 0,1 г безводного карбоната натрия. Появляется запах пиридина.

#### **Опыт 24. Количественный анализ раствора никотиновой кислоты 1%-ного для инъекций**

20 мл препарата помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют 2 капли раствора фенолфталеина и прикапывают 1М раствор гидроксида натрия до розового окрашивания. Добавляют 10 мл 5%-ного раствора сульфата меди и оставляют на 10 мин, после чего раствор доводят до метки водой. Раствор фильтруют, отбрасывают первые 20-25 мл фильтрата. 50 мл фильтрата помещают в колбу для титрования, прибавляют 10 мл 8%-ной хлористоводородной кислоты, 2 г йодида калия и выделившийся йод титруют 0,1М раствором тиосульфата натрия, добавляя в конце титрования индикатор крахмал (1 мл), до исчезновения синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1М раствора тиосульфата натрия соответствует 0,02462 г никотиновой кислоты.

#### **Опыт 25. Количественное определение субстанции никотиновой кислоты**

Около 0,15 г препарата (точная навеска) помещают в колбу для титрования, растворяют в 15 мл свежeproкипяченной горячей воды и по охлаждению титруют 0,1М раствором едкого натра до не исчезающего в течение 1 мин розового окрашивания.

1 мл 0,1М раствора едкого натра соответствует 0,1231 г никотиновой кислоты.

#### **Опыт 26. Идентификация никотиамида**

0,1 г препарата нагревают с 0,1 г безводного карбоната натрия; развивается запах пиридина.

0,1 г препарата нагревают с 2 мл 0,1М раствора едкого натра; появляется запах аммиака (отличие от никотиновой кислоты).

## **Опыт 27. Количественное определение субстанции никотинамида**

Около 0,15 г предварительно высушенного препарата (точная навеска) растворяют в 20 мл безводной уксусной кислоты и титруют 0,1М раствором хлорной кислоты с индикатором кристаллический фиолетовый до появления изумрудно-зеленого окрашивания.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Как с помощью одного реактива – гидроксида натрия – идентифицировать никотиновую кислоту и никотинамид и отличить их друг от друга.
2. Объясните, почему никотиновая кислота образует осадок при взаимодействии с сульфатом меди, а никотинамид – нет.
3. Будет ли никотинамид давать зеленое окрашивание при действии сульфата меди и роданида аммония так же, как никотиновая кислота (см. опыт 23 (А2))?
4. Напишите уравнения реакций, лежащих в основе йодометрического метода количественного анализа никотиновой кислоты, и определите молярную массу ее эквивалента в этом методе.

### **2.1.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ А**

## **Опыт 28. Идентификация витаминов группы А**

А. 1 каплю масляного раствора ретинола ацетата или 2-3 капли рыбьего жира растворяют в 1 мл хлороформа и добавляют 5 мл насыщенного раствора хлорида сурьмы в перегнанном хлороформе; появляется синее окрашивание.

Б. 1 каплю масляного раствора ретинола ацетата или 2-3 капли рыбьего жира растворяют в 1 мл хлороформа и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты и встряхивают; возникает сине-фиолетовое окрашивание, которое быстро переходит в красноватое и затем в бурое.

В. Раствор ретинола ацетата с концентрацией около 3 мкг/мл в абсолютном этиловом спирте, свободном от альдегидов, имеет максимум поглощения при  $326 \pm 1$  нм.

## **Опыт 29. Количественное определение витамина А в тресковом рыбьем жире**

Около 1 г жира (точная навеска) помещают в колбу емкостью 100 мл, снабженную обратным холодильником; прибавляют 30 мл спирта, не содержащего альдегидов, 3 мл 50%-ного водного раствора гидроксида калия и дефлегмируют смесь 30 мин. Содержимое колбы охлаждают, добавляют 50 мл воды и переносят в делительную воронку. Смесь экстрагируют 50 мл эфира, а затем еще 2 раза по 30 мл эфира. Объединенные эфирные вытяжки промывают водой по 30-40 мл до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином). К промытым эфирным вытяжкам добавляют 8 г безводного сульфата натрия и оставляют на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем фильтруют содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промывают несколькими порциями эфира, который фильтруют в ту же колбу. Эфир отгоняют в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 50 °С. Неомыляемый остаток растворяют в абсолютном спирте до получения раствора, содержащего в 1 мл около 3 мкг (8-10 МЕ) витамина А. Измеряют оптическую плотность этого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длинах волн 311 нм; 324,5 нм и 334 нм, применяя в качестве контрольного раствора абсолютный спирт.

Содержание витамина А в международных единицах (МЕ) в 1 г жира (X) вычисляют по формуле

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

где:

- $D_{\text{испр}} = 7 \cdot D_{324,5} - 2,912 \cdot D_{311} - 4,088 \cdot D_{334}$  ( $D_{324,5}$ ,  $D_{311}$ ,  $D_{334}$  — оптические плотности раствора при соответствующих длинах волн);
- $a$  — навеска препарата, г;
- $V$  — объём спиртового раствора, приготовленный для фотометрирования, мл;
- 1850 — коэффициент пересчета в МЕ.

Рыбий жир должен содержать не менее 350 МЕ витамина А в 1 г.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С помощью каких реакций можно отличить ретинола ацетат от других жирорастворимых витаминов (D, K, E)?
2. Предложите метод качественного определения ацетильной группы в ретинола ацетате.
3. Зная, что за Международную Единицу действия (МЕ) витамина А принимается 0,3 мкг ретинола, определите не менее скольких мг витамина А должно содержаться в 100 г трескового рыбьего жира.

### 2.1.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ D

#### **Опыт 30. Определение витамина D в масляном растворе эргокальциферола**

0,3 мл раствора эргокальциферола в масле растворяют в 3 мл хлороформа и испытывают? как описано ниже:

а) к 1 мл хлороформного раствора препарата добавляют 3-4 капли хлористого ацетила и 5 мл насыщенного раствора хлорида сурьмы в хлороформе; появляется оранжево-розовое окрашивание (отличие от витамина А, см. опыт 25);

б) к 2 мл хлороформного раствора препарата добавляют 1 мл 1%-ного раствора брома в хлороформе (тяга!); через некоторое время появляется зеленое или голубовато-зеленое окрашивание.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Напишите уравнение реакции эргокальциферола с бромом.
2. Объясните, почему витамин D дает с хлоридом сурьмы оранжево-розовое окрашивание, а витамин А – синее. От чего зависит цвет образующихся комплексов?
3. Можно ли реакцию с хлоридом сурьмы проводить во влажной пробирке? С какой целью в этой реакции добавляется хлористый ацетил?

### 2.1.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ E

#### **Опыт 31. Идентификация токоферола ацетата**

0,2-0,3 мл 5%-ного масляного раствора токоферола ацетата растворяют в 5 мл абсолютного этилового спирта, добавляют 1 мл ды-

мящей азотной кислоты и осторожно нагревают в течение 15 мин на водяной бане при температуре около 80 °С (тяги!); появляется красно-оранжевое окрашивание.

### **Опыт 32. Количественное определение токоферола ацетата в масляных растворах**

Точную навеску масляного раствора препарата, содержащую около 0,12 г токоферола ацетата, помещают в круглодонную колбу емкостью 100 мл, снабженную обратным холодильником, добавляют 18 мл абсолютного спирта, 2 мл концентрированной серной кислоты и кипятят в течение 2 ч на водяной бане.

Смесь охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят объем раствора до метки абсолютным спиртом. 10 мл этого раствора помещают в колбу для титрования, добавляют 10 мл спирта, 5 мл воды, 1-2 капли 0,5%-ного раствора дифениламина в 85%-ной серной кислоте и титруют при постоянном перемешивании 0,01М раствором сульфата церия до появления сине-фиолетового окрашивания, устойчивого в течение 10 с.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,01М раствора сульфата церия соответствует 0,002364 г токоферола ацетата

#### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Напишите уравнение реакции токоферола ацетата с азотной кислотой.
2. Объясните, почему токоферола ацетат гораздо более устойчив к действию окислителей, чем токоферол.
3. С какой целью перед цериметрическим определением токоферола ацетата его кипятят в течение 2 ч в присутствии концентрированной серной кислоты? Какая реакция при этом происходит?
4. Напишите уравнение реакции токоферола с сульфатом церия и определите молярную массу эквивалента токоферола ацетата в цетиметрическом методе его анализа.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА ПО АНАЛИЗУ ВИТАМИНОВ

**Задание.** Каждый студент получает 10 мл раствора, содержащего предполагаемый витамин неизвестной концентрации.

**Цель работы** – провести качественный и количественный анализ раствора витамина.

### **Алгоритм выполнения**

1. С помощью качественных реакций или метода УФ-спектроскопии установить наличие предполагаемого витамина в растворе.
2. Выбрать и согласовать с преподавателем метод количественного анализа обнаруженного в растворе витамина.
3. Составить методику количественного анализа с учетом ожидаемой концентрации его в растворе и согласовать её с преподавателем.
4. Провести количественное определение и обработать результаты.
5. Все этапы работы запротоколировать и сдать отчет.

### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Государственная фармакопея СССР. X изд. М.: Медицина, 1961.
2. *Фердман, Д.Л.* Биохимия: учебник для вузов/ *Д.Л. Фердман*. – М.: Высш. шк., 1966. – 644 с.
3. *Малер, Г.* Основы биологической химии: пер с англ./ *Г. Малер, Ю. Кордес*. – М.: Мир, 1970. – 567 с.
4. Химия биологически активных природных соединений / под ред. *Н.А. Преображенского*. – М.: Химия, 1970. – 512 с.
5. Современные методы в биохимии / под ред. *В.Н. Ореховича*. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
6. *Яхимович, Р.И.* Химия витаминов D / *Р.И. Яхимович*. – Киев: Наукова думка, 1978. – 248 с.
7. *Шрайнер, Р.* Идентификация органических соединений: пер. с англ./ *Р. Шрайнер, Р. Фьюзон, Д. Кёртин* и др. – М.: Мир, 1983. – 703 с.
8. Химическая энциклопедия: в 5 т. Т.1. – М., 1988. – 623 с
9. *Досон, Р.* Справочник биохимика: пер с англ. / *Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот* и др. – М.: Мир, 1991. – 543 с.
10. *Девис, С.* Витамин С: Химия и биохимия: пер. с англ. / *С. Девис, Д. Остин, Д. Патридж*. – М.: Мир, 1999. – 176 с.
11. *Кольман, Я.* Наглядная биохимия: пер. с нем. / *Я. Кольман, К.-Г. Рем*. – М.: Мир, 2000. – 469 с.

12. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии: учеб. пособ./ *Э.Н. Аксенова, О.П. Андрианова, А.П. Арзамасцев* и др. – М., 2001. – 384 с.
13. *Кнорре, Д.Г.* Биологическая химия: учебник для вузов / *Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина.*– М.: Высш. шк., 2002. – 479 с.
14. *Арзамасцев, А.П.* Большая российская энциклопедия лекарственных средств: в 2 т. / *А.П. Арзамасцев, А.А. Баранов, Ю.Н. Беленков* и др. – М.: Ремедиум, 2002. – 1384 с.
15. Энциклопедия биологической химии: в 4 т. Т.4. М., 2004. – 503 с.
16. *Арзамасцев, А.П.* Фармацевтическая химия / *А.П. Арзамасцев.* М.: Гэотар Медицина, 2004. – 640 с.
17. *Лифляндский, В.* Витамины и минералы / *В. Лифляндский.* СПб.: НЕВА, 2006. – 640 с.
18. *Беликов, В.Г.* Фармацевтическая химия / *В.Г. Беликов.* М.: МЕДэкспрес-информ, 2007. – 624 с.
19. *Мокшина, Н.Я.* Экстракция и определение ароматических  $\alpha$ -аминокислот и водорастворимых витаминов – закономерности и новые аналитические решения: автореф. дис. ... д – ра хим. наук / *Н.Я. Мокшина.* М., 2007.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	3
1. Внеаудиторная подготовка .....	4
1.1. Витамины и коферменты.....	4
1.1.1. Краткая история открытия витаминов.....	4
1.1.2. Классификация и номенклатура витаминов и коферментов .....	7
1.1.2.1. Витамины .....	7
1.1.2.2. Коферменты .....	12
1.1.3. Биологическая роль витаминов и коферментов .....	26
1.1.4. Физические свойства витаминов и их анализ.....	43
1.1.5. Химические свойства витаминов и их анализ .....	46
1.1.5.1. Витамины группы В <sub>1</sub> .....	46
1.1.5.2. Витамины группы В <sub>2</sub> .....	47
1.1.5.3. Витамины группы В <sub>3</sub> .....	49
1.1.5.4. Витамины группы В <sub>6</sub> .....	50
1.1.5.5. Витамины группы В <sub>с</sub> .....	51
1.1.5.6. Витамины группы В <sub>12</sub> .....	53
1.1.5.7. Витамин С .....	54
1.1.5.8. Витамины группы РР .....	58
1.1.5.9. Витамины группы А .....	60
1.1.5.10. Витамины группы D .....	61
1.1.5.11. Витамины группы E.....	61
1.1.5.12. Витамины группы К .....	64
Контрольные вопросы, задачи и упражнения.....	65
2. Лабораторный практикум .....	68
2.1. Анализ витаминов .....	68
2.1.1. Определение витаминов группы В <sub>1</sub> .....	68
2.1.2. Определение рибофлавина .....	71
2.1.3. Определение витаминов группы В <sub>6</sub> .....	73
2.1.4. Определение фолиевой кислоты .....	75
2.1.5. Определение цианокобаламина.....	77
2.1.6. Определение аскорбиновой кислоты .....	78
2.1.7. Определение никотиновой кислоты и никотинамида.....	82
2.1.8. Определение витаминов группы А .....	84
2.1.9. Определение витаминов группы D .....	86
2.1.10. Определение витаминов группы E.....	86
Библиографический список.....	888

*Учебное издание*

*СМИРНОВ Виктор Александрович,  
КЛИМОЧКИН Юрий Николаевич*

**Витамины и коферменты**

Редактор *С.И. Костерина*  
Верстка *Е.Э. Парсаданян*  
Выпускающий редактор *Н.В. Беганова*

Подп. в печать 12.08.08.  
Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Печать офсетная.  
Усл. п. л. 5,35. Уч.-изд. л. 5,12.  
Тираж 100 экз. Рег. № 367.

---

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Самарский государственный технический университет»  
443100. г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244. Главный корпус

Отпечатано в типографии  
Самарского государственного технического университета  
443100. г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244. Корпус №8