

**В.В. ЕВЛАШ  
Н.А. ОТРОШКО  
Т.О. КУЗНЕЦОВА**

# **ХИМИЯ ВИТАМИНОВ**

Учебное пособие



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ  
Харьковский государственный университет питания и торговли

**В.В. ЕВЛАШ, Н.А. ОТРОШКО, Т.О. КУЗНЕЦОВА**

# **ХИМИЯ ВИТАМИНОВ**

Учебное пособие

Харьков  
ХГУПТ  
2014

УДК 543.645.5  
ББК 35.66  
Е-89

Рецензенты:

д-р хим. наук, проф. В.И. Ларин,  
д-р хим. наук, проф. Н.Е. Блажеевский

Рекомендовано к изданию ученым советом ХГУПТ, протокол №  
от .06.2014 г.

**Евлаш В.В., Отрошко Н.А., Кузнецова Т.О.** Химия витаминов :  
учебное пособие / В.В. Евлаш, Н.А. Отрошко, Т.О. Кузнецова :  
Е-89 Харьковский государственный университет питания и торговли. –  
Х., 2014. – 155 с.

ISBN

Пособие написано согласно программе дисциплины «Химия витаминов» для студентов направления подготовки 030510 «Товароведение и торговое предпринимательство» специальностей 8.03051001 «Товароведение и коммерческая деятельность» и 8.03051003 «Экспертиза товаров и услуг» факультета товароведения и торгового предпринимательства ХГУПТ.

УДК 543.645.5  
ББК 35.66

© Евлаш В.В., Отрошко Н.А., Кузнецова Т.О., 2014  
© Харьковский государственный университет  
питания и торговли, 2014

ISBN

## Содержание

<b>Предисловие</b> .....	4
<b>Введение</b> .....	6
<b>Раздел 1. Водорастворимые витамины</b> .....	13
<i>Лабораторная работа № 1.1 «Качественные реакции водорастворимых витаминов»</i> .....	63
<i>Лабораторная работа № 1.2 «Особенности определения массовой доли L-аскорбиновой кислоты в зависимости от вида сырья»</i> .....	75
<i>Лабораторная работа № 1.3 «Определения массовой доли L-аскорбиновой кислоты в витаминных препаратах и настоях методом кулонометрического титрования»</i> .....	81
<i>Лабораторная работа № 1.4 «Определения массовой доли пиридоксина гидрохлорида (витамина В<sub>6</sub>) в чистых препаратах»</i> .....	85
<i>Лабораторная работа № 1.5 «Определения массовой доли никотиновой кислоты (витамина РР) в чистых препаратах»</i> .....	87
Контрольные вопросы к разделу 1.....	91
<b>Раздел 2. Жирорастворимые витамины</b> .....	92
<i>Лабораторная работа № 2.1 «Качественные реакции жирорастворимых витаминов»</i> .....	108
<i>Лабораторная работа № 2.2 «Определение каротиноидного состава масел шиповника и облепихи методом тонкослойной хроматографии»</i> .....	113
<i>Лабораторная работа № 2.3 «Выделение β-каротина из растительного сырья методом хроматографической адсорбции и его количественное определение методом спектрофотометрии»</i> .....	116
<i>Лабораторная работа № 2.4 «Особенности пробоподготовки при количественном определении жирорастворимых витаминов»</i> ...	119
<i>Лабораторная работа № 2.5 «Определения массовой доли витамина А в масляных растворах методом спектрофотометрии»</i> ...	126
<i>Лабораторная работа № 2.6 «Определения массовой доли токоферола ацетата (витамина Е) в масляных растворах»</i> .....	129
Контрольные вопросы к разделу 2 .....	132
<b>Раздел 3 Витаминоподобные соединения</b> .....	134
<i>Лабораторная работа № 3.1 «Определение массовой доли катехинов (витамина Р) в препаратах из чайного листа»</i> .....	149
Контрольные вопросы к разделу 3.....	150
Список использованной литературы.....	152
Список рекомендованной литературы.....	154

## Предисловие

Химия витаминов – это часть науки витаминологии, которая посвящена изучению химического строения, физико-химических свойств и методов выделения, идентификации и изучению свойств витаминов и витаминоподобных соединений.

«Химия витаминов» является дисциплиной по выбору ВУЗА. Включение этой дисциплины в учебные планы студентов, которые учатся по специальностям 8.03051001 «Товароведение и коммерческая деятельность» и 8.03051003 «Экспертиза товаров и услуг» обусловлено потребностью в повышении уровня знаний магистров в направлении улучшения качества экспертизы товаров.

Витаминизация как продовольственных, так и непродовольственных товаров с разной целью в последнее время стала обычной практикой для производителей. Эта ситуация требует от специалистов товароведов умение не только ориентироваться в выборе методов оценки содержания витаминов и витаминоподобных веществ и качества соответствующих витаминосодержащих товаров, но и иметь способность выбрать наиболее рациональный метод, учитывая химический состав анализируемого продукта, возможности существующей лаборатории и требования к точности результатов.

Пособие разработано в соответствии с рабочей программой дисциплины «Химия витаминов» и предназначено для самостоятельной работы и выполнения лабораторных работ по дисциплине.

Пособие состоит из трех разделов, которые содержат теоретический материал для самостоятельной проработки студентами, описание лабораторных работ, выполнение которых предусмотрено в рабочей программе дисциплины, контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы. В конце пособия приводятся приложения и список рекомендованных информационных источников.

Содержание и темы лабораторных работ выбраны таким образом, чтобы дать студентам-магистрам представление об особенностях пробоподготовки при определении количественного витаминного состава в зависимости от вида сырья и основные методы идентификации и количественного определения витаминов и витаминоподобных соединений.

В результате освоения практического курса дисциплины «Химия витаминов» студент должен уметь:

- выбирать наиболее рациональный физико-химический метод для экспертизы витаминосодержащих товаров по качеству;

- проводить логически и методологически правильно исследование по идентификации и оценки качества сырья и готовой продукции, содержащей витамины и витаминоподобные соединения;
- обобщать результаты исследований.

## Введение

**Витамины** – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, не синтезируемые (или синтезируемые в недостаточном количестве) в организме людей и большинства животных, поступающие с пищей и необходимые для каталитической активности ферментов, определяющих биохимические и физиологические процессы в живом организме.

Открытие витаминов как незаменимых нутриентов принадлежит российскому учёному Н.И. Лунину (1881), который экспериментально доказал, что для нормального существования животных кроме белков, жиров, минеральных солей и воды необходимы какие-то дополнительные добавки, которые содержатся в пище. По предложению К. Функа, который первым выделил из рисовых отрубей в кристаллическом виде вещество, которое лечит полиневрит ("бери-бери"), эти составляющие пищевого сырья начали называть витаминами.

Название обусловлено тем, что при химическом исследовании выделенного вещества в нём была найдена аминогруппа. Поскольку это вещество оказалось жизненно необходимым компонентом пищевой системы, название "амин жизни", или "витамин" стали употреблять и к другим подобным веществам, хотя, как выяснилось позднее, не все они содержат в своем составе азот.

Как уже говорилось, витамины – это низкомолекулярные органические соединения различной химической природы и различного строения, которые синтезируются главным образом растениями, частично – микроорганизмами. В отдельных случаях витамины образуются в животных тканях в результате химического преобразования веществ, которые являются их предшественниками. Такие предшественники называются **провитаминами**.

Для витаминов характерна специфичность строения молекулы. Часто незначительные изменения в их структуре (перемещение двойных связей, замена одних боковых радикалов другими и т.д.) ведут к изменениям в биологической активности. Для отдельных витаминов специфичность проявляется особенно резко, и замена отдельных химических групп в молекуле приводит к появлению свойств антагонистических по отношению к основной молекуле витамина.

Некоторые вещества, которые первоначально относили к витаминам, на самом деле таковыми не являются, поскольку они в достаточных количествах могут синтезироваться в клетках человеческого организма, сейчас их называют "**витаминоподобные вещества**".

Сейчас известно больше 30 витаминов и витаминоподобных соединений. По мере открытия отдельных витаминов они обозначались

буквами латинского алфавита и назывались в зависимости от их биологической роли. Например, витамин Е – токоферол («токос» – деторождение, «феро» – несущий, греческий), витамин А – аксерофтол (ксерофтальмия – глазное заболевание). В дальнейшем пришлось буквенные обозначения расширить, так как выделялись новые индивидуальные вещества близкого, аналогичного или нового биологического характера, поэтому к буквам были присоединены цифровые обозначения. Стали говорить о группах витаминов. Например, витамины группы А, В, Д. Подобные вещества, которые играют одну и ту же биологическую роль, но отличаются витаминной активностью, называются **витамерами**.

В природе также существуют соединения, которые подавляют биологическую активность витаминов. Такие вещества называются **антивитаминами**. Как правило, они имеют похожую на витамины структуру, и конкурируют по действию с самими витаминами.

На данный момент существует несколько классификаций витаминов. Самая наиболее часто употребляемая классификация витаминов связана с их физико-химическими свойствами. Так витамины подразделяют на **жирорастворимые** и **водорастворимые**. С точки зрения химии такая классификация примитивна и не отражает всего многообразия сложного химического строения органических соединений, которые относятся к витаминам. Кроме того, отношение каждого конкретного витамина к воде можно изменить введением соответствующих липофильных или липофобных групп, которые не влияют на его витаминную активность. Например, липофобная аскорбиновая кислота может быть превращена в жирорастворимый препарат этерификацией ее какой-либо высшей жирной кислотой (пальмитиновой, олеиновой, стеариновой). Гидрофобный витамин А при превращении его в фосфорный эфир становится гидрофильным и т.д.

В.Б. Спиричев (2005 г.) предложил новую классификацию витаминов, которая базируется на характере их специфических функций.

По **функциональной классификации** витамины делятся на 3 группы.

В первую, самую большую группу входят витамины, из которых в организме образуются коферменты и простетические группы разных ферментов. К этим витаминам, которые еще называют энзимовитаминами, относятся водорастворимые витамины группы В, а также витамин К, который осуществляет коферментные функции в реакции карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в ряде кальцийсвязывающих белков. С некоторой долей условности к этой группе также относится витамин А, который в форме ретиналя является простетической группой зрительного белка родопсина.



Вторую группу образуют витамины-прогормоны, активная форма которых имеет гормональную функцию. Сюда относится витамин D, активный метаболит которого, 1,25-диоксивиамин D, функционирует как гормон в процессах обмена кальция. Сюда же относят и витамин A, гормональной формой которого является ретиноевая кислота, которая играет важную роль в процессах роста и дифференцирования эпителиальных тканей.

К третьей группе относят витамины-антиоксиданты: аскорбиновую кислоту (витамин C) и витамин E (токоферолы), которые входят в систему антиоксидантной защиты организма. В эту же группу можно включить каротин, ликопин, лютеин и другие каротиноиды, которые независимо от способности превращаться в витамин A, имеют антиоксидантную активность. Также к этой группе относятся витаминоподобные вещества биофлавоноиды.

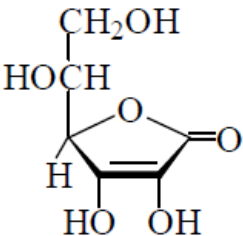
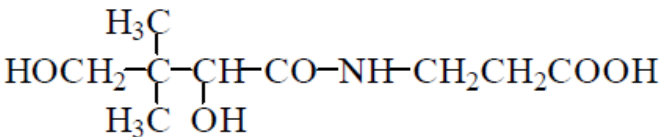
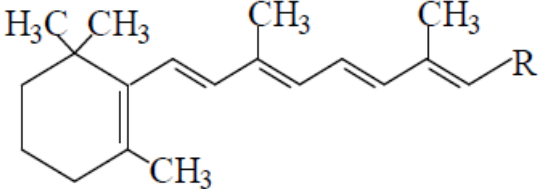
Химическая классификация витаминов основана на классификации органических соединений. Как уже указывалось, по своей химической структуре витамины весьма многообразны. Общим для всех витаминов является наличие гидроксильной или карбонильной группы, которая может превращаться в гидроксильную. Только один витамин - никотинамид - не содержит гидроксильной группы, но она содержится в молекуле кофермента в виде которого никотинамид участвует в обмене веществ.

В связи с большим разнообразием строения витаминов и, соответственно, их химических свойств химические свойства витаминов как правило рассматривают отдельно.

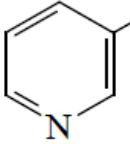
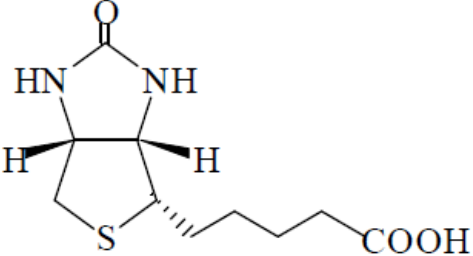
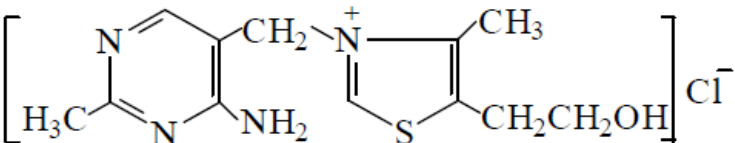
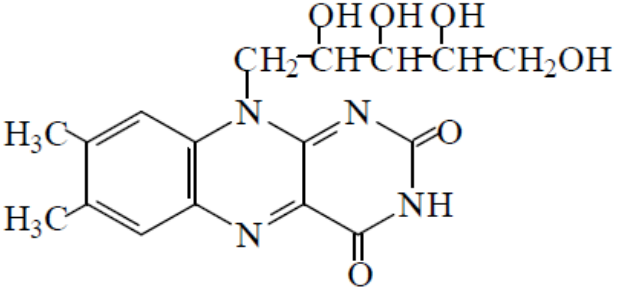
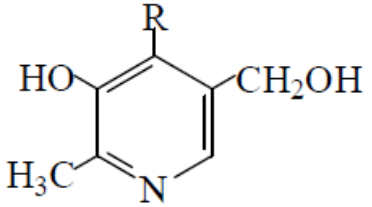
В табл. 1 приведены строение, номенклатура и классификация витаминов.

Таблица 1.1.

## Строение, номенклатура и классификация витаминов

Структурная формула витамина	Тривиальное название	Буквенное обозначение	Растворимость	Биохимическая функция
1	2	3	4	5
<b>Витамины алифатического ряда</b>				
	аскорбиновая кислота	С	вода	антиоксидант
	пантотеновая кислота	В <sub>3</sub>	вода	энзимовитамин
<b>Витамины алициклического ряда</b>				
 <p>R = CH<sub>2</sub>OH R = CHO R = COOH</p>	ретинол	А <sub>1</sub>	жиры	прогормон, энзимовитамин
	ретиаль	А <sub>2</sub>		
	ретиноевая кислота	А <sub>3</sub>		



1	2	3	4	5
 <p>R = OH R = NH<sub>2</sub></p>	<p>никотиновая кислота</p> <hr/> <p>никотинамид</p>	PP	вода	ЭНЗИМОВИТАМИН
	биотин	H	вода	ЭНЗИМОВИТАМИН
	тиамин хлорид (тиамин)	B <sub>1</sub>	вода	ЭНЗИМОВИТАМИН
	рибофлавин	B <sub>2</sub>	вода	ЭНЗИМОВИТАМИН
 <p>R = CH<sub>2</sub>OH R = CHO R = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub></p>	<p>пиридоксин</p> <hr/> <p>пиридоксаль</p> <hr/> <p>пиридоксамин</p>	B <sub>6</sub>	вода	ЭНЗИМОВИТАМИН



## Раздел 1

### Водорастворимые витамины

К группе водорастворимых витаминов относятся аскорбиновая кислота (С), биотин (Н) и группа витаминов с одинаковым символом "В": тиамин (В<sub>1</sub>), рибофлавин (В<sub>2</sub>), ниацин (В<sub>3</sub>), пиридоксин (В<sub>6</sub>), пантотеновая кислота (В<sub>5</sub>), фолатин (В<sub>9</sub>), кобаламин (В<sub>12</sub>). Водорастворимые витамины не способны накапливаться про запас, поэтому они должны поступать в организм систематически.

#### 1.1. Витамин С

Термин витамин С объединяет группу родственных соединений, обладающих биологической (витаминной) активностью **Л-аскорбиновой кислоты**. Важнейшими представителями этой группы являются Л-аскорбиновая (или просто аскорбиновая) кислота и Л-дегидроаскорбиновая (дегидроаскорбиновая) кислота (рис. 1.1.1).



**Рис. 1.1.1.** Взаимопревращения аскорбиновой (I) и дегидроаскорбиновой (II) кислот

Аскорбиновая кислота в химическом отношении представляет собой 2,3-дегидро-Л-треогексано-1,4-лактон. Аскорбиновая кислота не располагает свободной карбоксильной группой, а является лактоном. Ее кислотные свойства определяются высокой склонностью к диссоциации протонов ОН-групп у 3-го и 2-го углеродных атомов. Благодаря наличию двух асимметрических атомов углерода (в положениях 4 и 5), аскорбиновая кислота может существовать в виде четырех оптических изомеров и двух рацематов.

Биологической активностью обладает только природная форма: Л-аскорбиновая кислота. Ее оптический изомер D-аскорбиновая кислота, а также диастереоизомеры L- и D-изоаскорбиновые кислоты биологической

активностью не обладают, в природе не встречаются и были получены только синтетическим путем.

В кристаллическом виде L-аскорбиновая кислота представляет собой белые кристаллы моноклинической системы с температурой плавления 192 °С, хорошо растворимые в воде (22,4 % при 20 °С), хуже — в спирте (4,6 % при 20 °С), практически нерастворимые в эфире, хлороформе, бензоле и других органических растворителях. Водные растворы L-аскорбиновой кислоты вращают плоскость поляризованного света вправо:  $[\alpha]_D^{20} + 23^\circ$ . Спектр поглощения L-аскорбиновой кислоты в водных растворах при кислых значениях рН обнаруживает максимум при 245 нм, который сдвигается в щелочной среде в область 265 нм.

С основаниями щелочных и щелочно-земельных металлов L-аскорбиновая кислота образует хорошо кристаллизующиеся и растворимые в воде еноляты: аскорбинат натрия и аскорбинат кальция.

В водных растворах L-аскорбиновая кислота легко окисляется с образованием L-дегидроаскорбиновой кислоты, которая самопроизвольно гидролизуеться в биологически неактивную 2,3-дикето-L-гулоновую кислоту. Скорость окисления возрастает при повышении температуры, ультрафиолетовом облучении, а также в присутствии солей тяжелых металлов: меди, серебра и других.

L-дегидроаскорбиновая кислота представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 237 -240 °С (разл.) и  $[\alpha]_D^{20} + 55^\circ$ , хорошо растворимые в воде.

Вследствие легкой окисляемости L-аскорбиновая кислота является хорошим восстановителем, донором водорода или его промежуточным переносчиком при многих окислительно-восстановительных реакциях.

Аскорбиновая кислота легко всасывается в тонком кишечнике и выводится из организма преимущественно с мочой. Окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую может происходить как неферментативно, так и с участием ферментных систем.

В растениях, в том числе в овощах и фруктах, присутствует активная аскорбатоксидаза, быстро окисляющая аскорбиновую кислоту при разрушении клеточных структур. В связи с этим необходимым условием максимальной сохранности аскорбиновой кислоты при кулинарной обработке овощей является быстрое их погружение в кипящую воду, инактивирующую аскорбатоксидазу.

В животных тканях окисление аскорбиновой кислоты могут катализировать митохондриальная цитохромоксидаза, медьсодержащий белок церулоплазмин и некоторые неспецифические оксидазы.

Наряду с ферментами, окисляющими аскорбиновую кислоту, в животных и растительных тканях присутствует дегидроаскорбатредуктаза, восстанавливающая дегидроаскорбиновую

кислоту до аскорбиновой с участием восстановленного глутатиона и НАДФ · Н<sub>2</sub>.

Дегидроаскорбиновая кислота легче проникает через клеточные мембраны, чем аскорбиновая кислота, в связи с чем ряд авторов рассматривает ее как транспортную форму аскорбиновой кислоты.

Наряду с дегидроаскорбиновой кислотой в животных и растительных тканях обнаруживается также монодегидроаскорбиновая кислота, являющаяся свободнорадикальной формой полухинонной структуры, образующейся при одноэлектронном окислении L-аскорбиновой кислоты.

Вместе с восстановлением, дегидроаскорбиновая кислота может подвергаться в организме неферментативному гидролитическому расщеплению с образованием 2,3-дикето-L-гулоновой кислоты, лишенной, как уже говорилось, биологической активности. Одним из продуктов дальнейшей дегградации 2,3-дикето-L-гулоновой кислоты является щавелевая кислота. В связи с последним обстоятельством высказывались опасения, что прием чрезмерно высоких доз аскорбиновой кислоты может быть небезопасен, создавая угрозу оксалурии и образования оксалатных камней.

В животных и растительных тканях лишь часть аскорбиновой кислоты находится в свободном состоянии, другая ее часть прочно связана с белками или нуклеиновыми кислотами и становится доступной определению только после гидролиза последних. Эту форму аскорбиновой кислоты называют аскорбигеном.

Метаболические нарушения, возникающие при дефиците витамина С, значительны и многообразны, что указывает на исключительно важную роль аскорбиновой кислоты в обмене веществ.

Не подлежит сомнению, что первичные биохимические функции аскорбиновой кислоты тесно связаны с ее фундаментальным химическим свойством – способностью к быстрым и обратимым окислительно-восстановительным превращениям. что придает ей возможность служить как донором водорода в многочисленных восстановительных реакциях, так и промежуточным переносчиком электронов и протона в различных окислительно-восстановительных процессах. Способность к образованию свободнорадикальной семихинонной формы придает аскорбиновой кислоте возможность активного участия в реакциях свободнорадикального окисления и гидроксилирования.

Одной из важнейших функций аскорбиновой кислоты является ее участие в процессах созревания соединительнотканного белка **коллагена** и **эластина** кровеносных сосудов. Эту функцию аскорбиновая кислота реализует в качестве кофактора ферментной системы, осуществляющей гидроксилирование аминокислотного остатка **пролина** в **оксипролин** при



превращении **проколлагена** в **коллаген**, что имеет важное значение для создания специфической тройной спиральной структуры этого белка.

Аналогичную роль аскорбиновая кислота играет при окислении аминокислотного остатка **лизина** в составе коллагена и эластина в **оксилизин**, что обеспечивает образование поперечных сшивок между волокнами этих белков, стабилизирующих их сетчатую трехмерную структуру.

Наряду с этими реакциями и независимо от них, аскорбиновая кислота стимулирует экспрессию генов, ответственных за синтез коллагена в фибробластах и хондроцитах.

Аскорбиновой кислоте принадлежит важная роль в процессах гидроксилирования стероидных соединений, в частности **холестерина** при его превращении в желчные кислоты. С этим может быть связана отмеченная во многих эпидемиологических исследованиях обратная корреляционная зависимость уровня холестерина в плазме крови от обеспеченности организма исследуемых витамином С.

Имеются указания на зависимость от аскорбиновой кислоты синтеза **глюкокортикоидных гормонов** в коре надпочечников, о чем свидетельствует снижение их ответа на стресс при недостатке витамина С.

Аскорбиновая кислота необходима для нормального образования гидроксилированных производных витамина D: его транспортной формы 25(OH)D в печени и гормональной формы 1,25(OH)<sub>2</sub>D в почках. Именно поэтому хорошая обеспеченность организма витамином С является абсолютно необходимым условием реализации витамином D его антирахитической активности: при дефиците аскорбиновой кислоты даже повышенные дозы витамина D оказываются не эффективны.

Реакциям гидроксилирования с участием аскорбиновой кислоты принадлежит важное место в обмене **нейротрансмиттеров**. Аскорбиновая кислота функционирует в качестве кофактора дофамин-β-гидроксилазы при гидроксилировании **дофамина** в **норадреналин** в хромоаффинных гранулах мозгового слоя надпочечников и адренэргических синапсов. Промежуточно образующаяся при этом монодегидроаскорбиновая кислота регенерируется в аскорбиновую с участием цитохрома B561. Значение аскорбиновой кислоты для этого процесса подчеркивается ее высокой концентрацией в хромоаффинных гранулах.

В обмене **тирозина** аскорбиновая кислота защищает фермент п-оксифенилпируватгидроксилазу от торможения ее субстратом. При дефиците витамина С усиливается превращение тирозина в гомогентизиновую, п-оксифенилпропионовую и п-оксифенилмолочную кислоты. Защитный эффект аскорбиновой кислоты находит клиническое применение при **тирозинемии** у недоношенных, когда даже небольших доз витамина С оказывается достаточно для нормализации обмена этой

аминокислоты.

Другой аминокислотой, обмен которой зависит от витамина С, является **триптофан**: его гидроксирование в 5-окситриптофан, являющийся предшественником **серотонина**, нуждается в **дегидроаскорбиновой кислоте**.

Аскорбиновая кислота оказывается также необходимой для осуществления функции таких гормонов, как **гастрин**, а также коршкотропин- и тиреотропин-рилизингфакторы. предварительным условием проявления биологической активности которых является их С-концевое **амидирование**. Катализирующий это прекращение фермент пептидилглицирин амидирующая монооксигеназа нуждается, наряду с ионами меди и молекулярным кислородом, также в L-аскорбиновой кислоте.

Кроме того установлено, что добавление аскорбиновой кислоты к культуре мышечной ткани крысы приводит к трехкратному увеличению экспрессии М-РНК **ацетилхолинового рецептора**.

Аскорбиновая кислота является также кофактором в многочисленных реакциях **микросомального гидроксирования**, катализируемых пероксидазами со смешанными функциями, чем определяется ее важная роль в процессах обезвреживания и выведения из организма токсических метаболитов, ксенобиотиков и лекарственных препаратов. Предполагается, что аскорбиновая кислота стимулирует синтез участвующего в этих реакциях цитохрома Р450 и защищает его от инактивации свободнорадикальными формами кислорода.

Аскорбиновая кислота блокирует образование **канцерогенных нитрозаминов** из нитритов (нитратов) и аминов в просвете кишечника, с чем может быть связана наблюдаемая во многих эпидемиологических исследованиях обратная связь между потреблением богатых аскорбиновой кислотой овощей и фруктов и частотой (риском) рака желудка.

Аскорбиновая кислота обладает выраженными **антиоксидантными** свойствами в водной фазе и участвует в регенерации  $\alpha$ -токоферола при свободнорадикальном окислении последнего активными формами кислорода в биологических мембранах, оказывая таким образом **сберегающее токоферол** действие.

Важное значение аскорбиновой кислоты для системы **клеточного иммунитета** скорее всего, связано с ее антиоксидантными свойствами и защитой мембраны фагоцитов от разрушающего действия продуцируемых этими клетками свободнорадикальных форм кислорода и хлора. Концентрация аскорбиновой кислоты в полиморфноядерных лейкоцитах на порядок выше, чем в окружающей плазме, а ее недостаток существенно снижает их хемотаксическую и фагоцитирующую активность. С этим

связывают повышенную склонность к простудным заболеваниям, гингивитам и перидотитам при субклиническом дефиците витамина С.

Исключительно высокая концентрация аскорбиновой кислоты в легочном сурфактанте, превышающая ее содержание в плазме крови на 2-3 порядка, также является выражением ее важной роли в поддержании барьерных функций легочной ткани.

Наряду с перечисленными функциями, аскорбиновая кислота принимает участие в синтезе и обмене целого ряда других биологически активных соединений, необходимых для поддержания обменных процессов и жизнедеятельности организма.

Аскорбиновая кислота совместно с лизином и метионином участвует в биосинтезе **карнитина**, осуществляющего транспорт жирных кислот из цитозоля в митохондрии, где происходит их окисление, сопряженное с аккумуляцией освобождающейся энергии в форме АТФ. Недостаток аскорбиновой кислоты уже на ранних стадиях ее дефицита ведет к обеднению мышц карнитином и снижению продукции АТФ, что является причиной повышенной усталости, характерной для недостаточности витамина С.

Аскорбиновая кислота принимает также участие в превращении фолиевой кислоты в ее активную коферментную форму **тетрагидрофолат**.

Аскорбиновая кислота ослабляет влияние **фитатов** и других лигандов, связывающих железо и затрудняющих его всасывание в кишечнике. Одновременно она восстанавливает **трехвалентное железо** в **двухвалентное**, которое значительно легче всасывается в кишечнике и связывается ферритином.

Описано множество других эффектов аскорбиновой кислоты, однако вопрос об их конкретном механизме, специфичности участия в них аскорбиновой кислоты и их истинной роли в физиологических условиях окончательно не решен. Очевидно, что аскорбиновая кислота играет фундаментальную биохимическую и физиологическую роль, способствуя нормальному развитию соединительной ткани, процессов регенерации и заживления, устойчивости к различным видам стресса, обеспечению нормального иммунологического статуса организма и поддержанию процессов кроветворения.

Недостаточность витамина С на ранних стадиях проявляется общей усталостью, слабостью, апатией, снижением аппетита, устойчивости к инфекционным заболеваниям, повышенной проницаемостью и ломкостью кровеносных капилляров, что находит свое выражение в отечности, болезненности и кровоточивости десен, появлении на коже множественных точечных кровоизлияний. Наблюдается также сухость кожи и фолликулярный гиперкератоз, отличающийся от гиперкератоза

при дефиците витамина А геморрагическим характером фолликул.

В далеко зашедших случаях **цинги** (скорбута) нарастают явления гингивита (изъязвление десен, расшатывание и выпадение зубов), некротический процесс распространяется на область зева, челюстные кости и пищевод, развиваются множественные кровоизлияния в толщу мышц, суставы, костный мозг, внутренние органы, субпериостальные кровоизлияния в костях, нарушается гемопоэз, появляется анемия, одышка, сердечная слабость.

В основе большинства этих нарушений лежит дезорганизация мезенхимальной ткани, обусловленная дефектом зависящего от витамина С биосинтеза основного белка соединительной ткани — коллагена.

Главнейшей причиной дефицита витамина С у человека является его недостаточное поступление с пищей. Основным источником этого витамина служат овощи и фрукты, потребление которых не всегда бывает достаточным, особенно в зимний и весенний периоды года. Кроме того, в силу нестойкости аскорбиновой кислоты ее содержание в продуктах питания быстро снижается при их хранении и кулинарной обработке. Особенно велики потери витамина С при нерациональной обработке овощей и фруктов: длительном выдерживании их в холодной или теплой воде, несоблюдении оптимальных сроков варки различных овощей, длительном кипячении и нагревании, варке овощей в открытой посуде в присутствии солей железа и меди, ускоряющих окисление аскорбиновой кислоты. Все эти факторы являются причиной высокой частоты гиповитаминоза С, затрагивающего в зимне-весенний период значительные массы населения.

Необходимыми мероприятиями по профилактике недостаточности аскорбиновой кислоты, наряду с обогащением рациона овощами и фруктами (зимой – квашеной капустой, являющейся неплохим источником аскорбиновой кислоты), является добавление аскорбиновой кислоты в первые и третьи блюда в детских, лечебных учреждениях и на предприятиях общественного питания, включение в рацион продуктов, в частности соков и напитков, дополнительно обогащенных этим витамином, или регулярный прием препаратов витамина С и содержащих его поливитаминных или витаминно-минеральных комплексов.

Точное количество - потребность человека в витамине С определить довольно трудно. Для предотвращения цинги обычно достаточно ежедневного потребления 10-20 мг аскорбиновой кислоты. Рекомендуются нормы потребления этого витамина, принятые в России в 1991 г. и обеспечивающие оптимальное состояние зависящих от него физиологических функций, составляют для детей первых 3-х лет жизни — 30-45 мг, дошкольников — 50-60 мг, подростков 11-17 лет — 70 мг, взрослых мужчин (в зависимости от энерготрат) — 70-100 мг, женщин —

70-80 мг, во время беременности — 90-100 мг и при кормлении грудью — 110-120 мг в сутки (приложение V, табл. 2-4). Потребность в аскорбиновой кислоте возрастает при курении (на 50 %), интенсивном физическом труде, нервно-эмоциональном стрессе, в условиях холодного климата. Верхний безопасный предел потребления аскорбиновой кислоты, установленный пищевыми нормами США (Dietary Reference Intakes, US, 2000), составляет 2000 мг (2,0 г) в сутки. Более высокие дозы могут вызывать расстройство кишечника.

Как уже было отмечено выше, основным источником аскорбиновой кислоты являются фрукты и овощи. Особенно много аскорбиновой кислоты содержится в плодах шиповника (до 650 мг/100 г), черной смородине (200 мг/100 г), перце (150-250 мг/100 г), стручковом горохе (25 мг/100 г), облепихе (50-200 мг/100 г), зеленом луке (60 мг/100 г), садовой землянике (25-100 мг/100 г). Содержание аскорбиновой кислоты в лимонах составляет 40-65 мг/100 г, апельсинах — 30-70 мг/100 г, в яблоках (в зависимости от сорта) — 10-20 мг/100 г. Достаточно много аскорбиновой кислоты в белокочанной капусте (45-60 мг/100 г), в том числе в квашеной (10-20 мг/100 г). Картофель содержит умеренные количества аскорбиновой кислоты (10-20 мг/100 г — в свежем и 10-14 мг/100 г — в жареном или отварном). Молоко и молочные продукты содержат крайне низкие количества аскорбиновой кислоты (0,5-2,0 мг/100 г), за исключением кумыса, содержащего 9-25 мг аскорбиновой кислоты в 100 мл. Аскорбиновая кислота практически отсутствует в пищевых жирах, (лаковых и мясных продуктах, за исключением печени, в которой содержание аскорбиновой кислоты составляет 20-30 мг/100 г).

Основными показателями обеспеченности человека витамином С являются концентрация аскорбиновой кислоты в плазме крови (в норме 0,7-1,2 мг/100 мл) и лейкоцитах (20-30 мг/100 г), суточное выведение аскорбиновой кислоты с мочой натошак (0,7-1,0 мг).

Содержание аскорбиновой кислоты в биологических объектах, в том числе в плазме или сыворотке крови, определяют методом визуального титрования, основанном на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать окрашенный в розовый цвет 2,6-дихлорфенолиндофенол, который при этом переходит в бесцветную лепкоформу.

Дегидроаскорбиновую кислоту определяют колориметрически в виде окрашенного оазона с 2,4-динитрофенилгидразином. Таким же способом может быть определена и аскорбиновая кислота после ее предварительного окисления в дегидроаскорбиновую.

Препараты аскорбиновой кислоты широко используют для профилактики гиповитаминоза С и цинги, в том числе для дополнительной витаминизации продуктов питания (молока, соков) и пищи. Комбинированные препараты аскорбиновой кислоты и железа

являются одним из наиболее надежных средств профилактики и лечения железодефицитных и постгеморрагических гипохромных анемий.

Учитывая стимулирующее действие аскорбиновой кислоты на процессы регенерации, особенно заживление ран, срастание костных переломов, при операциях на желудочно-кишечном тракте, ожоговой и других травмах, рекомендуется широко назначать этот витамин хирургическим больным в период, предшествующий операции и после нее.

## 1.2. Витамин В<sub>1</sub> (тиамин)

Тиамин (витамин В<sub>1</sub>) является одним из важнейших водорастворимых витаминов. Это 4-метил-5β-оксиэтил-N-(2'-метил-4'-амино-5'-метилпиримидил)-тиазолий – соединение, состоящее из пиримидинового и тиаэолового колец, соединенных между собой метиленовым мостиком (рис. 1.2.1).

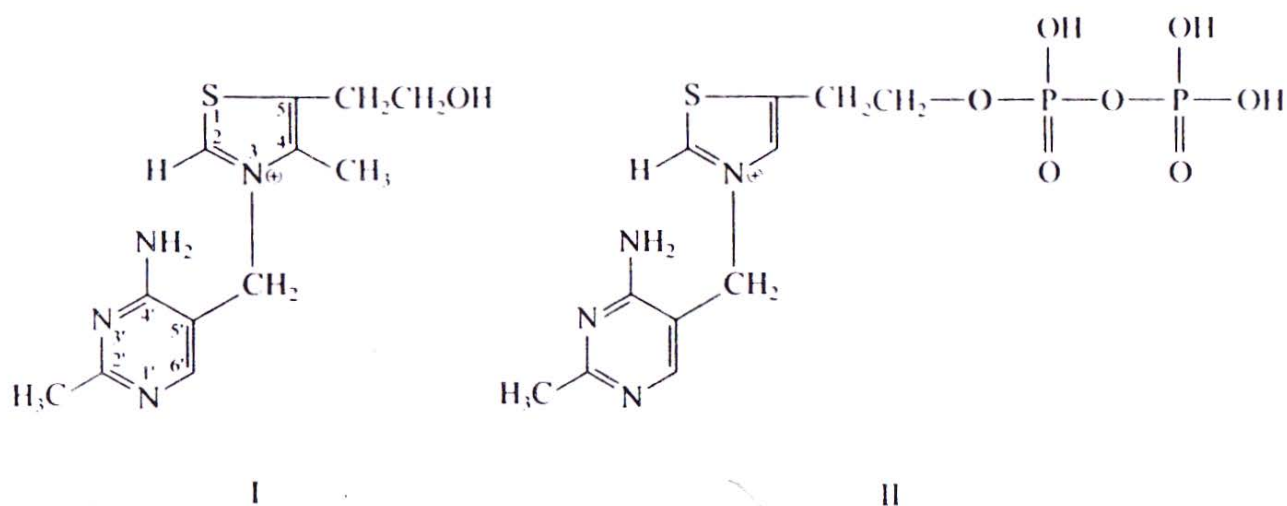


Рис. 1.2.1. Структура тиамин (I) и тиаминдифосфата (II)

Тиамин присутствует в живых организмах в свободной форме и в виде фосфорных эфиров: **тиаминмонофосфата (ТМФ)**, **тиаминдифосфата (ТДФ)** и **тиаминтрифосфата (ТТФ)**. Основной формой, на долю которой в различных органах и тканях человека приходится 60-80 % общего содержания тиамин, является ТДФ, синтезируемый в тканях из тиамин и АТФ при участии фермента тиаминкиназы.

Биологическая роль тиамин обусловлена функциями образующегося из него ТДФ (кокарбоксилазы), который является коферментом важнейших ферментов углеводного обмена: **пируватдегидрогеназы**, **α-кетоглутаратдегидрогеназы**, **дегидрогеназы кетокислот с разветвленной боковой цепью** и **транскетолазы**. У

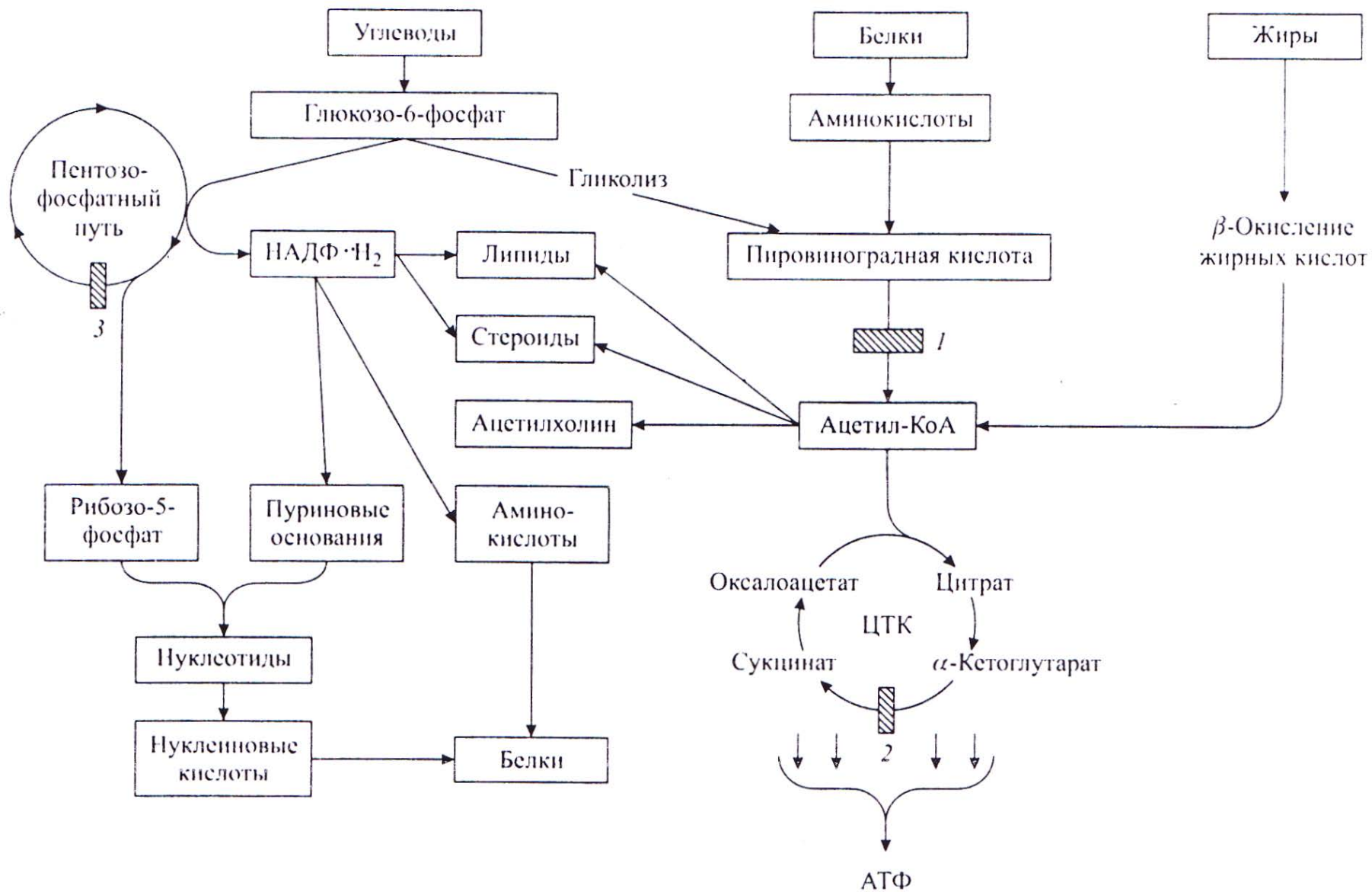
растений и микроорганизмов ТДФ участвует в катализе реакций неокислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетокислот и ряда других превращений (рис. 1.2.2).

ТДФ-зависимая **пируватдегидрогеназа** принимает участие в окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты с образованием **ацетилкоэнзима А**. В результате этого превращения пировиноградная кислота, образующаяся при гликолитическом расщеплении глюкозы, включается в цикл трикарбоновых кислот, где окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Общее количество энергии, получаемой за счет окисления пировиноградной кислоты в этом цикле, почти в 4 раза превосходит энергию, освобождаемую в предшествующих реакциях гликолиза. Таким образом, метаболическая роль окислительного декарбоксилирования пирувата состоит в том, чтобы обеспечить возможность полного окисления углеводов и утилизации заключенной в них энергии. Кроме того, образующийся в ходе этого ферментативного процесса **ацетил-КоА** служит донором остатка уксусной кислоты («активного ацетата») для синтеза важнейших биохимических соединений: жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов и желчных кислот, ацетилхолина.

Другой ТДФ-зависимый фермент —  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа участвует в окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с образованием из нее янтарной кислоты. Это превращение является важным этапом цикла трикарбоновых кислот, в котором окисляются продукты расщепления всех трех основных групп пищевых веществ: углеводов, белков и жиров.

Кроме того ТДФ принимает участие в окислительном декарбоксилировании кетокислот с разветвленным углеродным скелетом:  $\alpha$ -кетоизовалериановой,  $\alpha$ -кетометилвалериановой и  $\alpha$ -кетоизокапроновой, являющихся продуктами дезаминирования валина, изолейцина и лейцина. Эта реакция играет важную роль в процессах катаболизма белков, обеспечивая окисление и утилизацию перечисленных разветвленных аминокислот.

Четвертый из ферментов, в состав которого входит ТДФ, — **транскетолаза**, занимает ключевое положение в пентозофосфатном пути окисления углеводов (пентозном цикле), являющемся основным источником восстановленного  $\text{НАД}^*\text{Ф H}_2$  и рибозо-5-фосфата, из которых первый используется как донор водорода в многочисленных восстановительных биосинтетических процессах, а второй входит в состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот.



**Рис. 1.2.2.** Роль реакций, катализируемых ГДФ-зависимыми ферментами в обмене веществ



ТДФ, входя в состав активного центра перечисленных ферментов, принимает непосредственное участие в механизме ферментативного катализа, в основе которого лежит способность молекулы тиамин диссоциировать с отщеплением протона при втором углеродном атоме тиазолового кольца, в результате чего тиамин приобретает структуру высокоактивного биполярного иона, непосредственно взаимодействующего с молекулой подвергнутого превращению субстрата.

Помимо коферментных функций, выполняемых витамином В<sub>1</sub> в форме ТДФ в составе четырех упомянутых выше ферментов, этому витамину, по-видимому, принадлежит и какая-то иная роль, осуществляемая им в нервной ткани в виде **тиаминтрифосфата (ТТФ)**. Об этом свидетельствует существование редкого врожденного заболевания **подострой некротизирующей энцефаломиелопатии**, или **болезни Лея**, для которой характерно наличие неврологических проявлений дефицита витамина В<sub>1</sub> при нормальной активности ТДФ-зависимых ферментов, но резко сниженном содержании ТТФ в тканях мозга. Полагают, что ТТФ может играть важную роль в транспорте ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> через мембрану нервных волокон в процессе проведения нервного импульса.

В связи с важной ролью витамина В<sub>1</sub> в процессах энергообразования рекомендуемая норма его потребления рассчитывается с учетом энерготрат и составляет 0,6 мг на 1000 ккал суточного рациона, или от 1,2 до 2,5 мг в сутки, в зависимости от энерготрат (приложение V, табл. 2-4).

Недостаток тиамин в организме ведет к нарушению окисления углеводов, торможению зависящих от ТДФ процессов энергетического и пластического обеспечения жизненных функций, накоплению в крови и тканях недоокисленных продуктов обмена веществ, что, в свою очередь, приводит к патофизиологическим и патоморфологическим изменениям, создающим картину В<sub>1</sub>-авитаминоза, одной из форм которого является **бери-бери**.

Наиболее значительные патологические изменения при недостаточности тиамин развиваются в **пищеварительной, нервной и сердечно-сосудистой** системах. Характерным проявлением В<sub>1</sub>-авитаминоза являются также общее истощение организма, потеря веса, кахексия. Нарушения со стороны **желудочно-кишечного тракта** относятся к числу наиболее ранних проявлений недостаточности витамина В<sub>1</sub>. Они выражаются в потере аппетита, атонии желудочно-кишечного тракта, снижении желудочной секреции, ахлоргидрии, диарее, рвотах.

Нарушения со стороны нервной системы выражаются в головных болях, раздражительности, ослаблении памяти, расстройствах периферической чувствительности, утрате мышечного тонуса, парестезиях, периферических полиневритах, утрате коленного и лодыжечного рефлексов, параличах и атрофии мышц конечностей, судорогах. Нарушения, охватывающие головной мозг и черепно-мозговые нервы, создают энцефалопатический синдром Вернике (у хронических алкоголиков), характеризующийся дискоординацией движения, офтальмоплегией, спутанностью сознания. Гистопатологически при глубокой недостаточности витамина В<sub>1</sub> обнаруживаются дегенеративные изменения в дистальных частях периферических нейронов с распадом миелинового вещества и вакуолизацией Шванновских клеток. Патоморфологические изменения в сером веществе головного мозга, локализованные преимущественно вокруг желудочков, представляют собой очаговые геморрагии с пролиферацией кровеносных сосудов и клеток глии.

Патологические изменения в сердечно-сосудистой системе проявляются такими симптомами, как сердцебиение, тахикардия, боли в области сердца, слабость, дилатация сердца с преимущественным расширением правых отделов. В далеко зашедших случаях развивается сердечная недостаточность с цианозом, застойными явлениями в печени и отеками. Выраженность этих симптомов зависит от степени недостаточности тиамин.

Недостаток витамина В<sub>1</sub> может возникнуть при одностороннем питании очищенным рисом, продуктами из муки высокого помола, бедной тиамин. У пожилых людей недостаток витамина В<sub>1</sub>, как и ряда других витаминов, может быть обусловлен общим снижением количества потребляемой пищи и уменьшением всасывания витаминов в кишечнике. Сходные причины лежат в основе недостаточности витамина В<sub>1</sub> у хронических алкоголиков. Одной из важных причин недостатка тиамин является нарушение всасывания витаминов при хронических заболеваниях кишечника: хронических энтеритах, энтероколитах и т. п. В этих случаях недостаточность тиамин, как правило, сочетается с дефицитом других витаминов (полигиповитаминозом). Недостаток витамина В<sub>1</sub> может быть также вызван приемом в пищу продуктов, содержащих тиаминазу, разрушающую тиамин (например, сырой рыбы), или размножением в желудочно-кишечном тракте патологической микрофлоры, продуцирующей этот фермент (*Bacillus thiaminolyticus*, *Bacillus aneurinolyticus*).

Наряду с недостаточностью витамина В<sub>1</sub> алиментарного происхождения, известны заболевания, обусловленные врожденными, генетически обусловленными дефектами обмена тиаминтрифосфата и ТДФ-зависимых ферментов. Эти заболевания, обнаруживающие сходство с отдельными клиническими проявлениями В<sub>1</sub>-авитаминоза, развиваются при достаточном поступлении тиаминтрифосфата в организм. К их числу относятся уже упомянутая подострая некротизирующая энцефаломиелопатия, или болезнь Лея, при которой нарушено образование в мозговой ткани тиаминтрифосфата; перемежающаяся атаксия, обусловленная врожденным дефектом пируватдегидрогеназного комплекса; тиаминзависимая мегалобластическая анемия и тиаминзависимая форма болезни «моча с запахом кленового сиропа», связанная с дефектом окислительного декарбоксилирования разветвленных α-кетокислот.

Для оценки обеспеченности организма человека тиамином широко используют определение его суточной экскреции с мочой. Этот показатель хорошо отражает поступление витамина В<sub>1</sub> с пищей и при достаточном его потреблении обычно превышает 100 мкг в сутки. При невозможности сбора суточной мочи можно определять содержание тиаминтрифосфата в разовой порции мочи натощак. В этом случае экскрецию тиаминтрифосфата относят к экскреции креатинина. При достаточном поступлении витамина В<sub>1</sub> с пищей этот показатель не должен быть ниже 65 мкг/г креатинина. Содержание тиаминтрифосфата в моче обычно определяют флюориметрически после окисления тиаминтрифосфата в тиохром, обладающий интенсивной желтой флюоресценцией.

Для оценки насыщенности организма тиамином исследуют его содержание в цельной крови или эритроцитах. При нормальной обеспеченности общее содержание тиаминтрифосфата в крови составляет 6-12 мкг/100 мл, снижаясь при дефиците витамина В<sub>1</sub> до 2-4 мкг/100 мл. Тиамин присутствует преимущественно в клеточных элементах крови, тогда как концентрация его в плазме невелика. Содержание общего тиаминтрифосфата в крови определяют также флюориметрически после предварительного расщепления ТДФ с помощью фосфатаз, источником которых может служить ферментный препарат из *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*. В пробах, не подвергнутых обработке фосфатазами, определяют содержание свободного тиаминтрифосфата, а разница между общим и свободным тиамином дает содержание его фосфорилированных форм, главным образом, ТДФ.

Содержание ТДФ в крови и тканях определяют также ферментативно с апоферментом дрожжевой пируватдекарбоксилазы.

Специфическим функциональным тестом на обеспеченность витамином В<sub>1</sub> является определение активности в гемолизате крови ТДФ-зависимого фермента транскетолазы, которая значительно снижается уже на ранних стадиях недостаточности тиамин. Снижение активности транскетолазы при недостаточности витамина В<sub>1</sub> обусловлено нехваткой ее кофермента — ТДФ. Добавление последнего к гемолизату в этих условиях активирует транскетолазу. Степень активации, или ТДФ-эффект, служит мерой недостаточности тиамин. В норме эта величина не превышает 15 %, составляя при гиповитаминозе В<sub>1</sub> 15-25 % и увеличиваясь при клинически выраженном В<sub>1</sub>-авитаминозе до 30 % и более.

Другим функциональным тестом обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub> является определение содержания в крови и моче пировиноградной кислоты количество которого возрастает при дефиците тиамин вследствие блокады зависящей от ТДФ окислительного декарбоксилирования лон кетокиелоты. Однако этот показатель менее специфичен, т. к. пировиноградная кислота может накапливаться и в силу других причин, в частности, как следствие тканевой гипоксии.

Из продуктов питания наиболее богаты витамином В<sub>1</sub> хлеб и хлебобулочные изделия из муки грубого помола или витаминизированной муки (0,20- 0.40 мг/100 г), крупы, особенно гречневая, овсяная, пшено (0,40-0,50 мг/100 г), зернобобовые (0,50-0,95 мг/100 г), печень (0,25-0.30 мг/100 г), нежирная свинина (0,5-0,8 мг/100 г). Особенно богаты витамином В<sub>1</sub> пивные дрожжи (5 мг/100 г) и пшеничные зародыши. Молоко и молочные продукты, также как большинство овощей, бедны тиамин. Обычная тепловая обработка мало влияет на содержание тиамин в продуктах питания, но нагревание в щелочной среде ведет к значительным потерям витамина. Большие количества тиамин теряются с отрубями при приготовлении муки высших сортов. Для восстановления этих потерь проводится обогащение муки путем добавления в нее тиамин вместе с рибофлавином, витамином В<sub>1</sub>, никотиновой кислотой, фолиевой кислотой и некоторыми минеральными веществами (кальций, железо).

Известно большое количество **антивитамин** В<sub>1</sub>, из которых наиболее активны **окситиамин** и **пиригиамин**. Антагонистом тиамин является антибиотик **ампрол**, используемый в птицеводстве для подавления желудочно-кишечных инфекций у кур.

### 1.3. Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин)

Витамин В<sub>2</sub>, или рибофлавин (7,8-диметил-10-N-(1-D-рибитил) изоаллоксазин), представляет собой производное изоаллоксазина, связанного с пятиатомным спиртом рибитолом (рис. 1.3.1).

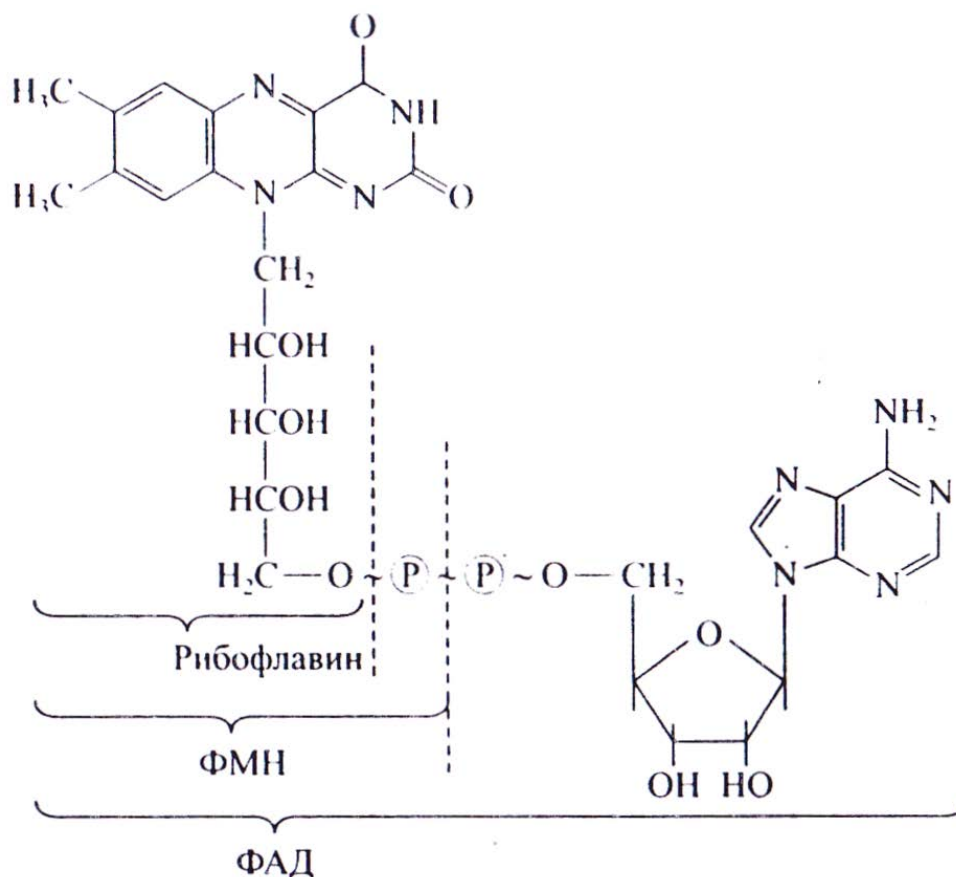


Рис 1.3.1. Витамин В<sub>2</sub> и его коферментные формы

Рибофлавин кристаллизуется в виде желто-оранжевых игл с  $T_{пл} = 282$  °С (с разложением), обладает интенсивной желто-зеленой флюоресценцией с максимумом в области 550-565 нм, плохо растворим в воде и спирте, нерастворим в ацетоне, эфире, хлороформе, бензоле. Под действием света рибофлавин расщепляется с образованием люмифлавина в щелочной среде и люмихрома в нейтральной или кислой.

Биологическая роль рибофлавина определяется прежде всего его участием в построении **флавиномононуклеотида (ФМН)** и **флавинадениндинуклеотида (ФАД)**, являющихся простетическими группами большого числа окислительно-восстановительных ферментов,

так называемых **флавиновых оксидоредуктаз**, или **флавопротеидов**.

Роль флавиновых ферментов в обмене веществ исключительно велика и многообразна. Они принимают участие в окислении жирных кислот до ацетил-КоА, в окислительном декарбоксилировании пировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаповой кислот (**липоатдегидрогеназа**), окислении янтарной кислоты в цикле Кребса (**сукцинатдегидрогеназа**), в окислительном фосфорилировании — на стадии переноса электронов и протонов от никотинамидных коферментов к цитохрому С (**НАДН-цитохром С-редуктаза**), играя тем самым ключевую роль в процессах **биологического окисления и энергообразования**.

Наряду с этим, ФАД входит в состав **моноаминоксидазы** — основного фермента катаболизма биогенных аминов и, прежде всего, катехоламинов; **ксантиноксидазы**, катализирующей окисление пуринов до мочевой кислоты; **альдегидоксидазы**, окисляющей высокотоксичные альдегиды; **оксидазы D-аминокислот**, расщепляющей в организме чужеродные D-изомеры аминокислот, образующиеся в результате жизнедеятельности бактерий. К ФАД-зависимым ферментам относятся также **оксидаза пиридоксинфосфата и дигидрофолатредуктаза**, участвующие в синтезе коферментных форм витамина В<sub>1</sub>, (пиридоксальфосфата) и фолиевой кислоты.

Наконец, ФАД является протетической группой **глутатионредуктазы и метгемоглобинредуктазы**, поддерживающих в восстановленном состоянии глутатион и гемоглобин.

Во всех этих ферментах ФАД или ФМН функционируют как промежуточные переносчики электронов и протонов, отщепляемых от окисляемого субстрата. Флавопротеиды одного типа передают эти электроны и протоны никотинамидным коферментам (оксидазы жирных кислот, липоатдегидрогеназа) или цитохрому С (НАДН-цитохром С-редуктаза), обеспечивая тем самым поток электронов по пути окислительного фосфорилирования с ресинтезом АТФ.

Флавопротеиды другого типа переносят электроны и кислород непосредственно на воду с образованием перекиси водорода (оксидаза D-аминокислот, моноаминоксидаза, пиридоксинфосфатоксидаза), которая разлагается затем каталазой. В этом случае окисление субстрата не сопровождается ресинтезом АТФ, и значение реакции определяется детоксикацией окисляемого вещества или важностью образующегося продукта.

Молекулярный механизм осуществляемого ФМН или ФАД промежуточного переноса электронов и протонов заключается в их

обратимом присоединении по системе двух сопряженных атомов азота: N-1 и N-10 изоаллоксазинового кольца рибофлавина.

Наряду с участием в указанных выше механизмах ферментативного катализа, рибофлавин входит также в состав зрительного пурпура, защищая сетчатку от избыточного воздействия ультрафиолетового облучения.

Рибофлавин всасывается в тонком кишечнике и экскретируется главным образом с мочой. Значительная часть рибофлавина выделяется в неизменном виде. Всасывание и утилизация рибофлавина нарушаются при язвенной болезни желудка и других желудочно-кишечных заболеваниях, циррозе печени.

Образование коферментных форм рибофлавина в организме происходит с участием АТФ и двух специальных ферментов: флавокиназы, катализирующей синтез ФМН из рибофлавина и АТФ, и флавиннуклеотидфосфорилазы, осуществляющей синтез ФАД из ФМН и АТФ.

Рекомендуемая норма потребления рибофлавина взрослым человеком составляет 1,5-2,4 мг в сутки.

Внешними проявлениями недостаточности витамина В<sub>2</sub> являются поражения слизистой оболочки губ с вертикальными трещинами и десквамацией эпителия (хейлоз), ангулярный стоматит, себорейный дерматит на носогубной складке, крыльях носа, ушах, веках. Часто развиваются также изменения со стороны органа зрения: светобоязнь, васкуляризация роговой оболочки, конъюнктивит, кератит и в некоторых случаях — катаракта. В ряде случаев при арибофлавинозе имеет место анемия и нервные расстройства, проявляющиеся в мышечной слабости, гиперкинезах, жгучих болях в ногах. Отмечается плохое заживление ран.

Главные причины недостатка рибофлавина у человека: недостаточное потребление молока и молочных продуктов, как одного из основных источников этого витамина, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, прием медикаментов, являющихся антагонистами рибофлавина (акрихин, аминазин и их производные). Утилизация рибофлавина в организме нарушается также при недостаточном потреблении белка.

Как уже упоминалось, ФАД-зависимые ферменты играют важную роль в образовании в организме активных (коферментных) форм витаминов В<sub>6</sub> и фолиевой кислоты. Поэтому недостаток витамина В<sub>2</sub> может нарушать не только зависящие от него процессы обмена веществ, но и приводить к нарушению функций двух вышеуказанных витаминов

даже при их достаточном поступлении.

Аналогичным образом витамин В<sub>2</sub> вместе с аскорбиновой кислотой принимает участие в реакциях микросомального гидроксилирования и детоксикации в организме чужеродных веществ, а также в образовании активных гидроксилированных форм витамина D). В связи с последним обстоятельством недостаток рибофлавина может способствовать развитию рахита.

Об обеспеченности организма рибофлавином судят по его экскреции с мочой, которая при достаточном его поступлении с пищей составляет 120-400 мкг в сутки, а также по концентрации рибофлавина в сыворотке крови (норма 6-20 нг/мл), содержанию ФМН и ФАД в эритроцитах и лейкоцитах. Снижение этих показателей свидетельствует о недостаточности рибофлавина.

Важным функциональным тестом является определение ФАД-эффекта, степени активации ФАД-зависимого фермента глутатионредуктазы в гемолизате эритроцитов при добавлении *in vitro* избыточного количества ФАД. В норме коэффициент активации не превышает 1,20-1,25, тогда как при дефиците рибофлавина он возрастает до 1,5 и более.

Для определения суммарного содержания рибофлавина и его коферментных форм в биологических объектах используют микробиологические методы, основанные на измерении скорости размножения *Lactobacillus casei* или продукции молочной кислоты этим микроорганизмом. Метод позволяет определять 0,02 мкг рибофлавина в 1 мл. Еще более чувствительный метод, регистрирующий 0,0001 мкг рибофлавина в 1 мл, основан на использовании в качестве тест-организма *Leuconostoc mesenteroides*.

В относительно концентрированных чистых растворах содержание рибофлавина, ФМН и ФАД можно определить спектрофотометрически по поглощению света при 445, 374 и 268 нм или флюориметрически по интенсивности свечения рибофлавина или продукта его фотолиза люмифлавина. Эти методы в 100 раз чувствительнее спектрофотометрических и позволяют определить 0,001 мкг рибофлавина в 1 мл. Флюориметрические методы широко используют и для определения рибофлавина, ФАД, ФМН в жидкостях (крови, моче) и тканях организма. Из них наибольшей специфичностью, чувствительностью и точностью отличается метод, основанный на гашении флюоресценции рибофлавина специфическим рибофлавинсвязывающим белком куриного яйца.



Для отделения рибофлавина от мешающих его определению соединений используют методы ВЖХ.

Наилучшими источниками рибофлавина являются яйца (0,40 мг/100 г), молоко (0,13-0,17 мг/100 мл) и молочные продукты, особенно творог (0,30-0,40 мг/100 г), мясо (0,10-0,18 мг/100 г), печень и почки (1,6-2,2 мг/100 г), гречневая крупа (0,20 мг/100 г), дрожжи (2,0-4,0 мг/100 г). Очищенный рис, макаронные изделия и белый хлеб бедны рибофлавином, также как большинство фруктов и овощей (0,02-0,07 мг/100 г).

Женское молоко является сравнительно бедным источником рибофлагина. Ребенок до года нуждается в среднем в 0,4-0,6 мг рибофлавина в сутки, в то время как с 1 л молока матери он получает в среднем лишь 0,2-0,4 мг этого витамина. Ежедневное прикармливание 6-месячного ребенка творогом (50 100 г) обеспечивает его дополнительно 0,4-0,5 мг рибофлавина.

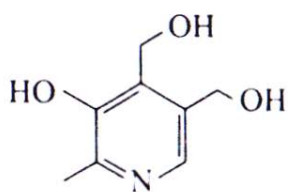
Потери рибофлавина при тепловой кулинарной обработке пищевых продуктов незначительны, если последние защищены от воздействия света. Рибофлавин хорошо сохраняется при пастеризации, стерилизации и замораживании пищевых продуктов в закрытой посуде.

Препараты рибофлавина и ФМН применяют для профилактики и лечения арибофлавиноза (недостаточности витамина В<sub>2</sub>), при кожных заболеваниях, вяло заживающих ранах, заболеваниях глаз, нарушениях функции желудочно-кишечного тракта, диабете, анемиях, циррозе печени.

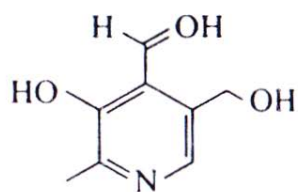
Инъекции чрезмерно высоких доз рибофлавина из-за его плохой растворимости могут приводить к закупорке почечных канальцев.

#### 1.4. Витамин В<sub>6</sub>

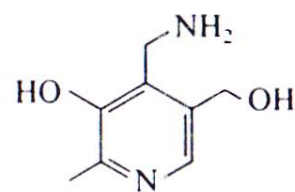
Термином витамин В<sub>6</sub> обозначают группу родственных соединений, производных 3-окси-2-метилпиридина, обладающих биологической активностью пиридоксина. Важнейшие представители этой группы: **пиридоксин**, **пиридоксаль** и **пиридоксамин** — отличаются друг от друга наличием соответственно гидроксильной, альдегидной или аминной группы в одноуглеродной боковой цепочке у четвертого атома углерода пиридинового кольца (рис. 1.4.1). Все три представителя группы витамина В<sub>6</sub> (**витамеры В<sub>6</sub>**) представляют собой бесцветные кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде. Витамеры В<sub>6</sub> устойчивы к действию кислорода воздуха, но чувствительны к свету, особенно при нейтральных и щелочных значениях рН.



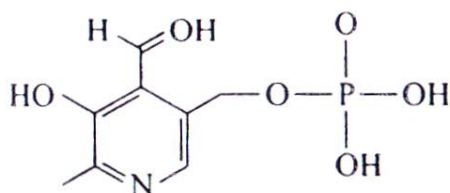
Пиридоксин



Пиридоксаль



Пиридоксамин



Пиридоксаль-5-фосфат  
(ПАЛФ)

**Рис. 1.4.1.** Семейство витамина В<sub>6</sub>

Витамеры В<sub>6</sub>, обладают характерными спектрами поглощения и флюоресценции, положение максимумов и интенсивность которых зависят от химической структуры конкретного витамера и рН среды.

Альдегидная группа пиридоксаля и его фосфорилированной формы – **пиридоксальфосфага** легко вступает в соединение с аминогруппами аминокислот и аминов, образуя Шиффовые основания (азометины), а также с различными реагентами на карбонильную группу, в частности, с гидразинами, образуя соответствующие гидразоны.

Биологическая активность витаминов группы В<sub>6</sub> обусловлена образованием из них в организме фосфорилированных коферментных форм: **пиридоксаль-5-фосфата (ПАЛФ)** и **пиридоксаминфосфата**, на долю которых приходится основная часть присутствующего в тканях витамина В<sub>6</sub>. Фосфорилированная форма пиридоксина — **пиридоксинфосфат** каталитической коферментной функцией не обладает, но легко превращается в активный ПАЛФ.

Все три витамера В<sub>6</sub> обладают одинаковой витаминной активностью, поскольку они одинаково эффективно всасываются в кишечнике, легко превращаются друг в друга в организме и равноценны в качестве предшественников коферментных форм витамина В<sub>6</sub>.

Фосфорилирование витамеров В<sub>6</sub> в животных тканях катализирует фермент **пиридоксалькиназа**. При этом из пиридоксаля непосредственно

образуется ПАЛФ, а из пиридоксина и пиридоксамина соответственно пиридоксинфосфат и пиридоксаминфосфат, которые могут быть окислены в ПАЛФ с помощью ФАД-содержащего фермента – пиридоксинфосфатоксидазы.

Основным конечным продуктом обмена витамина В<sub>6</sub> в организме животных и человека является биологически неактивная **4-пиридоксиновая кислота**, образующаяся в результате окисления пиридоксаля.

Витамин В<sub>6</sub> в форме ПАЛФ является коферментом многочисленных **пиридоксалевых ферментов**, катализирующих важнейшие реакции азотистого обмена.

К ним относятся более 50 различных **аминотрансфераз**, катализирующих взаимопревращение amino- и кетокислот. Среди них **аспартат-аминотрансфераза** и **аланин-аминотрансфераза**, катализирующие взаимопревращение аланина, глутамата, аспартата и соответствующих кетокислот цикла Кребса (пировиноградной, α-кетоглутаровой и щавелевоуксусной), играют важнейшую роль в сопряжении белкового и энергетического обменов. Аминотрансферазы, катализирующие переаминирование тироксина и трийодтиронина, участвуют в регуляции уровня и катаболизма тиреоидных гормонов.

Другой большой группой пиридоксалевых ферментов являются **декарбоксилазы аминокислот**, катализирующие отщепление от аминокислот карбоксильной группы с образованием биогенных аминов. **Глутаматдекарбоксилаза**, катализирующая превращение глутамата в **γ-аминомасляную кислоту (ГАМК)**, играет важную роль в регуляции процессов возбуждения и торможения в мозге. **Декарбоксилаза ароматических аминокислот** декарбоксилирует 3,4-диоксифенилаланин, 5-окситриптофан, триптофан, фенилаланин, тирозин, гистидин. Образующиеся при этом **серотонин, триптамин, тирамин, гистамин** и предшественник катехоламинов **дофамин** оказывают глубокое влияние на деятельность сердечно-сосудистой, мышечной, периферической и центральной нервной систем.

К числу пиридоксальфосфат-зависимых **оксидоредуктаз** относятся **моноаминоксидазы** и **диаминоксидазы**, принимающие участие в расщеплении и инактивации биогенных аминов.

Среди других ПАЛФ-зависимых ферментов следует указать **синтазу α-аминолевулиновой кислоты**, катализирующую образование σ-аминолсвулнната из глицина и сукцинил-КоА. Эта реакция является одним из важных начальных этапов биосинтеза **гемоглобина** и

## **цитохромов.**

ПАЛФ-зависимый фермент **кинурениназа** осуществляет превращение 3-оксикинуренина в 3-оксиантралиловую кислоту, являющееся важным этапом обмена триптофана на пути биосинтеза из него никотиновой кислоты. Это превращение, наряду с поступлением ниацина с пищей, является важным источником витамина РР в организме человека.

Другая группа ПАЛФ-зависимых ферментов: цистатионинсинтаза и цистатионаза играет важную роль в обмене серосодержащих аминокислот, участвуя в биосинтезе цистеина. Из них первый фермент – цистатионинсинтаза катализирует конденсацию гомоцистеина и серина с образованием цистатионина, тогда как второй фермент – цистатионаза осуществляет расщепление цистатионина на гомосерин и цистейн.

В механизме всех многочисленных ферментативных реакций, катализируемых пиридоксальными ферментами, важнейшая роль принадлежит альдегидной группе пиридоксальфосфата. Согласно теории пиридоксалевого катализа Браунштейна - Снелла, эта альдегидная группа в ходе катализируемой реакции образует Шиффово основание с аминогруппой, подвергающейся превращению аминокислоты, в результате чего происходит ослабление всех связей  $\alpha$ -углеродного атома этой аминокислоты. Это облегчает осуществление реакций отщепления или замещения при этом атоме, характер и направление которых определяется структурой белка апофермента.

Недостаточность витамина В<sub>6</sub> у человека встречается относительно редко, главным образом, как следствие хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта или длительного приема лекарственных средств, являющихся антагонистами витамина В<sub>6</sub>. К ним относятся противотуберкулезные препараты на основе гидразида изоникотиновой кислоты (изониазид, тубазид), легко образующие с пиридоксалем и ПАЛФ соответствующие гидразоны, и антибиотик циклосерин, также образующий с ПАЛФ каталитически неактивные соединения.

Недостаточность витамина В<sub>6</sub>, ведет к нарушениям со стороны центральной нервной системы (раздражительность, сонливость, периферические полиневриты), поражению кожных покровов и слизистых оболочек (себорейный дерматит, ангулярный стоматит, хейлоз, конъюнктивит, глоссит). В ряде случаев, особенно у детей, недостаточность витамина В<sub>6</sub> может вести к судорогам и развитию микроцитарной гипохромной анемии. Судорожные состояния в этих условиях обусловлены нарушением синтеза  $\gamma$ -аминомасляной кислоты из-

за снижения активности ПАЛФ-зависимой глутаматдекарбоксилазы. Аналогичным образом причиной анемии является нарушение синтеза гемоглобина в результате торможения ПАЛФ-зависимой  $\alpha$ -аминолевулинат-синтазы.

Врожденные, генетически обусловленные нарушения коферментных функций ПАЛФ лежат в основе таких наследственных заболеваний, как гомоцистинурия, цистатионинурия, пиридоксинзависимый судорожный синдром, пиридоксинзависимая анемия и ряд других.

Для количественного определения пиридоксаля и ПАЛФ в биологических объектах существуют колориметрические методы, основанные на определении окраски их гидразонов (чувствительность  $10^6$ - $10^7$  М), или методы флюориметрии (чувствительность  $10^{-5}$ — $10^{11}$  М). И те и другие требуют предварительного разделения и очистки витамин В<sub>6</sub> с помощью хроматографии или электрофореза.

От этого ограничения свободны микробиологические методы, чувствительность которых достигает  $5 \cdot 10^4$  М. Для суммарного определения всех витамин В<sub>6</sub> используют дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* или *Debaryomyces*. Для избирательного определения пиридоксаля и пиридоксамина применяют некоторые штаммы *Lactobacillus casei* для которых указанные витамин В<sub>6</sub> в несколько сот раз более активны, чем пиридоксин. Последний может быть избирательно определен с помощью мутанта *Neurospora sitophila*, не чувствительного к другим витамин В<sub>6</sub>.

Для количественного определения ПАЛФ применяются ферментативные методы с использованием апофермента триптофаназы из *E. coli* или тирозиндекарбоксилазы из *Streptococcus faecalis*. В настоящее время для количественного определения витамин В<sub>6</sub>, их фосфорированных форм и продуктов обмена, в частности 4-пиридоксиновой кислоты, с успехом используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для оценки обеспеченности организма человека витамином В<sub>6</sub> исследуют его концентрацию в цельной крови (норма — 100 мкг/л) или сыворотке (норма — 70 мкг/л), экскрецию с мочой 4-пиридоксиновой кислоты (в норме — 70-260 мкг/ч).

В качестве функционального теста используют определение экскреции с мочой ксантуреновой кислоты после нагрузки триптофаном. При недостатке витамина В<sub>6</sub> эта экскреция возрастает вследствие торможения зависящей от витамина В<sub>6</sub> кинурениназы, участвующей в обмене триптофана. Другим функциональным тестом является

определение в гемолизате эритроцитов активности ПАЛФ-зависимых аспартат- или аланин-аминотрансфераз, а также коэффициентов их активации при добавлении экзогенного ПАЛФ (ПАЛФ-эффскт). При адекватной обеспеченности организма витамином В<sub>6</sub> эти коэффициенты не превышают 2,0 для аспартат- и 1,25 – для аланин-аминотрансферазы.

Витамин В<sub>6</sub> достаточно широко распространен и продуктах питания. Хорошим источником этого витамина служат мясо (0,3-0,5 мг/100 г), печень (0,5-0,7 мг/100 г), рыба (0,1 0,5 мг/100 г), яйца (преимущественно желток, 0,15 0.50 мг/100 г). Содержание витамина В<sub>6</sub> в хлебе из цельного зерна 0,3 мг/100 т. а из пшеничной муки высшего и первого сорта гораздо ниже - 0,1 мг/100 г. Потери витамина В<sub>6</sub> при тепловой обработке, например, при приготовлении мясных блюд, составляют 20-35 %, а при копчении и консервировании – до 50 %.

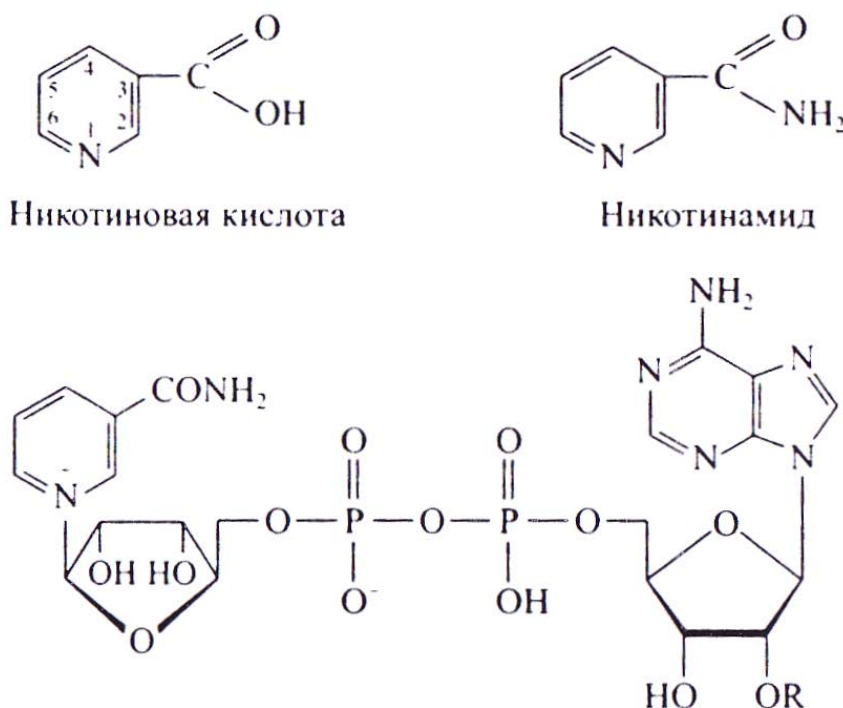
Препараты витамина В<sub>6</sub> применяют в профилактических и лечебных целях при нарушениях функции ЦНС, некоторых дерматитах, малокровии, длительном лечении антибиотиками или противотуберкулезным препаратом тубазидом, при токсикозах первой половины беременности и ряде других состояний. Высокие дозы пиридоксина (50-200 мг в сутки) используют при лечении врожденных пиридоксинзависимых гомоцистинурии, цистатионинурии, анемии, судорожном синдроме и других пиридоксинзависимых состояниях, обусловленных генетическими дефектами тех или иных коферментных функций ПАЛФ.

### **1.5. Ниацин (витамин РР)**

Ниацин (витамин РР. от англ. Pellagra preventing — предупреждающий пеллагру) — группа соединений, включающая никотиновую (пиридин-5-карбоновую) кислоту и никотинамид, обладающие одинаковой витаминной активностью (рис. 1.5.1).

Никотиновая кислота представляет собой белый кристаллический порошок с температурой плавления 234-238 °С, плохо растворимый в воде (1,25 г в 100 мл при 25 °С) и спирте, почти нерастворимый в эфире. Никотинамид – белый мелкокристаллический порошок с температурой плавления 128-151°С и горько-соленым вкусом. В отличие от никотиновой кислоты, никотинамид хорошо растворим в воде и спирте, плохо растворим в хлороформе, ацетоне и эфире. Оба витамина весьма устойчивы при хранении и выдерживают автоклавирование при 120 °С в

водных растворах. В растворах кислот и щелочей никотинамид превращается в никотиновую кислоту.



Никотиновая кислота

Никотинамид

**Рис 1.5.1.** Никотиновая кислота, никотинамид и никотинамидные коферменты

Никотиновая кислота и никотинамид имеют характерный максимум поглощения при 261,5 нм. Второй максимум поглощения никотиновой кислоты лежит при 385 нм, а никотинамида — при 300 нм.

Биологическая роль никотиновой кислоты и никотинамида определяется их участием в построении никотинамидных коферментов: никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ). НАД и НАДФ являются коферментами многочисленных (более 100) дегидрогеназ, функционирующих на начальных этапах биологического окисления самых разнообразных соединений: углеводов, аминокислот, жирных кислот и т. д. Среди них — ферменты гликолиза (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа), пентозофосфатного пути окисления углеводов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконат-дегидрогеназа) цикла трикарбоновых кислот (малат- и изоцитратдегидрогеназы) и др. [37, 346. 372].

В катализируемых этими ферментами окислительно-восстановительных реакциях НАД и НАДФ играют роль промежуточных акцепторов и переносчиков электронов и протонов. Механизм переноса сводится к обратимому восстановлению пиридинового кольца в молекуле никотинамидных коферментов за счет электронов и протона, отщепляемых от молекулы окисляемого субстрата. В результате этого НАД и НАДФ переходят в восстановленное состояние НАДН и НАДФН. Когда НАДН или НАДФН выступают в качестве доноров электронов и протона, эти превращения протекают в обратном направлении.

Функциональное различие между двумя коферментными формами никотинамида состоит в том, что НАДН, как правило, служит поставщиком электронов в цепь биологического окисления, сопряженного с фосфорилированием, т. е. с процессами аккумуляции энергии в форме АТФ. В отличие от этого НАДФН служит донором водорода на восстановительных этапах многочисленных биосинтетических процессов: при биосинтезе жирных кислот и стероидов из ацетил-КоА, при восстановительном аминировании кетокилот с образованием из них аминокислот (в частности, глутаминовой кислоты из  $\alpha$ -кетоглутаровой), при восстановлении рибозы до дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, образовании восстановленных форм фолиевой кислоты (ди- и тетрагидрофолата), восстановлении глутатиона и метгемоглобина и т. д.

НАДФН является также донором водорода в многообразных реакциях гидроксилирования и детоксикации чужеродных веществ, гидроксилировании стероидов и других соединений.

Никотинамидным коферментам принадлежит важная роль в продукции протона при секреции соляной кислоты в желудке.

Наряду с коферментными функциями, выполняемыми в составе дегидрогеназ, НАД является аллостерическим эффектором активности ряда ключевых ферментов энергетического обмена, донором остатка адениловой кислоты при репарации разрывов фосфодиэфирных связей в цепях ДНК, осуществляемой ДНК-лигазой, субстратом в синтезе поли-(АДФ)-рибозы, участвующей в поли-(АДФ)-рибозилировании ядерных белков и регуляции синтеза и репликации ДНК. Кроме того, никотинамид и его производное, N-метил никотинамид, принимают участие в метилировании транспортных РНК и белков.

Поступающие с пищей никотиновая кислота и никотинамид всасываются в фундальной части желудка и тонком кишечнике главным образом за счет диффузии и частично — путем активного транспорта. Оба



витамера легко проникают через клеточные мембраны в отличие от НАД и НАДФ, для которых клеточная оболочка практически непроницаема.

В свободном виде никотиновая кислота и никотинамид в животных тканях присутствуют в незначительном количестве. Почти весь присутствующий в организме ниацин находится в форме никотинамида, включенного в состав никотинамидных коферментов.

К конечным продуктам обмена никотиновой кислоты и никотинамида в организме, в виде которых они главным образом и выводятся с мочой, относятся N-метилникотиновая кислота (тригонеллин), никотинилглицин (никотинуровая кислота), M-мегилникотинамид, никотинамид-N-оксид, N-метил-6-пиридон-3-карбоксамид и др.

Никотиновая кислота и никотинамид поступают не только с пищей, но могут образовываться в организме из триптофана. При этом из 60 мг L-триптофана образуется 1 мг никотиновой кислоты. В соответствии с этим потребность человека (и животных) в ниацине принято выражать в ниациновых эквивалентах: 1 ниациновый эквивалент равен 1 мг никотиновой кислоты или 60 мг L-триптофана.

Рекомендуемые нормы потребления ниацина в зависимости от энергозатрат составляют от 16 до 28 мг ниациновых эквивалентов в сутки для мужчин и 14-20 мг — для женщин. Потребность в ниацине возрастает при тяжелой физической работе, беременности и кормлении грудью, приеме некоторых лекарств — сульфаниламидов, антибиотиков (табл. 2-4 приложения V).

При недостаточном поступлении в организм ниацина наблюдаются вялость, апатия, быстрая утомляемость, головокружение, бессонница, сердцебиение, бледность и сухость кожи, пониженная сопротивляемость инфекционным заболеваниям.

При глубоком дефиците развивается пеллагра (от итал. *pellagra* — шершавая кожа) — тяжелое заболевание с поражением желудочно-кишечного тракта, кожи, центральной и периферической нервной системы. Возникает глоссит, нарушается секреция желудочного сока, наступает упорная диарея. Поражения кожи характеризуются симметричным дерматитом лица и открытых частей тела (шея, кисти рук). Со стороны нервной системы яркими симптомами являются шум и звон в ушах, головные боли, нарушения речи и координации движений, атрофия мышц, а в наиболее тяжелых и далеко зашедших случаях глубокое поражение психики с параноидно-галлюцинаторными или депрессивными синдромами и деменцией.

Развитие пеллагры обычно было связано с использованием в качестве основного продукта питания кукурузы, бедной триптофаном и содержащей никотиновую кислоту в форме неусвояемого сложного эфира — ниацина. Еще в начале XX в. эпидемии пеллагры свирепствовали в Италии, Испании, Франции, Румынии и Южных штатах США, где население питалось преимущественно кукурузой. За один только 1933 г. от пеллагры умерло в Румынии 18000, а в США — 4000 человек.

Для профилактики ниациновой недостаточности в большинстве стран мира проводится обогащение муки никотиновой кислотой (вместе с витаминами В1 и В2). Кроме недостаточного поступления ниацина с пищей, возможной причиной его гиповитаминоза являются хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, нарушающие всасывание витаминов, а также длительная противотуберкулезная терапия изониазидом и циклосерином, которые являются антагонистами витамина В6, необходимого для превращения триптофана в ниацин.

Основным показателем обеспеченности человека ниацином является экскреция с мочой главного продукта его обмена — [N-метилникотинамида (N-МНА), которая в норме составляет 7-12 мг в сутки. При недостатке ниацина экскреция N-МНА снижается. Наряду с N-МНА исследуют также экскрецию с мочой других продуктов обмена ниацина, в частности N-метил-6-пиридои-3-карбоксамид, н и коти нам и д-К-оксида и др. [122, 198].

Концентрация никотиновой кислоты, никотинамида и никотинамидных коферментов в крови снижается при дефиците ниацина незначительно, даже на глубоких стадиях пеллагры, в связи с чем определение этих показателей не является подходящим критерием для оценки обеспеченности организма ниацином.

Никотиновую кислоту (и никотинамид после его гидролиза до никотиновой кислоты) определяют колориметрически по реакции Кёнига с цианбромидом и ароматическим амином (например, с анилином), а также микробиологически — с помощью *Lactobacillus arabinosus*.

N-метилникотинамид определяют флюориметрически в виде интенсивного флюоресцирующего продукта конденсации N – метил никотинамида в щелочной среде с ацетоном или метилэтилкетон.

Аналогичный метод используют для флюориметрического определения в тканях НАД и НАДФ. Восстановленные формы никотинамидных коферментов: НАДН и НАДФН — могут быть определены спектрометрически по характерному для них интенсивному поглощению при 340 нм.

Раздельное определение НАД и НАДФ осуществляют с использованием очищенных апоферментов алкогольдегидрогеназы, которая активна в присутствии НАД и НАДФН, и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, которая функционирует только в присутствии НАД и НАДФН.

При определении никотиновой кислоты, никотиамида и их коферментных форм физико-химическими методами в крови и тканях необходима предварительная обработка для удаления мешающих анализу примесей и разделение определяемых соединений методами электрофореза или хроматографии.

Хорошим источником ниацина служат мясные продукты (5-9 мг/100 г), печень (13-16 мг/100 г), почки, рыба, крупы, например, гречневая (5-7 мг/100 г), хлеб грубого помола. Высоко содержание ниацина в дрожжах (пекарские сухие — 25-50 мг/100 г, пивные сухие — 54-93 мг/100 г), сушеных грибах. Овощи бедны ниацином (0,3-2,0 мг/100 г). Молоко также бедно ниацином (1,0-1,5 мг/100 г), но с учетом содержания триптофана является хорошим источником ниациновых эквивалентов. Этим объясняется защитное действие молока от пеллагры при использовании в пищу кукурузы.

В растительных продуктах значительная доля ниацина представлена никотиновой кислотой, в продуктах животного происхождения — никотинамидом, входящим в состав никотинамидных коферментов.

Консервирование, замораживание и сушка мало влияют на содержание ниацина в пищевых продуктах. Тепловая обработка (варка, жарение) снижают его содержание на 15-20 %.

Препараты ниацина используют для профилактики и лечения его недостаточности, в том числе при энтероколитах, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, диабете, для стимуляции заживления ран, при заболеваниях печени и др. В высоких дозах никотиновая кислота вызывает расширение сосудов кожи и ее покраснение. В связи с этим в лечебных целях предпочитают использовать никотинамид, который даже в высоких дозах не дает подобного сосудистого эффекта.

Антагонистами ниацина являются высокотоксичный 3-ацетилпиридин, используемый для моделирования экспериментального РР-авитаминоза у животных, а также гидразид изоникотиновой кислоты, подавляющий рост и жизнеспособность микобактерий туберкулеза.

## 1.6. Фолацин (фолиевая кислота, фолаты)

Фолацин (от лат. Folium — лист и англ. acid — кислота) — группа родственных соединений, обладающих биологической активностью фолиевой кислоты. Важнейшими представителями этой группы является сама фолиевая (птероил-моноглутаминовая) кислота, ее многочисленные коферментные формы, а также их ди- и полиглутаматы (фолаты).

В химическом отношении фолиевая кислота представляет собой 4-[(2-амино-4-окси-6-птерпдил)-метил]-аминобензоил-L (+) глутаминовую кислоту молекула которой состоит из трех фрагментов: заметенного птеринового цикла (2-амино-4-окси-6-метилптерина), остатков парааминобензонной и глутаминовой кислот. Наряду с фолиевой кислотой, содержащей один остаток глутаминовой кислоты, существуют ее конъюгированные формы с двумя и более остатками (обычно от 2 до 7) ди-, три- и полиглутаматы, объединяемые общим термином фолаты (рис. 1.6.1).

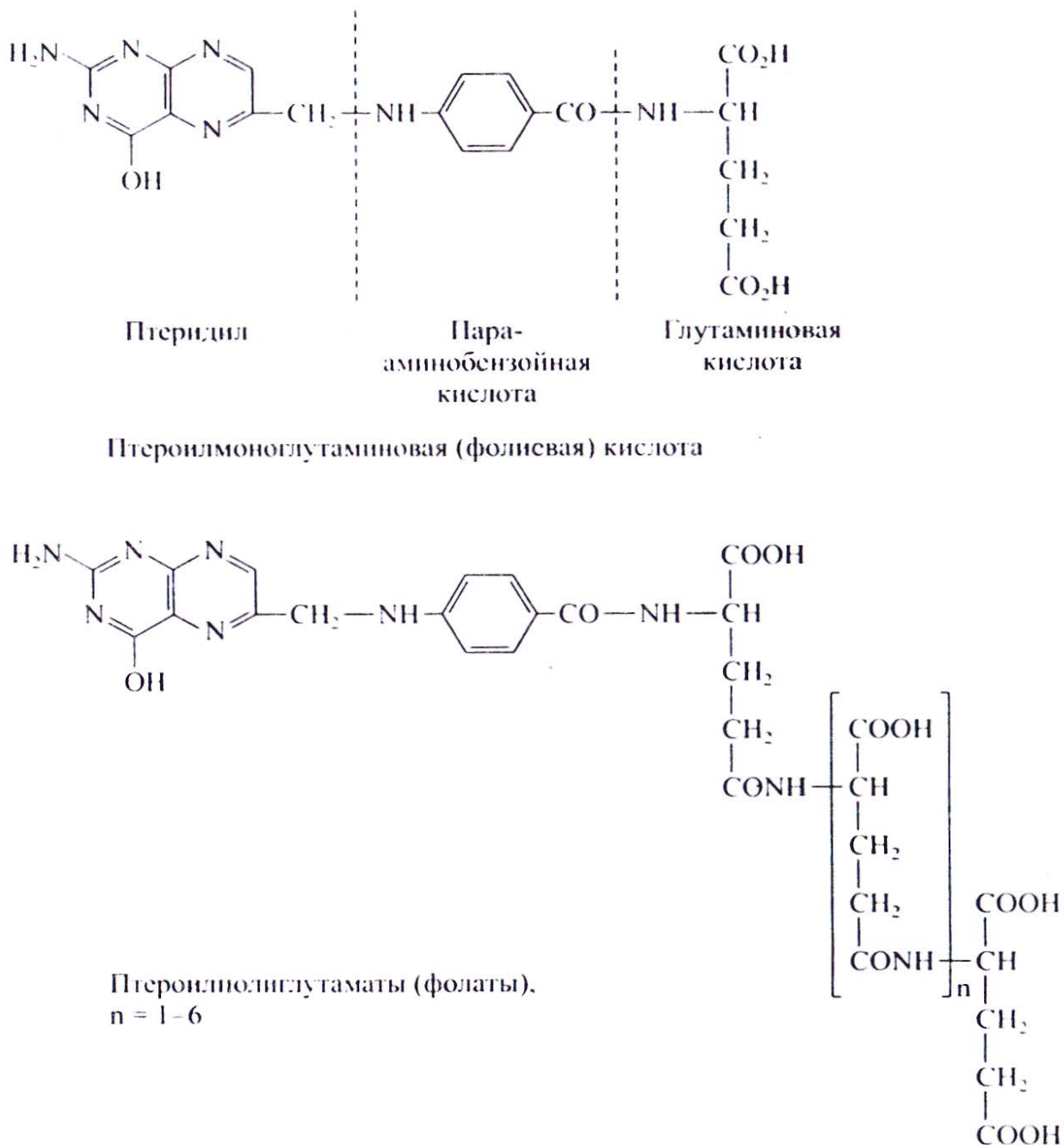
Чистая фолиевая кислота представляет собой желтый мелкокристаллический порошок, без вкуса и запаха с температурой плавления 360 °С. Фолиевая кислота почти нерастворима в воде (1 мг в 100 мл при 2 °С и 50 мг в 100 мл при 100 °С), но хорошо растворяется в слабых растворах едких щелочей. На свету разлагается. В 0,1 н. NaOH имеет три характерные полосы поглощения в ультрафиолетовой области спектра с максимумами поглощения при 256, 283 и 365 нм. При окислении фолиевой кислоты марганцовокислым калием образуется 2-амино-4-оксиптеридин-6-карбоновая кислота, обладающая интенсивной голубой флуоресценцией с максимумами возбуждения при 365 нм и эмиссии - 450 470 нм.

В химическом отношении фолиевая кислота представляет собой 4-[(2-амино-4-окси-6-птериил)-метил]-аминобензоил-L (+) глутаминовую кислоту, молекула которой состоит из трех фрагментов: замещенного птеринового цикла (2-амино-4-окси-6-метилптерина), остатков парааминобензонной и глутаминовой кислот. Наряду с фолиевой кислотой, содержащей один остаток глутаминовой кислоты, существуют ее конъюгированные формы с двумя и более остатками (обычно от 2 до 7) ди-, три- и полиглутаматы, объединяемые общим термином фолаты.

Основной коферментной формой фолиевой кислоты является ее восстановленное производное **тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК)**.

Участвуя в различных ферментативных реакциях, связанных с отщеплением одноуглеродных остатков, ТГФК осуществляет их химический перенос, выступая в одних реакциях в качестве акцептора, а в других — в качестве донора этих химических группировок. Благодаря

этой функции, коферментные формы фолиевой кислоты играют важную роль в обмене ряда аминокислот (серина, глицина, гистидина), ресинтезе метионина и биосинтезе **пуриновых** и **пиримидиновых** оснований — предшественников **ДНК** и **РНК**.



**Рис. 1.6.1.** Химическая структура фолиевой кислоты и ее полиглютаматов

К числу одноуглеродных фрагментов, переносимых тетрагидрофолиевой кислотой в этих превращениях, относятся: метильная группа (-CH<sub>3</sub>), метиленовая (-CH<sub>2</sub>), метиновая (-CH=), формильная (-

**СНО**) и формимино-группа (-СН=NH). Присоединяя эти группировки, фолиевая кислота образует следующие коферментные формы: 5-метилтетрагидрофолиевую (5-СН<sub>3</sub>-Н<sub>4</sub>-фолиевую); 5,10-метилентетрагидрофолиевую (5,10-СН<sub>2</sub>-Н<sub>4</sub>-фолиевую); 10-формилтетрагидрофолиевую (10-НСО-Н<sub>4</sub>-фолиевую); 5-формилтетрагидрофолиевую (5-НСО-Н<sub>4</sub>-фолиевую) и 5-формиминотетрагидрофолиевую (5-СН=NH-Н<sub>4</sub>-фолиевую) кислоты. Взаимопревращения этих коферментных форм образуют так называемый **цикл фолиевой кислоты**.

Фолиевая кислота всасывается в проксимальных отделах тонкого кишечника главным образом в виде свободной птероилмоноглутаминовой (собственно фолиевой) кислоты и в значительно меньшей степени - ее диглутамата. Поскольку фолаты пищи представлены главным образом **полиглутаматами** с числом глутамильных остатков от 2 до 7, то необходимым условием нормального всасывания является их предварительный гидролиз **γ-L-глутамил-карбоксипептидазой** (конъюгазой), присутствующей в больших количествах в желчи, соке поджелудочной железы, стенке тонкого кишечника и других тканях.

Преобразование фолиевой кислоты в исходную коферментную форму тетрагидрофолат в животных тканях происходит в два этапа: на первом фолиевая кислота, присоединяя два атома водорода, превращается в **дигидрофолисвук» кислоту**, на втором - происходит присоединение еще двух атомов водорода, в результате чего образуется **тетрагидрофолиевая кислота**. Оба этапа катализирует ФАД-зависимый фермент — дигидрофолатредуктаза. Преимущественным донором водорода служит НАДН.

Основными источниками одноуглеродных фрагментов, акцептируемых тетрагидрофолиевой кислотой в реакциях катаболизма, являются α-углеродный атом глицина, β-углеродный атом серина, 2-й углеродный атом индольного кольца гистидина, а также образующиеся в организме в процессе обменных реакций муравьиная кислота, формальдегид и ряд других соединений.

Включение β-углеродного атома L-серина в тетрагидрофолиевую кислоту с образованием 5,10-метилентетрагидрофолата катализирует сериноксиметил-трансфераза, коферментом которой является образующийся из витамина В<sub>6</sub> пирпдоксальфосфат. Эта реакция обратима, и с ее помощью в организме может происходить не только расщепление серина, но и его биосинтез из глицина и 5,10-СН<sub>2</sub>-Н<sub>4</sub>-фолиевой кислоты.

Метиленовая группировка в составе 5,10-метилентетрагидрофолиевой кислоты может быть подвергнута

восстановлению с образованием 5-метилтетрагидрофолиевой кислоты. Это восстановление катализирует специфическая метилентетрагидрофолатредуктаза, простетической группой которой является производное рибофлавина ФАД.

Другим важным источником одноуглеродных фрагментов является гистидин. В процессе катаболизма этой аминокислоты образуется формиминоглутаминовая кислота (ФИГК), дальнейший распад которой происходит с участием тетрагидрофолата и формиминотрансферазы. Последний фермент осуществляет перенос формиминогруппы от ФИГК на тетрагидрофолат, в результате чего образуется 5-формиминотетрагидрофолиевая кислота. Торможение этой реакции при недостатке фолиевой кислоты ведет к повышенному накоплению и экскреции ФИГК.

Таковы основные реакции, по которым одноуглеродные фрагменты поступают в общий пул взаимопревращающихся форм тетрагидрофолиевой кислоты. Рассмотрим процессы, в которых эти формы выступают в роли доноров одноуглеродных группировок.

Одна из этих реакций заключается в использовании 5-СН<sub>3</sub>-Н<sub>4</sub>-фолиевой кислоты в качестве донора метильной группы при ресинтезе метионина.

Исключительно важной функцией коферментных форм фолиевой кислоты является их участие в биосинтезе пуриновых оснований: аденина и гуанина. При этом 10-формил-Н<sub>4</sub>-фолиевая кислота служит источником 2-го углеродного атома пуринового кольца, а 5,10-СН=Н<sub>4</sub>-фолиевая кислота выполняет такую же роль в отношении 8-го углеродного атома этого кольца.

В биосинтезе пиримидинового кольца фолатные коферменты непосредственного участия не принимают, но они служат источником метильной группы при образовании дезокситимидинмонофосфата (дТМФ) из дезоксиуридинмонофосфата (дУМФ). Непосредственным донором одноуглеродного фрагмента в этой реакции является 5,10-СН<sub>2</sub>-Н<sub>4</sub>-фолиевая кислота.

Участие коферментных форм фолиевой кислоты в биосинтезе дТМФ и пуриновых оснований, входящих в состав ДНК и РНК, определяет исключительно важную роль этого витамина в биосинтезе нуклеиновых кислот, в процессах роста и развития, пролиферации тканей, в частности, в процессах кроветворения и эмбрионального развития.

В последние годы получены убедительные данные, что более высокое потребление фолиевой кислоты способствует снижению риска сердечно-сосудистых и ряда онкологических заболеваний, а также

существенно уменьшает частоту врожденных дефектов развития у новорожденных, в связи с чем в США рекомендуемая норма потребления этого витамина увеличена до 400 мкг в сутки.

При недостатке фолиевой кислоты страдают прежде всего ткани, для которых характерны интенсивный синтез ДНК и высокая скорость деления клеток, кроветворная ткань и слизистая кишечника. Развивается макроцитарная (мегалобластическая) гиперхромная анемия, морфологически сходная с анемией Аддисона - Бирмера, развивающейся при нарушении всасывания витамина В<sub>12</sub>. Наряду с нарушением эритропоэза, тормозится также функция белого ростка крови с развитием лейко- и тромбоцитопении. Со стороны органов пищеварения выявляются стоматит, гастрит и энтерит. Дефицит фолиевой кислоты во время беременности может оказывать тератогенное действие, быть причиной недоношенности, нарушений физического и психического развития новорожденных.

Недостаточность фолиевой кислоты встречается у беременных и кормящих женщин, недоношенных, а также лиц пожилого возраста. Одной из причин этого может являться недостаточное потребление продуктов животного происхождения и свежих овощей, а также высокая термолабильность фолиевой кислоты, что ведет к ее значительным потерям при тепловой обработке продуктов питания. У беременных женщин недостаточность фолиевой кислоты часто может сочетаться с дефицитом железа. Другой причиной фолиевой недостаточности могут быть нарушения ее всасывания при хронических энтероколитах и резекциях тонкого кишечника, длительный прием барбитуратов, нарушающих утилизацию фолиевой кислоты в организме, хронический алкоголизм, дефицит витамина В<sub>12</sub>, нарушающий обмен коферментных форм фолиевой кислоты, прием препаратов, являющихся антагонистами этого витамина.

Об обеспеченности человека фолиевой кислотой можно судить по концентрации фолатов в сыворотке, цельной крови и эритроцитах. В норме суммарное содержание фолатов в сыворотке, определяемое микробиологически с *L. casei* или методом радиоконкурентного связывания, составляет от 6 до 20 нг/мл. По мнению экспертов ВОЗ, содержание фолатов в сыворотке крови ниже 6 нг/мл можно рассматривать как свидетельство недостаточности фолацина.

Для оценки обеспеченности организма фолиевой кислотой используют также тест на экскрецию форминоглутаминовой кислоты (ФИГК) после нагрузки гистидином. В норме эта экскреция составляет около 30 мг, а при дефиците возрастает до 400-450 мг в сутки. Сходным



образом возрастает экскреция уроганиновой кислоты, являющейся предшественником ФИГК при ее образовании из гистидина.

Другим проявлением недостаточности фолиевой кислоты, которое также может быть использовано при оценке обеспеченности ею организма, является увеличение экскреции с мочой аминоксидокарбоксамид-риботида (ДИКА), вследствие нарушения его использования в биосинтезе пуринных оснований.

О недостатке фолиевой кислоты судят также по морфологическому составу периферической крови, уменьшению количества эритроцитов, появлению гиперсегментированных многоядерных лейкоцитов. При сочетании фолиевой недостаточности с дефицитом железа макроцитоз в периферической крови может отсутствовать.

Как уже упоминалось выше, вторичная, функциональная недостаточность фолиевой кислоты может развиваться и при дефиците витамина В<sub>12</sub>, в связи с чем нарушения кроветворения, повышенная экскреция ФИГК и АИКА имеют место при недостаточности каждого из этих витаминов. Для дифференцировки этих недостаточностей необходимо исследовать концентрацию в сыворотке крови фолатов и витамина В<sub>12</sub>, а при определении экскреции ФПГК или АИКА проводить повторное исследование после инъекции витамина В<sub>12</sub>, устраняющей его возможный дефицит. Надежным тестом для дифференциальной диагностики дефицита фолиевой кислоты и витамина В<sub>12</sub> служит экскреция с мочой метилмалоновой кислоты, которая не зависит от обеспеченности организма фолатом и возрастает только при недостатке витамина В<sub>12</sub>.

Для определения фолиевой кислоты и ее производных в биологических объектах, сыворотке крови и тканевых экстрактах существуют микробиологические методы с использованием в качестве тест-организмов *Lactobacillus casei* 7469, *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Pedococcus cerevisiae* ATCC 8081. Первый микроорганизм используют для определения общей суммы фолатов и их производных, поскольку он растет почти на всех формах фолиевой кислоты, включая птероилмоно-, ди- и триглутаматы, а также коферментные формы. Два других микроорганизма обладают избирательной чувствительностью к различным формам фолиевой кислоты и пригодны для их отдельного определения.

Широкое распространение для количественного определения фолиевой кислоты имеют также методы радиоконкурентного связывания с использованием связывающих фолиевую кислоту белков, выделенных из молока или почек свиньи и других источников.

Флюориметрические методы с успехом могут быть использованы при анализе чистых растворов фолиевой кислоты, но при исследовании

биологического материала требуют сложных и трудоемких операций по отделению фолиевой кислоты и ее производных от мешающих определению примесей. Для разделения различных форм фолиевой кислоты используют методы колоночной, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Фолиевая кислота и ее производные широко распространены в природе. Хорошим источником фолиевой кислоты служит листовая зелень: петрушка (110 мкг/100 г), салат (50 мкг/100 г), капуста (10-20 мкг/100 г). Сравнительно много фолиевой кислоты в хлебе из муки грубого помола (30 мкг/100 г). Богаты фолиевой кислотой печень (220-240 мкг/100 г) и почки (45 мкг/100 г). Мясо, яйца и молоко сравнительно бедны фолиевой кислотой (4 К) мкг/100 г).

Фолиевая кислота и ее коферментные формы, будучи соединениями довольно неустойчивыми, могут легко разрушаться при технологической и кулинарной обработке пищи. Особенно легко разрушается фолиевая кислота в овощах, при длительной варке которых потери фолацина могут достигать 80-95%. В мясных продуктах фолиевая кислота более устойчива. Фолиевая кислота используется в лечебных и профилактических целях при анемиях, лейкопениях, хронических гастроэнтероколитах, после резекций кишечника. Дополнительный профилактический прием фолновой кислоты необходим беременным и кормящим женщинам.

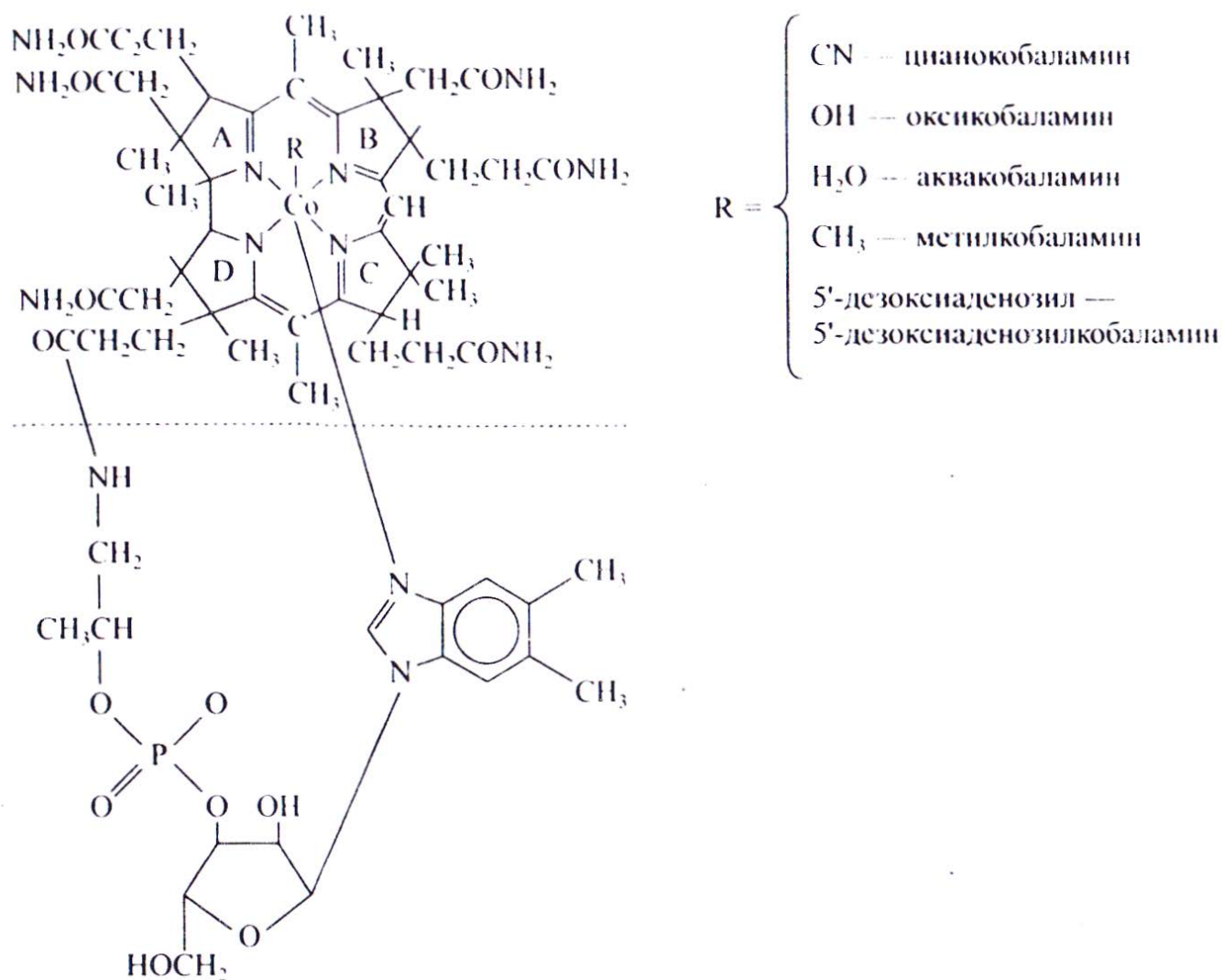
**Антагонистами** фолновой кислоты являются **сульфамидные** препараты, нарушающие у микроорганизмов использование парааминобензойной кислоты для биосинтеза фолата.

Антиметаболит фолновой кислоты - **метотрексат**, блокирующий превращение фолновой кислоты в тетрагидрофолат, применяется при лечении острых лейкозов, хорионэпителиомы и ряда других злокачественных новообразований у человека.

## 1.7. Витамин В<sub>12</sub>

Кобаламины (витамин В<sub>12</sub>) — группа родственных соединений, производных **коррина**, обладающих биологической (витаминной) активностью **цианокобаламина**. Важнейшими представителями этой группы являются **цианокобаламин**, кристаллизующийся в виде рубиново-красных призм, разлагающийся при температуре выше 200 °С; **оксикобаламин** — фиолетово-красные иглы с температурой плавления 320 °С, постепенно разлагающиеся при температуре выше 200 °С; **аквакобаламин**, а также **метилкобаламин** и 5'-

**дезоксадеинозилкобаламин.** Все эти соединения имеют сложную химическую структуру, состоящую из циклической тетрапиррольной системы коррина с ковалентно связанным атомом **кобальта (Co)** и нуклеотидной части — 5,6-диметилбензимидазола, связанную через рибозу с корриновым кольцом, а также с атомом кобальта в  $\alpha$ -положении к плоскости корринового кольца (рис. 1.7.1).



**Рис. 1.7.1.** Химическая структура витамина B<sub>12</sub>

Отдельные представители группы витамина B<sub>12</sub> отличаются друг от друга химической природой второго лиганда, связанного с атомом Co в  $\beta$ -положении к плоскости кольца: у цианокобаламина этим лигандом является цианогруппа (CN), у оксикобаламина — оксигруппа (OH), у аквакобаламина — молекула воды, у метилкобаламина — метильная группа (CH<sub>3</sub>) и у дезоксиадеинозилкобаламина — 5'-деоксиадеинозил,

присоединенный к атому кобальта через 5-й углеродный атом дезоксирибозы.

Оксикобаламин является одной из основных природных форм витамина В<sub>12</sub>, в виде которой он транспортируется белками крови и депонируется в организме. Метилкобаламин (СН<sub>3</sub>В<sub>12</sub>) и 5'-дезоксаденозилкобаламин (дАВ<sub>12</sub>) являются коферментными формами витамина В<sub>12</sub>.

Обычно используемый в медицинской практике цианокобаламин, содержащий у атома кобальта цианогруппу, является основной промышленной формой выпуска витамина В<sub>12</sub>. В организме он легко превращается в оксикобаламин, из которого, в свою очередь, синтезируются метилкобаламин и дезоксаденозил-кобаламин.

Витамин В<sub>12</sub> в организме животных и человека принимает каталитическое участие в двух ферментативных реакциях [37, 191, 346, 372]. В виде метилкобаламина он является коферментом N5-метилтетрагидрофолат: омоцистеинметилтрансферазы, катализирующей ресинтез метионина из гомоцистеина путем переноса на него метильной группы от N5-метилтетрагидрофолиевой кислоты. Эта реакция играет исключительно важную роль в циклических превращениях незаменимой аминокислоты метионина, который, в форме 5-аденозилметионина, служит активным донором метильных групп во многих реакциях метилирования, в частности, при биосинтезе адреналина, фосфатидилхолина, метилировании белков и нуклеиновых кислот. Поскольку метионин, отдавая свою метильную группу, превращается при этом в гомоцистеин, то метилирование последнего с помощью метилкобаламина и N5-метилтетрагидрофолат: омоцистеинметилтрансферазы обеспечивают реутилизацию гомоцистеина и превращение его в исходное соединение цикла метионин, который может быть вновь использован как для биосинтеза белка, так и для процессов метилирования. Одновременно эта реакция обеспечивает непрерывное поступление в цикл новых метильных групп, поставляемых N5-метилтетрагидрофолиевой кислотой из различных метаболических источников.

Другая коферментная форма витамина В<sub>12</sub> — дезоксаденозилкобаламин — необходима для функционирования метилмалонил-КоА-мутаза, катализирующей изомеризацию метилмалоновой кислоты в янтарную (в виде соответствующих ацильных производных кофермента А). Эта реакция является одним из необходимых заключительных этапов при окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода или разветвленной структурой боковой

цепочки холестерина, углеродного скелета аминокислот валина, изолейцина, треонина и метионина. а также при окислении пропионовой кислоты, продуцируемой микрофлорой кишечника, обеспечивая превращение образующихся при этом трехуглеродных и разветвленных фрагментов в янтарную кислоту, окисляемую далее в цикле трикарбоновых кислот.

Витамин  $B_{12}$  всасывается преимущественно в подвздошной кишке с помощью так называемого внутреннего фактора, или фактора Кастла, гликопротеида, продуцируемого обкладочными клетками желудка и образующего с витамином  $B_{12}$  комплекс, способный взаимодействовать со специфическим рецептором на поверхности клеток кишечного эпителия, обеспечивающим всасывание витамина. В отсутствие внутреннего фактора всасывание витамина  $B_{12}$  не происходит.

Транспорт всосавшегося витамина  $B_{12}$  кровью и его поступление в клетки тканей обеспечивается специальным транспортным белком крови — транскобаламином II, относящимся к фракции  $\beta$ -глобулинов. Другой белок крови, транскобаламин I, связывающий витамин  $B_{12}$  более прочно, по-видимому, обеспечивает депонирование некоторой части этого витамина в кровотоке.

В оксикобаламине, из которого в организме образуются коферментные формы витамина  $B_{12}$  атом кобальта находится в окисленном, 3-валентном состоянии, в то время как в метилкобаламине и дезоксиаденозилкобаламине он одновалентен. Поэтому биосинтез обеих коферментных форм витамина  $B_{12}$  включает две общие последовательные стадии, в ходе которых оксикобаламин с трехвалентным кобальтом восстанавливается в двухвалентный витамин  $B_{12}R (Co^{2+})$ , а последний — в одновалентный витамин  $B_{12}S(Co^{+1})$ . Эти превращения катализируют две флавиновые редуктазы, использующие в качестве источника электроны НАДН. Образование дезоксиаденозилкобаламина из витамина  $B_{12}$  осуществляет фермент АТФ: витамин — 5'-дезоксиаденозилтрансфераза, переносящая на витамин  $B_{12}$  дезоксиаденозинный остаток от АТФ. Предшественником метилкобаламина также является витамин  $B_{12}$  5- источником его метильной группы  $N_5$ —метилтетрагидрофолиевая кислота.

Недостаток витамина  $B_{12}$  приводит к тяжелым нарушениям процессов кроветворения, поражению нервной системы и органов пищеварения. Развивается гиперхромная макропитарная (металобластическая) анемия, лейкопения и тромбоцитопения. Отмечается раздражительность, утомляемость, развитие фуникулярного

миелоза (дегенерация задних и боковых столбов спинного мозга), приводящего к парестезиям, параличам и нарушению (функции тазовых органов. Со стороны пищеварительного тракта наблюдаются потеря аппетита, глоссит, ахилия, нарушение моторики кишечника.

Злокачественная анемия (анемия Адиссона Бирмера). развивающаяся при недостатке витамина В<sub>12</sub> не связана с какими-либо функциями этого витамина непосредственно в процессах кроветворения или синтеза белков и нуклеиновых кислот (несмотря на многолетние усилия огромного числа исследователей, подобные функции у витамина В<sub>12</sub> так и не были выявлены), а обусловлена вторично развивающимся нарушением обмена и функций фолиевой кислоты, попадающей в так называемую «метаболическую ловушку» из-за нарушения зависящего от витамина В<sub>12</sub> переноса метильных групп от метилтетрагидрофолата на гомоцистеин.

В отличие от этого, неврологические проявления дефицита витамина В<sub>12</sub> являются прямым следствием нарушения собственных функций этого витамина в обмене разветвленных аминокислот и жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, в результате чего нарушается структура миелиновой оболочки нервных волокон.

Потребность человека в витамине В<sub>12</sub> очень невелика, всего 1-3 мкг в сутки. Поэтому основной причиной его недостаточности часто являются не дефицит в пище, а нарушения всасывания и утилизации, обусловленные различными причинами: нарушением синтеза и секреции внутреннего фактора Кастла при атрофии слизистой оболочки желудка и его резекциях, появлением антител к внутреннему фактору и вырабатывающим его клеткам, удалением тонкого кишечника или его части, особенно подвздошной кишки, хроническими энтероколитами, спру, инвазией кишечных паразитов (широкий лентец), потребляющих витамин В<sub>12</sub>. Особую группу составляют врожденные, генетически обусловленные дефекты синтеза и структуры внутреннего фактора, клеточных рецепторов, участвующих во всасывании витамина В<sub>12</sub> и транспортирующих его белков (транскобаламны I и II). Недостаточность витамина В<sub>12</sub> алиментарного происхождения развивается при длительном отсутствии в рационе продуктов животного происхождения, являющихся единственным источником этого витамина. В частности, это может иметь место у полных вегетарианцев (веганов). Недостаток витамина В<sub>12</sub> может также возникнуть у беременных женщин и хронических алкоголиков.

Одним из основных методов оценки обеспеченности организма витамином В<sub>12</sub> является определение его концентрации в сыворотке

крови, которая в норме составляет 200-900 пг/мл. Концентрация витамина В<sub>12</sub> может быть определена микробиологически с использованием в качестве тест-организма кишечной палочки *E. coli* 113. В последние годы в этих целях широко применяются методы радиоконкурентного связывания с использованием внутреннего фактора или транскобаламина II. Ряд зарубежных фирм выпускает необходимые для этого наборы.

Другим тестом, который может быть использован для оценки обеспеченности организма витамином В<sub>12</sub> является определение суточной экскреции метилмалоновой кислоты, которая резко возрастает вследствие снижения активности зависящей от дезоксиаденозилкобаламин метилмалонил-КоА-мутаза. Для определения метилмалоновой кислоты используют методы газовой хроматографии или жидкостной хроматографии высокого давления с последующей масс-спектрометрией.

Поскольку частой причиной дефицита витамина В<sub>12</sub> являются нарушения его всасывания, то важное диагностическое значение имеют тесты, оценивающие состояние этого процесса (тест Шиллинга с меченым цианокобаламином). Витамин В<sub>12</sub> синтезируется исключительно микроорганизмами.

Хорошими продуцентами этого витамина являются актиномицеты, используемые для производства антибиотиков; иронионовокислые и меганообразующие бактерии, используемые для получения витамина В<sub>12</sub> методом микробиологического синтеза. В отличие от других витаминов группы В, зеленые растения витамин В<sub>12</sub> не синтезируют. Поэтому основным источником этого витамина для человека, как уже говорилось выше, являются продукты животного происхождения: мясо, творог, сыр. Особенно богаты им печень (30-60 мкг/100 г) и почки (15-25 мкг/100 г) крупного рогатого скота. В отличие от других витаминов группы В, витамин В<sub>12</sub> практически не содержится в пивных и пекарских дрожжах.

Жвачные животные не нуждаются в поступлении витамина В<sub>12</sub> с пищей, поскольку микрофлора рубца синтезирует его в достаточных количествах. Однако недостаток кобальта, в частности при его низком содержании в почве, нарушая синтез витамина В<sub>12</sub> ведет у этих животных к анемии и истощению («сухотка» жвачных животных).

Витамин В<sub>12</sub> широко используется в профилактических и лечебных целях при анемиях различной этиологии, заболеваниях печени, центральной и периферической нервной системы. Кормовые концентраты витамина В<sub>12</sub> хорошо зарекомендовали себя в животноводстве как стимуляторы роста и продуктивности сельскохозяйственных животных.

## 1.8. Пантотеновая кислота

В химическом отношении пантотеновая кислота (витамин В<sub>3</sub>) представляет собой N-(2,4-диокси-3,3-диметил-1-оксобутил)-β-аланин (рис. 1.8.1).

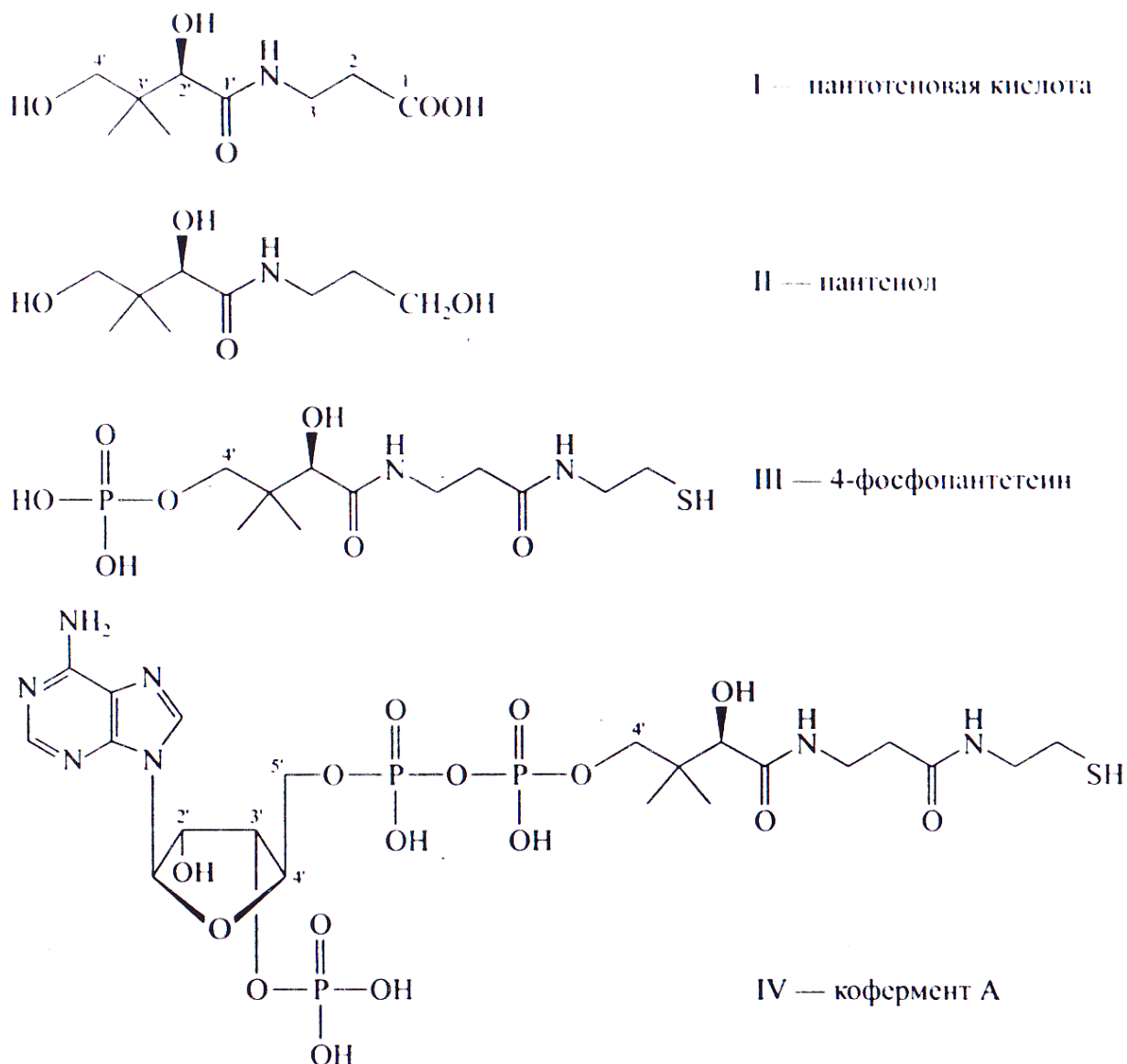


Рис. 1.8.1. Пантотеновая кислота и ее коферментные формы

В связи с наличием асимметрического атома углерода пантотеновая кислота существует в форме двух оптических изомеров, из которых витаминной активностью обладает только природный D(+)-изомер, тогда как L(-)-изомер биологически не активен. Синтетический рацемат, DL-пантотеновая кислота, представляющий собой смесь равных количеств D-



и L(-) изомеров, обладает 50 % активности D(+)-пантотеновой кислоты.

В свободной форме D(+)-пантотеновая кислота — светло-желтое вязкое вещество, легко растворима в воде, спирте, уксусной кислоте, плохо растворима в эфире, практически нерастворима в хлороформе и бензоле. Водные растворы D(+)-пантотеновой кислоты вращают плоскость поляризованного света вправо:  $[\alpha]_{D25} + 37,5^{\circ}\text{C}$  (вода). D( + )-пантотеновая кислота образует хорошо растворимые в воде и легко кристаллизующиеся бесцветные соли, в частности, D(+)-пантотенат Са, температура плавления 193,5-195 °С.

В нейтральных водных растворах пантотеновая кислота относительно стабильна и может выдерживать нагревание при 100 °С в течение 30 минут. При нагревании в кислой или щелочной среде пантотеновая кислота гидролизуется с отщеплением β-аланина.

Пантотеновая кислота широко распространена в природе, с чем связано и ее название (греч. — вездесущая). Ее синтезируют зеленые растения, микроорганизмы, в том числе кишечная микрофлора млекопитающих и человека.

Коферментной формой пантотеновой кислоты является кофермент А (коэнзим А, КоА, SHCoA). Кофермент А играет фундаментальную роль в обмене веществ (функционируя и качестве промежуточного акцептора, переносчика и донора остатков карбоновых кислот (ацилов) в ферментативных процессах окисления и биосинтеза жирных кислот, стероидов, в частности холестерина и стероидных гормонов, триглицеридов и фосфолипидов, при окислительном декарбоксилировании кетокислот, в частности пировиноградную и α-кетоглутаровой в цикле Кребса, в биосинтезе ацетилхолина, гема и ряда других важных в биохимическом отношении соединений. Связывание остатков карбоновых кислот с коферментом А происходит по концевой SH-группе кофермента. Образующаяся ацилтиоэфирная связь (ацил-SКоА, или RCO-КоА) является высоко энергетическим, что активирует связанный остаток кислоты и создает выгодные термодинамические предпосылки для его использования в реакциях ацилирования. Одним из важнейших соединений этого типа является ацетил-КоА, донор остатка уксусной кислоты («активного ацетата») в ферментативных реакциях ацетилирования.

Биосинтез кофермента А осуществляется в организме из пантотеновой кислоты с участием сложной ферментной системы, цистеина и АТФ. На первом этапе этих превращений пантотеновая кислота подвергается фосфорилированию с участием фермента

пантотенаткиназы и АТФ. Образующаяся 4-фосфопантотеновая кислота ацилирует L-цистеин с образованием 4-фосфопантотено- илцистеина, который декарбоксилируется до 4-фосфопантотеина. Последний, взаимодействуя с АТФ, образует нуклеотид — дефосфо-КоА, фосфорилирование которого, опять же за счет АТФ, приводит к образованию кофермента А.

В связи с наличием собственного синтеза пантотеновой кислоты кишечной микрофлорой точное определение потребности человека в этом витамине весьма затруднено. Ориентировочно принято считать достаточным ее потребление взрослым человеком в размерах 5 мг в сутки.

Как уже отмечалось выше, пантотеновая кислота широко распространена в природе и содержится практически во всех пищевых продуктах. Особенно богаты ею говяжья печень (4,0-9,0 мг/100 г), почки (2,5-4,0 мг/100 г), мясо (0,5-0,6 мг/100 г), яйца (1,3 мг/100 г), овсяная крупа (0,9 мг/100 г), горох (2,3 мг/100 г сухого веса). Содержание пантотеновой кислоты в молоке и молочных продуктах варьирует от 0,20 до 0,45 мг/100 г, в капусте и картофеле — от 0,1 до 0,3 мг/100 г, в хлебобулочных изделиях — от 0,2 до 0,7 мг/100 г, во фруктах и ягодах — от 0,1 до 0,4 мг/100 г.

Поступление пантотеновой кислоты с обычной пищей взрослого человека колеблется в пределах 4-16 мг в сутки.

Кулинарная обработка не вызывает заметного разрушения пантотеновой кислоты, однако до 30 % ее может теряться при варке из-за перехода в воду.

В связи с достаточным содержанием пантотеновой кислоты в пищевых продуктах и наличием собственного биосинтеза ее кишечной микрофлорой недостаточность этого витамина у человека практически не встречается. Полагают, что одним из проявлений недостаточности пантотеновой кислоты является синдром «жжения ступней» и некоторые нейрологические нарушения, в частности парестезии, наблюдавшиеся в сочетании с пеллагрой, но не поддававшиеся лечению никотиновой кислотой, тиаминном и рибофлавином у плохо питавшегося гражданского населения Мадрида во время гражданской войны в Испании зимой 1937-1938 гг., а также в японских лагерях для военнопленных американцев в Юго-Восточной Азии во время Второй мировой войны. Обмен пантотеновой кислоты у человека может нарушаться при некоторых кожных заболеваниях, острых и хронических поражениях печени, колитах, длительном приеме антибиотиков.

У млекопитающих и птиц недостаток пантотеновой кислоты вызывает замедление роста, кожные нарушения, дегенеративные изменения миелиновой оболочки спинного мозга, нарушение биосинтеза стероидных гормонов, синтеза тепа, процесса образования антител.

Для оценки обеспеченности организма пантотеновой кислотой исследуют ее содержание в крови и экскрецию с мочой. Однако эти показатели не очень надежны и в норме широко варьируют из-за различных размеров экзогенного синтеза пантотеновой кислоты кишечной микрофлорой.

Так, поданным различных авторов, концентрация общей пантотеновой кислоты (включая ее производные и кофермент А) в сыворотке крови варьирует от 400 до 700 нг/мл, а концентрация свободной пантотеновой кислоты — от 15 до 40 нг/мл. Тем не менее, уменьшение суточной экскреции пантотеновой кислоты ниже 3 мг может служить указанием на ее недостаток в организме.

Для определения пантотеновой кислоты и ее производных в биологических объектах (кровь, моча, ткани) и пищевых продуктах используют микробиологические методы с применением в качестве тест-организмов *Lactobacillus arabinous* или культуры дрожжей *Saccharomyces ludwigii* КМ.

Химические методы определения пантотеновой кислоты основаны на колориметрическом измерении содержания  $\beta$ -аланина, отщепляющегося при гидролизе пантотеновой кислоты, по цветной реакции с нингидрином или 1,2-нафтохинон-4-сульфонатом.

Для выделения пантотеновой кислоты и ее производных из биологических объектов и их разделения используют разнообразные хроматографические методы.

Содержание кофермента А в тканях может быть определено по скорости ацетилирования сульфаниламида или параамнобензойной кислоты, которая в стандартных условиях пропорциональна концентрации кофермента А. Такой же прием может быть использован в качестве функционального теста обеспеченности организма пантотеновой кислотой. В этом случае исследуют экскрецию с мочой ацетилированного сульфамида или параамнобензойной кислоты после приема обследуемым стандартного количества этих подвергающихся ацетилированию субстратов.

Пантотеновая кислота применяется для профилактики и лечения ее недостаточности, особенно при нарушениях ее всасывания и усвоения. Кроме того, пияитрпная кислота применяется при полиневритах,

невралгиях, дерматитах, токсикозах беременности. Отмечен стимулирующий эффект пантотеновой кислоты на репарационные процессы при операциях и ранениях, атонии кишечника после операций на желудочно-кишечном тракте.

Антагонистом пантотеновой кислоты является ш-мстилнантотснован кислота, применяемая в экспериментальных исследованиях для быстрого создания недостаточности пантотеновой кислоты у экспериментальных животных, а также в клинических исследованиях на добровольцах.

### 1.9. Биотин (витамин Н)

В химическом отношении биотин представляет собой гексагидро-2-оксо-1Н-тиено[3,4-d]-имидазол-4-пентановую кислоту, соединение, содержащее конденсированную гетероциклическую систему имидазольного и тиофенового колец с остатком н-валериановой кислоты (рис. 1.9.1).

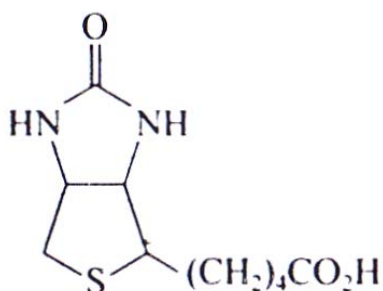


Рис. 1.9.1. Химическая структура биотина

Благодаря наличию 3 асимметричных атомов углерода возможны 8 оптических изомеров биотина и 4 рацемата. Биологической активностью обладает только природный й(+)-биотин, остальные изомеры витаминными свойствами не обладают в(+)-биотин кристаллизуется из воды в виде бесцветных тонких игл с температурой плавления 232,5 °С, а из 80%-ного спирта - в виде призм, плавящихся при 230 °С. Растворы d(+)-биотина в 0,1 н. NaOH вращают плоскость поляризованного света вправо;  $[\alpha]_{D22} + 92^\circ\text{C}$ . Биотин плохо растворим в воде и спирте (22 и 88 мг в 100 мл при 25 °С). В эфире, хлороформе и других органических растворителях биотин практически нерастворим. Биотин довольно устойчив, в том числе при нагревании в разбавленных растворах кислот и оснований, однако разрушается в концентрированных кислотах и щелочах.

Специфическая функция биотина в обмене веществ определяется тем, что он входит в состав активного центра карбоксилаз - ферментов, осуществляющих карбоксилирование органических кислот, т. е. включение в них CO<sub>2</sub> с образованием новой карбоксильной группы COOH.

Биотинзависимые карбоксилазы играют важную роль в ассимиляции животными тканями углекислоты, а также в осуществлении и регуляции ряда ответственных этапов углеводного и липидного обменов.

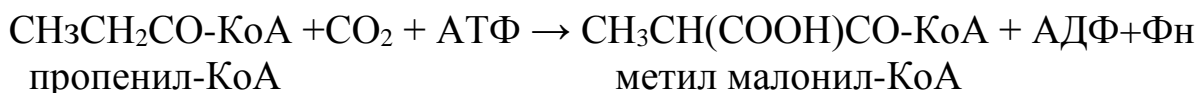
Среди реакций карбоксилирования, происходящих с участием биотина, важнейшими являются следующие:

I. Карбоксилирование остатка уксусной кислоты в форме ацетил-КоА с образованием малонил-КоА:



Эта реакция, катализируемая ацетил-КоА-карбоксилазой, является важнейшим подготовительным этапом биосинтеза жирных кислот, которые образуются в организме из ацетил-КоА путем последовательного присоединения к нему остатков малонил-КоА, в результате чего молекула жирной кислоты всякий раз наращивается на два углеродных атома.

Карбоксилирование проионовой кислоты (в форме проионил-КоА), в результате чего последний превращается в метилмалонил-КоА:



Эту реакцию катализирует биотин-зависимая пропионил-КоА-карбоксилаза. Основным источником пропионил-КоА в организме, как уже было отмечено в разделе, посвященном витамину В<sub>12</sub>, является окисление жирных кислот с разветвленным углеродным скелетом или нечетным числом атомов углерода, боковой цепочки холестерина, аминокислот изолейцина, метионина и треонина. Кроме того, пропионовая кислота может попадать в кровоток из кишечника (у животных из рубца), где она синтезируется микрофлорой. Карбоксилирование проионовой кислоты в метилмалонивую, которая затем изомеризуется в янтарную кислоту с помощью метилмалонил-КоА-изомеразы, коферментом которой является образующийся из витамина В<sub>12</sub>

дезоксиаденозилкобаламин, является единственным путем утилизации и окисления остатка проиононовой кислоты.

Карбоксилирование пировиноградной кислоты с образованием щавелевоуксусной кислоты (оксалоацетата):



Эта реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой, имеет весьма важное метаболическое и регуляторное значение, поскольку с ее помощью осуществляется непрерывное пополнение пула щавелевоуксусной кислоты, необходимой для бесперебойной работы цикла Кребса.

Кроме того, катализируемое пируваткарбоксилазой образование щавелевоуксусной кислоты является важнейшим начальным этапом глюконеогенеза - ресинтеза глюкозы из молочной и пировиноградной кислот.

Во всех перечисленных реакциях функция биогина, входящего в состав каталитического центра соответствующих карбоксилаз, состоит в том, что он осуществляет активацию  $\text{CO}_2$  путем ее присоединения с участием АТФ по N'-атому уреидной группы биотина и последующий перенос активной  $\text{CO}_2$  на тот или иной акцептор.

В каталитическом центре карбоксилаз биотин связан с белковым апоферментом посредством пептидной связи между карбоксильной группой боковой цепочки биотина и  $\epsilon$ -аминогруппой остатка лизина в молекуле апофермента.

Включение биотина в состав активного центра карбоксилаз осуществляет специальный фермент биотинлигаза. Присоединение происходит в два этапа с промежуточным образованием биогиниладенилата, активированной формы биотина, из которой он переносится на  $\epsilon$ -аминогруппу лизинового остатка апо- Арпинтя гптнетствующей каобоксилазы.

Биотин довольно широко распространен в природе. Особенно богаты им дрожжи (100 -200 мкг/100 г), печень и почки (90-100 мкг/100 г), а из растительных продуктов горох и овсяная крупа (20 мкг/100 г). Содержание биотина в молочных продуктах 3-5 мкг/100 мл, в куриных яйцах — 20 мкг/100 г, в хлебобулочных изделиях 1,2 2,5 мкг/100 г, в зеленом горошке — 5,3 мкг/100 г, в большинстве овощей и фруктов в пределах 0,1-1,5 мкг/100 г.

В сыром яичном белке присутствует гликопротеид авидин, связывающий биотин в прочный комплекс, не расщепляемый ферментами

пищеварительного тракта, и нарушающий утилизацию биотина организмом. В связи с этим прием в пищу больших количеств сырых яиц может вызвать недостаточность биотина. При варке яиц белок денатурирует и утрачивает способность связывать биотин.

Биотин в больших количествах синтезируется кишечной микрофлорой, однако биодоступность образующегося таким образом биотина и его роль в обеспечении этим витамином организма человека окончательно не определены. Точные данные о потребности человека в биотине также отсутствуют. В соответствии с рекомендациями, принятыми в США, достаточные (адекватные) уровни потребления биотина составляют: для детей первого года жизни — 10-15, от года до 10 лет — 20-30, старше 10 лет, а также для взрослых мужчин и женщин — 30 мкг в день.

Недостаточность биотина в обычных условиях у человека не наблюдается.

Основными проявлениями его дефицита, вызванного у добровольцев путем ежедневного включения в диету 200 г сырого яичного белка, являлись: пепельная бледность и шелушение кожи, атрофия вкусовых сосочков языка, мышечные боли, вялость, сонливость, потеря аппетита. У животных одним из проявлений недостаточности биотина является выпадение шерсти и дерматит по типу десквамационной себореи, гиперкератоз, отек конечностей, накопление в крови пировиноградной кислоты, ацидоз и гипогликемия.

Описаны врожденные нарушения функций биотина, обусловленные генетическими дефектами биотинзависимых карбоксилаз; врожденная недостаточность пируваткарбоксилазы, врожденная пропионатацедемия («кетотическая гиперглицинемия»), обусловленная дефектом пропионил-КоА-карбоксилазы и др.

Для количественного определения биотина предложены колориметрические методы. Один из них основан на гидролизе биотина в концентрированной кислоте и определении образующейся диаминокарбоновой кислоты по цветной реакции с нингидрином.

Во втором методе используется специфическая цветная реакция на уреидный цикл биотина с *n*-диметиламноцинамальдегидом. Чувствительность этих методов не очень велика: 100 и 10 мкг/мл. Более чувствительны (0,025- 0,5 нг/мл) микробиологические методы определения с использованием в качестве тест-организмов *Lactobacillus plantarium* 8014 ATCC, *Saccharomyces cerevisiae* 7754 ATCC *Neurospora crassa* и др. Однако эти микроорганизмы способны использовать не только

биотин, но и некоторые его аналоги и метаболиты, не активные для человека, что затрудняет определение истинного содержания биотина в биологических объектах и является одной из причин большой variability получаемых данных.

Биотин находит применение при циррозе печени, сахарном диабете и некоторых других заболеваниях, нарушающих его утилизацию. Имеются данные о положительном влиянии биотина при некоторых кожных заболеваниях, в частности псориазе, при нарушениях липидного обмена, сердечно-сосудистых заболеваниях.

## **Лабораторная работа № 1.1**

### **Качественные реакции водорастворимых витаминов**

**Цель работы:** доказать наличие водорастворимых витаминов в исследуемом сырье и препаратах, используя их характерные химические свойства.

**Оборудование и химическая посуда:** штатив с пробирками, фильтровальная бумага, воронки, пипетка, источник ультрафиолетового излучения, спиртовка, спектрофотометр, ступка с пестиком, кварцевый песок.

**Реактивы и материалы:** пробы фруктовых соков (апельсинового, лимонного и др.); препарат витамина В<sub>1</sub>; дрожжи; препарат рибофлавина; сухие препараты витамина РР (никотиновая кислота и никотинамид); препарат витамина В<sub>6</sub>; препарат витамина В<sub>12</sub>; фолиевая кислота; раствор гидроксида калия (KOH) или гидроксида натрия (NaOH) 0,005 моль/дм<sup>3</sup>, 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, 5%-й, 10%-й; раствор соляной кислоты (HCl) концентрированный, 10%-й; концентрированная сульфатная кислота (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); ледяная этановая кислота (CH<sub>3</sub>COOH); 5%-й раствор гексациано-(III) феррата калия (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]); 1%-й раствор хлорида железа (III) (FeCl<sub>3</sub>); 10%-й раствор карбоната натрия (NaCO<sub>3</sub>); 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствор нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>); 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствор нитрата или ацетата ртути (I) (HgNO<sub>3</sub>); 5%-ный раствор сульфата меди (CuSO<sub>4</sub>); 5%-ный раствор роданида аммония (NH<sub>4</sub>SCN); 0,1%-ый раствор тетраоксоманганата калия KMnO<sub>4</sub>; 0,1%-ый раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,02%-й раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 0,04%-ный раствор 2,6-дихлорхинон-N-



хлоримида в бутиловом спирте; раствор Люголя; аммиачный буферный раствор (см. ниже); бутиловый или изоамиловый спирт; раствор диазореактива (см. ниже); 10%-ый раствор тиомочевины; гидросульфит натрия ( $\text{NaHSO}_3$ ); цинк металлический; безводный карбонат натрия ( $\text{NaCO}_3$ ).

**Приготовление раствора диазореактива.** В мерную колбу емкостью  $100 \text{ см}^3$  помещают  $0,90 \text{ г}$  сульфаниловой кислоты,  $9 \text{ см}^3$  концентрированной соляной кислоты,  $60\text{-}70 \text{ см}^3$  воды, перемешивают и доводят водой до метки.  $5 \text{ см}^3$  приготовленного раствора помещают в мерную колбу емкостью  $100 \text{ см}^3$ , поставленную на лед, прибавляют  $2,5 \text{ см}^3$  10%-ного раствора нитрита натрия и смесь оставляют на льду в течение 5 минут. Затем прибавляют ещё  $10 \text{ см}^3$  10%-ного раствора нитрита натрия, перемешивают, выдерживают на льду 5 минут и доводят водой до метки. Хранят в холодильнике. Реактив годен в день приготовления.

**Приготовление аммиачного буферного раствора.**  $5,4 \text{ г}$  хлорида аммония растворяют в воде, добавляют  $35 \text{ см}^3$  25%-ного раствора аммиака и доводят водой до  $100 \text{ см}^3$ .

## Методика выполнения работы

### *Опыт 1. Качественные реакции L-аскорбиновой кислоты.*

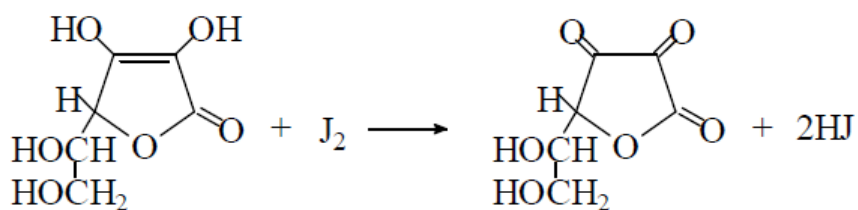
Качественные реакции на витамин С основаны на способности L-аскорбиновой кислоты легко вступать в окислительно-восстановительные реакции с образованием дегидро-L-аскорбиновой кислоты.

#### *а) Взаимодействие витамина С с гексациано-(III) ферратом калия*

Аскорбиновая кислота, окисляясь, восстанавливает гексациано-(III) феррат калия  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  до гексациано-(II) феррата калия  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , который с ионом железа в степени окисления +3 образует в кислой среде берлинскую лазурь.

К 1 мл сока прибавляют 2 капли 5%-ного раствора гидроксида калия, 2 капли 5%-ного раствора гексациано-(III) феррата калия и энергично встряхивают содержимое пробирки. Затем добавляют 6-8 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 1-2 капли 1%-ного раствора хлорида железа(III). Выпадает синий осадок берлинской лазури.





### **Опыт 2. Качественные реакции тиамин (витамина В<sub>1</sub>).**

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. 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 тиамин в растворах.

#### *а) Тиохромная реакция на тиамин*

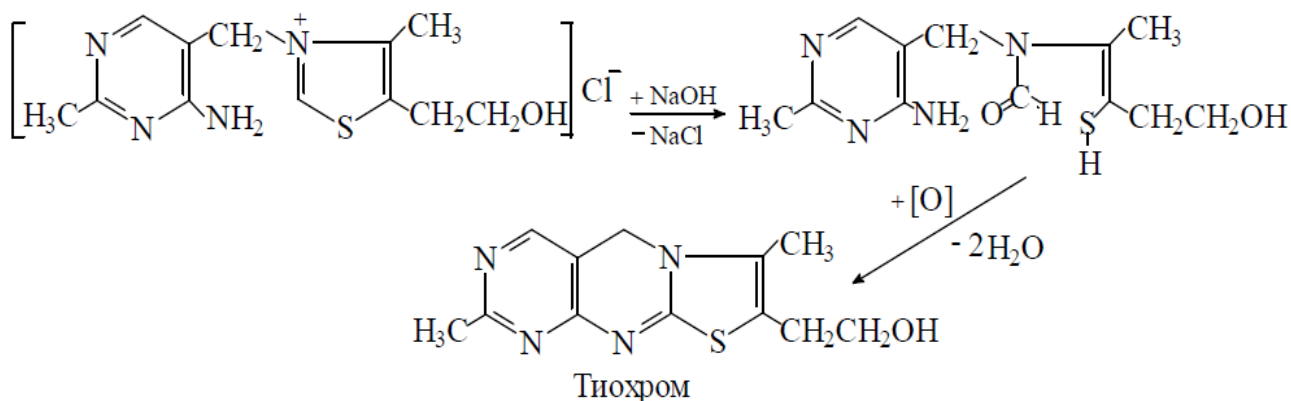
*Анализ субстанций.* 0,01 г препарата витамина В<sub>1</sub> (тиамин хлорид, тиамин бромид, фосфотиамин, кокарбоксилаза) растворяют в 5 мл воды.

*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 минуты и фильтруют. Отбирают 5 мл фильтрата.

*Открытие тиамин в дрожжах.* 10 г сухих дрожжей тщательно растирают в ступке, добавляя постепенно 10 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Суспензию центрифугируют, из надосадочного раствора отбирают 5 мл для анализа.

К анализируемой пробе добавляют 1 мл 5%-ного раствора гексоцианоферрата (III) калия (красная кровяная соль), 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, тщательно перемешивают и оставляют на три минуты. Затем добавляют 5 мл бутилового или изоамилового спирта,

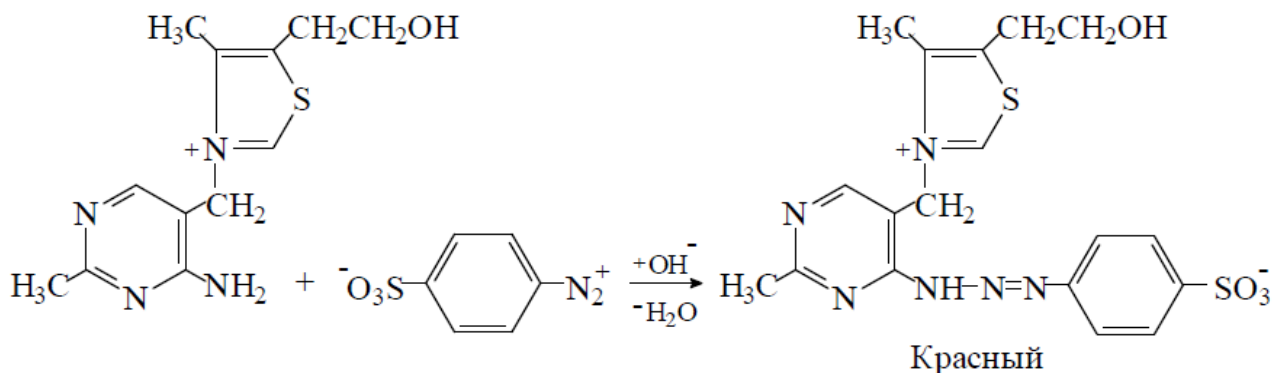
хорошо встряхивают в течении 2 минут и дают отстояться. В верхнем спиртовом слое возникает наблюдаемая в ультрафиолетовом свете синяя флуоресценция, исчезающая при подкислении и вновь возникающая при подщелачивании раствора.



*б) Реакция тиамин с диазореактивом*

5-10 мг субстанции витамина В<sub>1</sub> растворяют в 1 мл воды, добавляют 1 мл раствора диазореактива и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-го раствора карбоната натрия.

На границе двух жидкостей образуется оранжево-красное кольцо.



**Опыт 3. Качественные реакции рибофлавина (витамина В<sub>2</sub>).**

Водные растворы рибофлавина имеют зеленовато-желтую окраску и интенсивную зеленую флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. При подкислении или подщелачивании раствора флуоресценция исчезает, но зеленовато-желтая окраска сохраняется. Добавление к водному раствору рибофлавина какого-либо восстановителя приводит к переходу желтого рибофлавина сначала в родофлавин (промежуточное соединение)

красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин. Флуоресценция при этом тоже исчезает. Эти специфические свойства используются как для идентификации, так и для количественного определения рибофлавина флуориметрическим методом в лекарственных препаратах, пищевых продуктах и биологических объектах. Зависимость флуоресценции рибофлавина от рН раствора, а также изменение её с течением времени вследствие происходящих фотохимических реакций накладывают определенные ограничения на условия количественного флуоресцентного анализа.

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.

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

*а) Идентификация рибофлавина флуоресцентным методом*

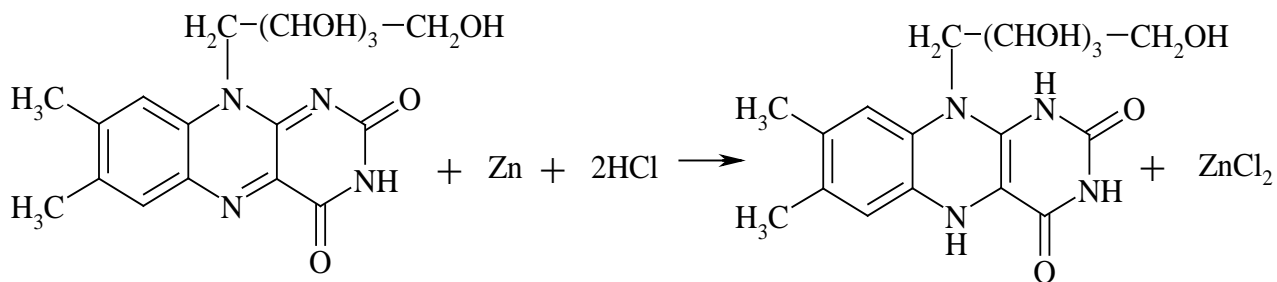
1 мг препарата растворяют в 100 мл воды – раствор имеет яркую зеленовато-желтую окраску. При просматривании в ультрафиолетовом свете наблюдается интенсивная зеленая флуоресценция.

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 флуоресценция отсутствует; в третьей пробирке исчезают и окраска, и флуоресценция.

*б) Реакция восстановления витамина В<sub>2</sub>*

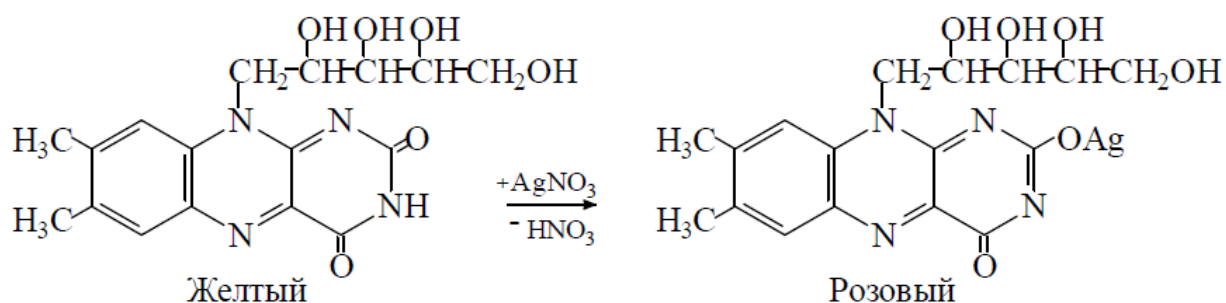
В пробирку наливают 10 капель взвеси рибофлавина в воде, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Наблюдают бурное выделение пузырьков водорода и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается.



При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавина вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

*в) Взаимодействие рибофлавина с солями серебра и ртути*

К 1 мл раствора рибофлавина добавляют 0,5 мл 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора нитрата серебра. Появляется розовое или красное окрашивание (интенсивность окраски пропорциональна концентрации рибофлавина). К 1 мл раствора рибофлавина добавляют 0,5 мл 0,1М раствора нитрата или ацетата ртути. Появляется оранжево-красное окрашивание.



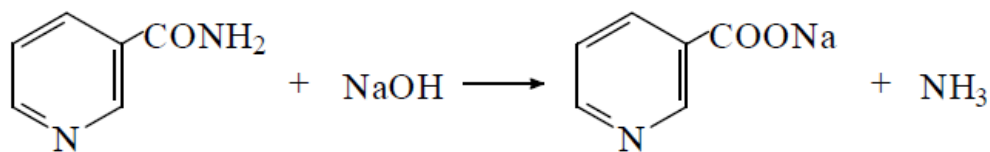
**Опыт 4. Качественные реакции витамина РР.**

Общей цветной реакцией на производные пиридина, и в том числе на никотиновую кислоту и её амид, является реакция образования производных глутаконового альдегида (полиметиновых красителей).

При кипячении производного пиридина с 2,4-динитрохлорбензолом в спирте образуется соответствующий N-(2,4-динитрофенил)пиридиний хлорид желтого 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 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствором гидроксида натрия. При этом в случае никотинамида ощущается запах аммиака, а в опыте с никотиновой кислотой запах отсутствует:

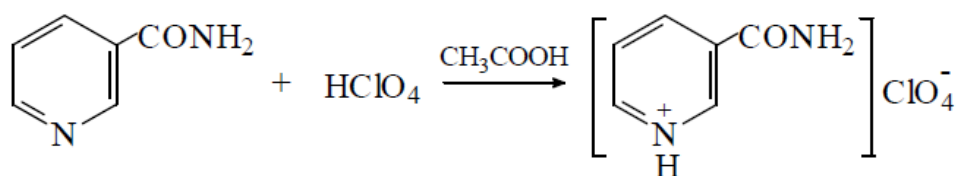


Никотиновая кислота образует малорастворимые соли с ионами тяжелых металлов. Например, при реакции с сульфатом меди образуется осадок синего цвета. В присутствии роданид-ионов образуется комплексная соль зеленого цвета. Никотинамид синего осадка с сульфатом меди не дает.

Реакция никотиновой кислоты с сульфатом меди также используется и для количественного йодометрического анализа растворов никотиновой кислоты.

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

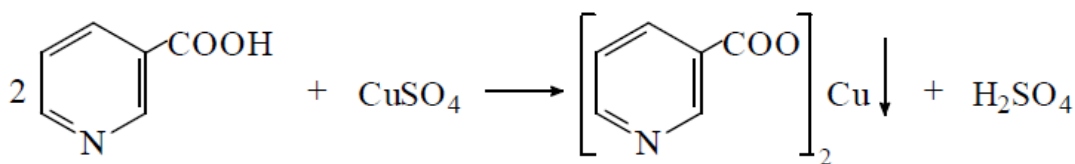
Никотинамид количественно определяют методом неводного титрования 0,1М раствором хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте:



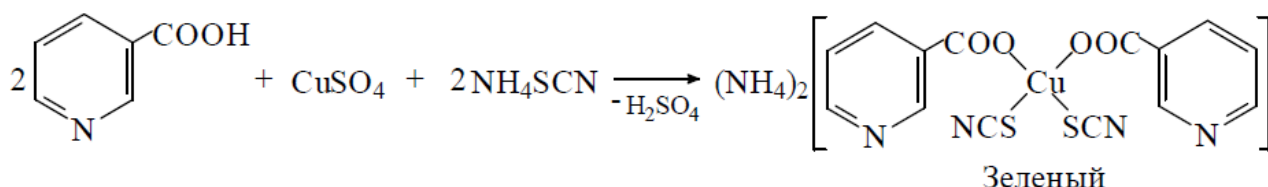
*а) Идентификация никотиновой кислоты в растворе*

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

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

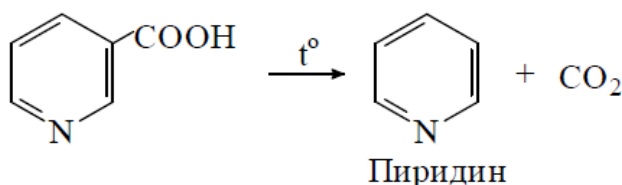


К 10 мл такого же раствора прибавляют 0,5 мл 10%-ного раствора сульфата меди и 2 мл 5%-ного раствора роданида аммония. Появляется зеленое окрашивание.



*б) Идентификация сухой никотиновой кислоты*

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



*в) Реакция обнаружения аминогруппы в никотинамиде*

В пробирку помещают 5-10 мг порошка витамина РР, прибавляют 2 мл 0,1М раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Ощущают запах образующегося аммиака.

**Опыт 5. Качественные реакции витамина 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 *пара*-положению к фенольному гидроксилу.

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

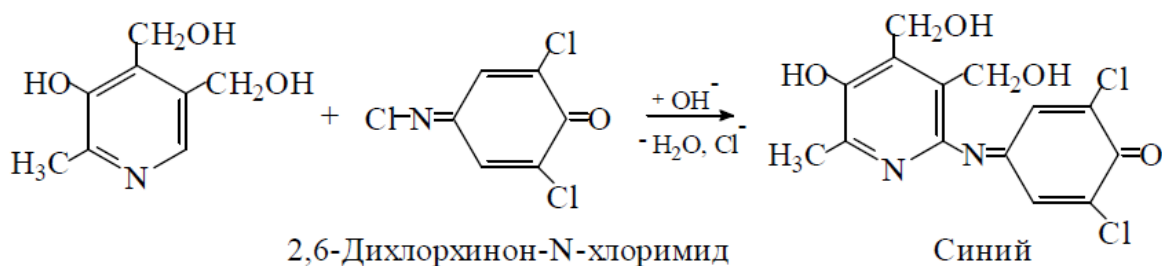
Также легко пиридоксин вступает в реакцию азосочетания с солями диазония с образованием окрашенных в красный цвет азокрасителей. Эта реакция применяется для количественного фотоэлектроколориметрического анализа витаминов группы В<sub>6</sub>.

*Идентификация витаминов группы В<sub>6</sub>*

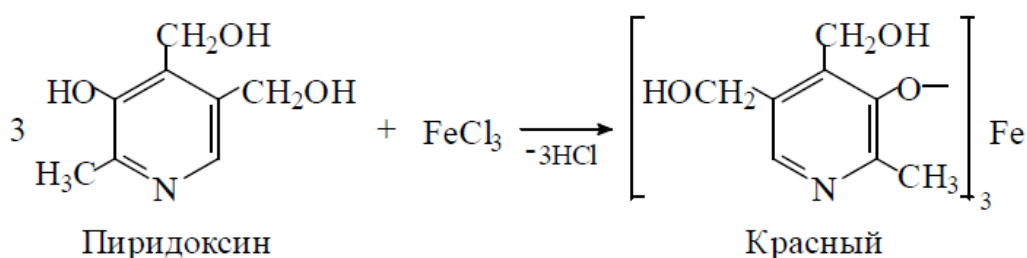


Около 3-4 мг пиридоксина гидрохлорида (на кончике скальпеля) растворяют в 3 мл воды и раствор разливают по 1 мл в три пробирки:

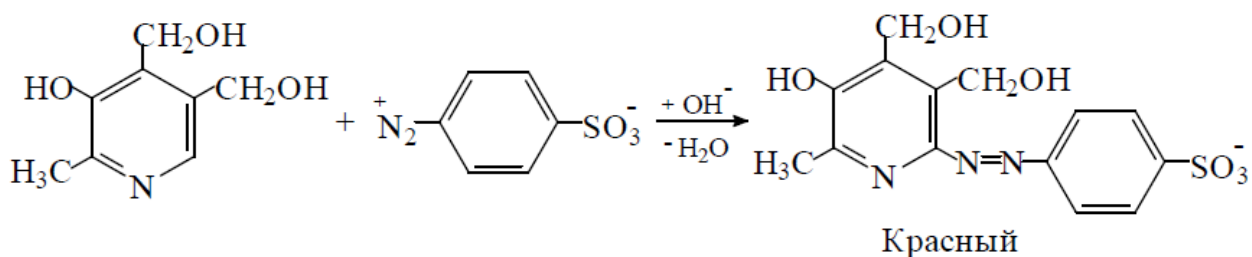
а) в первую пробирку добавляют 2 мл аммиачного буферного раствора, 1 мл 0,04%-ного раствора 2,6-дихлорхинон-N-хлоримида в бутиловом спирте, 2 мл бутилового спирта и встряхивают в течение 1 мин. Слой бутилового спирта окрашивается в голубой цвет:



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 1 моль/дм<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия и 1 мл диазореактива, появляется красное окрашивание.



### ***Опыт 6. Качественные реакции витамина В<sub>12</sub>.***

Идентификацию и количественное определение цианокобаламина 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 также проводят, измеряя оптическую плотность раствора при 361 нм.

#### ***а) Идентификация 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.

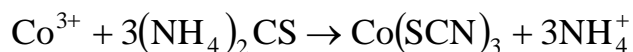
Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 361 нм в кювете толщиной 1 см, используя в качестве контрольного раствора воду.

#### ***б) Определение кобальта в составе витамина В<sub>12</sub>***

В состав витамина В<sub>12</sub> входит кобальт. В результате взаимодействия ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

Содержимое одной ампулы с кобаламином переносят в пробирку, добавляют 3-5 капель концентрированной серной кислоты и нагревают до обесцвечивания в пламени спиртовки, установленной в вытяжном шкафу с включенной тягой. По окончании минерализации в пробирку осторожно, медленно, при постоянном перемешивании добавляют 1 мл дистиллированной воды.

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10%-го раствора тиомочевинной, осторожно высушивают над пламенем спиртовки. Затем наносят 1-2 капли минерализата В<sub>12</sub> и осторожно нагревают фильтр над пламенем спиртовки. На фильтре, чаще ближе к краю, появляется зеленое окрашивание:



### ***Опыт 7. Качественные реакции фолиевой кислоты.***

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.

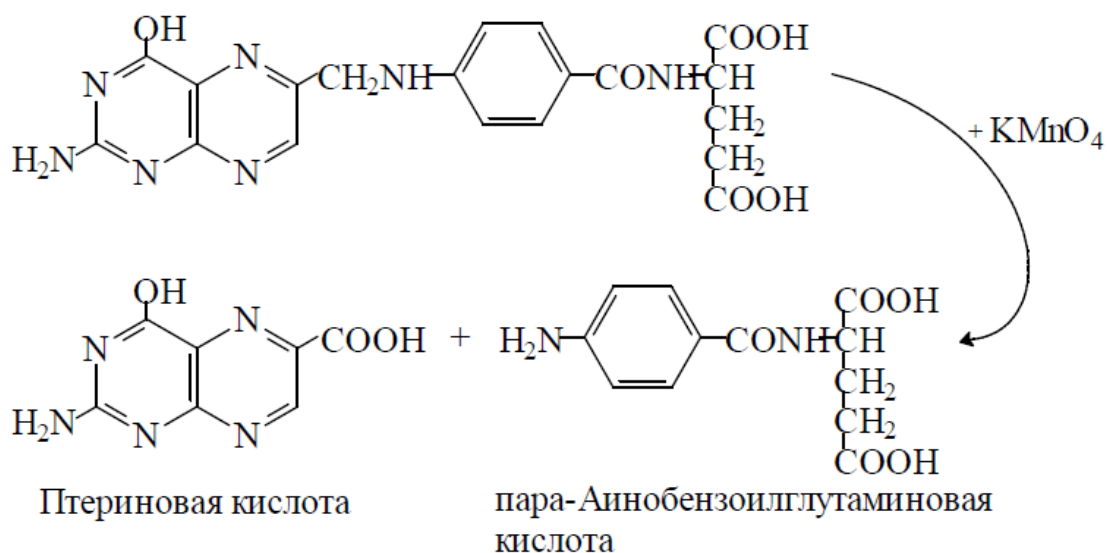
Эта реакция используется для идентификации фолиевой кислоты и для её количественного флюоресцентного анализа.

*а) Идентификация фолиевой кислоты в пищевых дрожжах*

В ступку помещают 1 г дрожжей, прибавляют 10 мл 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора NaOH, 2 г кварцевого песка и растирают в течение 5 мин. Затем центрифугируют в течение 15 мин.

К 10 каплям надосадочной жидкости приливают 20 капель ледяной уксусной кислоты (рН=3,0) и 10 капель раствора KMnO<sub>4</sub> так, чтобы розовая окраска не исчезала в течение 10 мин (при её исчезновении следует прилить ещё несколько капель KMnO<sub>4</sub>). Через 10 мин избыток перманганата калия удаляют путем добавления 4–5 капель раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и приливают 0,005 моль/дм<sup>3</sup> раствора NaOH (около 5 мл) до рН 4,0–4,5.

При ультрафиолетовом облучении фолиевой кислоты в щелочном растворе наблюдается интенсивная голубая флюоресценция.



*б) Идентификация фолиевой кислоты спектрофотометрическим методом*

УФ-спектр 0,001%-ного раствора препарата в 0,1 моль/дм<sup>3</sup> растворе гидроксида натрия имеет максимумы поглощения при 256, 283, 365 нм. Отношение оптических плотностей должно быть  $D_{256 \text{ нм}} / D_{365 \text{ нм}} = 2,8-3,0$

## **Лабораторная работа 1.2**

### **Особенности определения массовой доли аскорбиновой кислоты в зависимости от вида сырья**

**Цель работы:** Определение содержания аскорбиновой кислоты в разных пищевых продуктах.

**Оборудование и химическая посуда:** конические колбы, мерные цилиндры, градуированные пипетки, бюретка, рН-милливольтметр, микробюретка, магнитная мешалка, бумажные фильтры, воронки, центрифуга.

**Реактивы и материалы:** раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, с молярной концентрацией эквивалента 0,001 моль/дм<sup>3</sup>; стандартный раствор аскорбиновой кислоты, 0,01%; трилон Б (ЭДТА); щавелевая кислота, 2%-й раствор; хлоридная кислота, 2% раствор; трихлорэтановая кислота, 3% раствор; метафосфорная кислота, 6% раствор; раствор цистеина в растворе хлоридной кислоты, раствор дигидрофосфата калия.

**Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия с молярной концентрацией эквивалента 0,001 моль/дм<sup>3</sup>.** 30-35 мг сухой натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола помещают в мерную колбу ёмкостью 200 см<sup>3</sup>, добавляют 120-150 см<sup>3</sup> воды и 4-5 капель 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствора едкого натра, взбалтывают в течение 10-15 мин и оставляют на ночь. Раствор доводят водой до метки и фильтруют в стакан из темного стекла. При хранении в холодильнике раствор годен в течение недели. Титр раствора проверяют ежедневно.

**Приготовление раствора цистеина в растворе соляной кислоты.** 50 мг цистеина растворяют в 4 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты плотностью 1,19 г/см<sup>3</sup> и перемешивают. Раствор готовят в день использования.

### **Методика выполнения работы**

Определение витамина С в биологически активных добавках к пище основан на определении непосредственно L-аскорбиновой кислоты (АК).

Для целей рутинного анализа наиболее легко и доступно определение методом визуального титрования с использованием количественного окисления аскорбиновой кислоты раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Однако этот метод применяется только для объектов исследования, дающих слабоокрашенные экстракты. При определении аскорбиновой кислоты в окрашенных смесях (ягоды, окрашенные овощи) в анализируемую смесь добавляют хлороформ и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски хлороформного слоя. Также используют метод потенциометрического титрования, спектрофотометрический и флуорометрический методы анализа, которые применимы для любых объектов исследования.

Следует отметить, что титриметрическим методом не определяется другая форма витамина С - L-дегидроаскорбиновая кислота (ДАК), и результаты получаются заниженными. Поэтому при возникновении разногласий в оценке качества сырья и готовой продукции, в том числе витаминизированной, пробу предварительно обрабатывают каким-либо восстановителем. Раньше использовали сероводород, сейчас ГОСТ 24556-89 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С» рекомендует хлорид цистеина

### ***1. Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.***

К 1 см<sup>3</sup> стандартного раствора аскорбиновой кислоты добавляют 9 см<sup>3</sup> выбранного экстрагирующего раствора и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до розового окрашивания, не исчезающего в течение 15-20 с ( $V_m$ ). Таким же образом титруют 10 см<sup>3</sup> экстрагирующего раствора ( $V_k$ ). Титр раствора, в мг витамина С, эквивалентных 1 см<sup>3</sup> раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, вычисляют по формуле 1.1:

$$T = \frac{K}{V_m - V_k} \quad (1.1)$$

где  $K$  - количество аскорбиновой кислоты в 1 см<sup>3</sup> стандартного раствора, мг.

### ***2. Подготовка средней пробы к анализу.***

Подготовка проб к анализу осуществляется непосредственно перед анализом. Выделения витамина необходимо осуществлять как можно

быстрее, без использования повышенной температуры, не на ярком свете и при минимальном контакте образца с кислородом воздуха.

*Подготовка растительного материала к анализу.* При исследовании картофеля с каждого клубня вырезают сектор вроде лимонной дольки, чтобы захватить все слои клубни. При анализе кочанной капусты делают срез через все слои кочана. Томаты и другие сочные плоды режут по вертикальной оси на 4-6 частей и для исследования берут одну часть. Пробы, взятые из нескольких клубней, початков, плодов, составляют среднюю пробу. Среднюю пробу плодов, овощей, листьев разрезать ножом из нержавеющей стали на стеклянной пластинке. Мелкие плоды и ягоды растереть в ступке. При исследовании вишен, черешен, слив удаляют косточки. Листья режут на куски.

Из измельченной и перемешанной пробы берут навеску не менее 0,5-1 г, взвешенную с погрешностью плюс-минус 0,0001 г. При расчете массы необходимой навески можно пользоваться следующей формулой 1.2:

$$m = \frac{10 \cdot V_{заг}}{V_{пр} \cdot B_{заявл}} \quad (1.2)$$

где  $m$  - масса навески исследуемого образца, г;  $V_{общ}$  - общий объём экстракта, см<sup>3</sup>;  $V_{пр}$  - объём экстракта, взятого на титрование, см<sup>3</sup>;  $B_{заявл}$  - заявленное содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом образце, мг/100 г.

*Подготовка жидкого материала к анализу.* Навеску жидких проб (витаминизированные соки, напитки и т.п.) отбирают пипеткой. Навеску проб густой консистенции (сиропы, концентраты и др.), которые плохо стекают из пипетки, берут весовым путем подобно твердым продуктам. Потом в этих пробах определяют по общим правилам плотность для перечисления содержания витамина на единицу объема.

*Подготовка пробы молока.* В коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> взвешивают 50.0±0.1 г молока, пипетками вносят 4 см<sup>3</sup> насыщенного раствора щавелевой кислоты и 10 см<sup>3</sup> насыщенного раствора хлорида натрия. После добавления каждого реактива содержимое колбы перемешивают и через 3-5 мин фильтруют через сухой складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>.

### **3. Приготовление экстракта.**

Для приготовления экстракта рассчитанную массу навески взвешивают с погрешностью ±0,0001 г. Потом гомогенизируют ее с

небольшим количеством выбранного экстрагирующего агента, после чего полученный гомогенат количественно переносят в мерную колбу или мерный цилиндр объемом  $V_{общ}$ , доводят до метки экстрагирующим агентом, тщательно перемешивают, настаивают 5-10 мин и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Для жидких пищевых добавок необходимое количество материала отмеряют пипеткой и доводят до метки экстрагирующим агентом в соответствующей мерной колбе.

Различные экстрагирующие растворы представлены в таблице 1.2:

Таблица 1.2.

Экстрагирующие растворы для определения аскорбиновой кислоты

Экстрагирующий агент	Область применения
2 % хлоридная кислота	Дражированные, таблетированные, капсульные, кристаллические формы БАД; обогащённые продукты питания. Без длительного сохранения экстрактов. Кроме продуктов с высоким содержанием белка
2 % щавелевая кислота	То же, но возможно сохранение экстрактов в течение 4-5 ч
3 % трихлорэтановая кислота	Для всех видов БАД и обогащённых продуктов питания, включая продукты с высоким содержанием белка
Смесь этановой и метафосфорной кислот	То же
6 % метафосфорная кислота	То же, возможно сохранение экстрактов в течение 4-5 ч

#### **4. Определение витамина С в образцах, которые дают неокрашенные или слабоокрашенные экстракты.**

Для определения аскорбиновой кислоты 1-10 см<sup>3</sup> экстракта с общим содержанием аскорбиновой кислоты около 0,1 мг вносят пипеткой в коническую колбу вместимостью 50 или 100 см<sup>3</sup>, доводят объем экстрагентом до 10 см<sup>3</sup> и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 15-20 сек. Аналогично титруют равный объем экстрагирующего агента (контроль на реактивы).

#### **5. Обработка результатов измерения.**

Содержание аскорбиновой кислоты (X), выраженный в мг на 100 г продукта вычисляют по формуле 1.3:

$$X = \frac{T \cdot (V_m - V_k) \cdot V_{заг} \cdot 100}{V_{np} \cdot m} \quad (1.3)$$

где  $T$  - титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, мг/см<sup>3</sup>;  $V_m$  - объём раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование исследуемого раствора, см<sup>3</sup>;  $V_k$  - объём раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, который пошёл на контрольное испытание, см<sup>3</sup>;  $V_{общ}$  - общий объём экстракта, см<sup>3</sup>;  $V_{np}$  - объём экстракта, взятого на титрование, см<sup>3</sup>;  $m$  - масса навески исследуемого образца.

### **6. Определение витамина С в образцах, которые дают окрашены экстракты.**

Взятие пробы на анализ проводят, как указано в пп. 1.2. Окрашенную пробу помещают в стаканчик для титрования, добавляют 5 см<sup>3</sup> 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 1.3.

### **7. Потенциометрическое титрование.**

В стакан объемом 50 см<sup>3</sup> вносят пипеткой объём экстракта, содержащего около 0,1 мг аскорбиновой кислоты (но не более 25 см<sup>3</sup>), добавляют экстрагирующий раствор примерно до объема 30 см<sup>3</sup>, погружают электроды рН-милливольтметра так, чтобы при перемешивании они не касались магнитного стержня мешалки.

Потом титруют потенциометрически из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия порциями добавляют порциями по 0,1-0,2 см<sup>3</sup> при постоянном перемешивании. Записывают показания прибора в милливольттах, что соответствует каждому добавляемому объёму раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

Объём раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, который соответствует точке эквивалентности устанавливают по максимальной разнице двух соседних показаний прибора или по потенциометрической кривой зависимости величины потенциала в милливольттах от объёма раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

Одновременно проводят контрольное титрование для определения содержания в продукте восстанавливающих веществ, так, как указано выше.



За результат титрования принимают среднее арифметическое результатов двух титрований одного экстракта. Вычисления проводят до четырех значащих цифр после запятой, результат округляют до трех значащих цифр. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 3 % от среднего арифметического значения при доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

При повторном титровании в области предполагаемой точки эквивалентности раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия добавляют по 1-2 капли.

Расчет содержания аскорбиновой кислоты проводят по формуле 1.3.

### ***8. Определение витамина С при возникновении разногласий в оценке качества сырья и готовой продукции.***

Экстрагирование витамина С проводят, как указано в пп 1, 2.

От 10 до 20 см<sup>3</sup> экстракта пипеткой наливают в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>. Одновременно в стакан ёмкостью 50 см<sup>3</sup> вносят такой же объём экстракта и доливают порциями раствор фосфорнокислого калия двозамещённого до рН 7,0-7,5, измеряя его с помощью рН-метра. Отмечают объём раствора фосфорнокислого калия. После этого в колбу с экстрактом вносят 50 мг цистеина или его раствор, перемешивают до растворения и добавляют установленный объём фосфорнокислого калия. Колбу закрывают пробкой и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 30 минут. После этого раствор в колбе охлаждают, подкисляя раствором серной кислоты до рН, близкой к нулю, и снова охлаждают. Необходимый для подкисления объём серной кислоты также устанавливают предварительно с помощью рН-метра, используя для этого стакан с экстрактом после добавления в него фосфорнокислого калия. Раствор в колбе доводят до метки экстрагирующим раствором и перемешивают.

В колбу ёмкостью 50 или 100 см<sup>3</sup> для визуального титрования или стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> для потенциметрического титрования вносят пипеткой от 10 до 20 см<sup>3</sup> полученного раствора добавляют 2-3 см<sup>3</sup> раствора формальдегида, закрывают крышкой и выдерживают 8 мин, добавляют раствор метафосфорной кислоты до объёма 30 см<sup>3</sup>. Потом титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия: светлые растворы визуальным титрованием, тёмные - потенциметрическим титрованием, как указано выше.

За результат титрования принимают среднее арифметическое результатов двух титрований одного раствора.

### **9. Обработка результатов определения.**

Массовую долю витамина (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{T \cdot V_m \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_{np} \cdot V_3 \cdot m} \quad (1.4)$$

где  $T$  – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, мг/см<sup>3</sup>;  $V_m$  – объём раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование исследуемого раствора, см<sup>3</sup>;  $V_1$  – объём экстракта, который получен при экстракции витамина С из навески исследуемого продукта, см<sup>3</sup>;  $V_2$  – объём раствора, полученного после восстановления, см<sup>3</sup>;  $V_3$  – объём экстракта, который был восстановлен, см<sup>3</sup>;  $V_{np}$  – объём раствора, взятого на титрование, см<sup>3</sup>;  $m$  – масса навески исследуемого образца.

За результат титрования принимают среднее арифметическое результатов двух титрований одного экстракта. Вычисления проводят до четырех значащих цифр после запятой, результат округляют до трех значащих цифр. Расхождение между двумя параллельными определениями не должен превышать 3% от среднего арифметического значения при доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

### **10. Анализ полученных результатов.**

Сравните полученные данные с литературными. Сделайте выводы.

## **Лабораторная работа № 1.3**

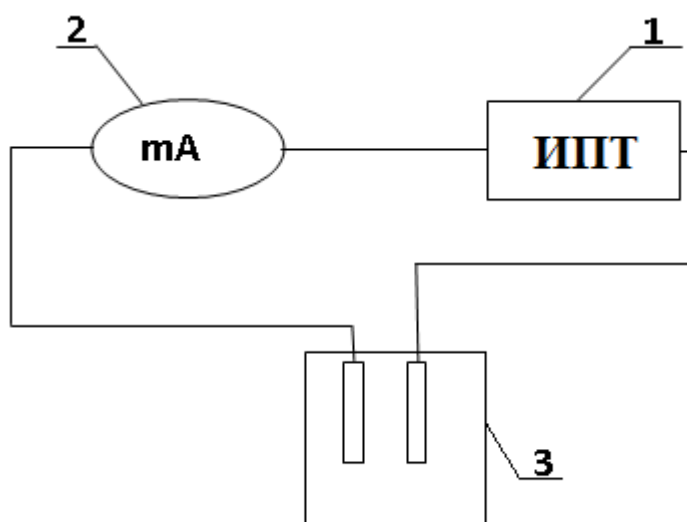
### **Определение массовой доли L-аскорбиновой кислоты в витаминных препаратах и настоях методом кулонометрического титрования**

**Цель работы:** методом амперостатической кулонометрии определить содержание аскорбиновой кислоты в исследуемых образцах фруктовых соков и экстрактов лекарственных растений, сравнить полученные данные с литературными.

**Оборудование и химическая посуда:** установка для кулонометрического титрования (рис. 1.1); секундомер; пипетки объёмом

2,00 и 10,00 см<sup>3</sup>; цилиндр мерный объёмом 100 см<sup>3</sup>; стаканы химические объёмом 50 и 100 см<sup>3</sup>.

**Реактивы и материалы:** пробы фруктовых соков (апельсинового, лимонного и др.) или экстрактов лекарственных растений для анализа; калий йодид (KI), 20%-й водный раствор; крахмал, свежеприготовленный 1%-й водный раствор.

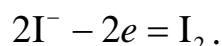


**Рисунок 1.3.** – Схема установки для кулонометрического титрования: 1 – источник постоянного тока; 2 – миллиамперметр; 3 – электрохимическая ячейка.

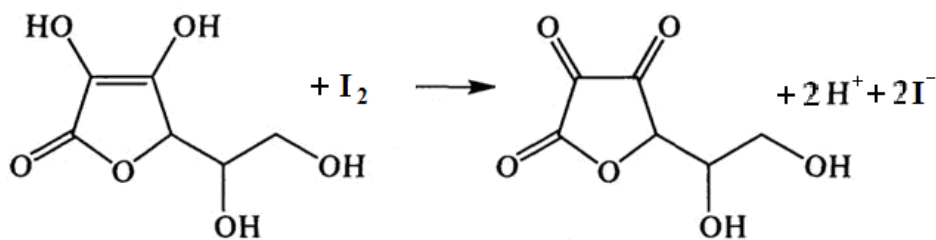
### Методика выполнения работы

В данной работе кулонометрическое определение аскорбиновой кислоты основывается на её окислении электрогенерированным йодом, который получают из водного раствора KI. Конечную точку титрования определяют визуально (индикатор – крахмал).

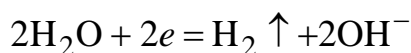
При электролизе йодид-ионы вспомогательного реагента разряжаются на графитовом аноде:



При этом генерируется «титрант» – йод, который вступает в реакцию с аскорбиновой кислотой:



На вспомогательном графитовом катоде проходит электродная реакция:



с образованием газообразного водорода.

Цепочка эквивалентности выглядит как  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \equiv \text{I}_2 \equiv 2e^-$ . Фактор эквивалентности аскорбиновой кислоты равен  $\frac{1}{2}$ , молярная масса эквивалента – 88 г/моль.

Когда вся аскорбиновая кислота прореагирует с электрогенерированным йодом, первая же порция избытка йода, образование которого продолжается на генераторном электроде, взаимодействует с крахмалом, вследствие чего раствор приобретает синий цвет.

### **1. Подготовка к анализу.**

Собрать установку для кулонометрического титрования по схеме на рис. 1.1. Рабочий электрод – анод. Вспомогательный электрод поместить в капилляре Лугина. В электрохимическую ячейку внести 70,0 мл раствора калий йодида, 1 мл раствора крахмала.

### **2. Предварительное титрование.**

Сначала, с целью оценки времени, целесообразно провести предварительное титрование исследуемого раствора. Для этого в электрохимическую ячейку внести 2,00 мл исследуемого сока или экстракта, включить магнитную мешалку, одновременно с замыканием электрической цепи установки включить секундомер и провести электролиз при постоянном токе в 4 мА до появления синего окрашивания раствора, после чего сразу же разомкнуть электрическую цепь и выключить секундомер.

### 3. Определение содержания витамина С.

Точное титрование исследуемого раствора проводим как предварительное титрование.

Определение следует провести 4 раза, добавляя в электрохимическую ячейку аликвоту в 2,00 мл сока или экстракта.

Результаты титрования записать в лабораторный журнал.

### 4. Обработка результатов измерения.

Содержание аскорбиновой кислоты (мг/100 мл) для каждого параллельного определения рассчитать по формуле:

$$m_X = \frac{I \cdot t \cdot 88 \cdot 100}{96500 \cdot V_{\text{п}}},$$

где  $I$  - сила тока, мА;  $t$  - время титрования аликвоты исследуемого раствора, с;  $V_{\text{п}}$  - объём пипетки.

### 5. Анализ полученных результатов.

Полученные результаты сравните с литературными данными (табл. 1.3.1). Сделайте выводы.

**Таблица 1.3.1.** Содержание аскорбиновой кислоты в фруктовых соках и экстрактах

Пищевой продукт	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 мл
Шиповник	до 2100
Облепиха	до 500
Чёрная смородина	до 300
Клюква	63...128
Клубника	56...87
Апельсин	25...80
Лимон	37...63
Грейпфрут	28...44
Помидоры	8...32
Бананы	5...17
Яблоки	3...15

## Лабораторная работа № 1.4

### Определение массовой доли пиридоксина гидрохлорида (витамина В<sub>6</sub>) в чистых препаратах

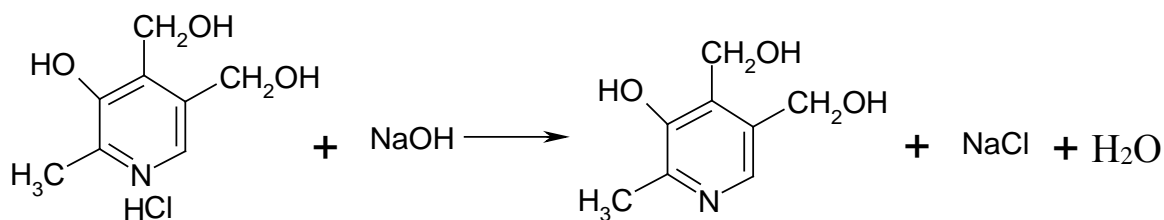
**Цель работы:** методом кислотно-основного титрования определить содержание гидрохлоридпиридоксина в медицинском ампульном препарате, сравнить полученные данные с заявленным в инструкции содержанием.

**Оборудование и химическая посуда:** химический стакан объёмом 50,0 см<sup>3</sup>; колбы конические объёмом 100 см<sup>3</sup>; пипетки объёмом 2,00 см<sup>3</sup>; цилиндр мерный объёмом 50 см<sup>3</sup>; микробюретка объёмом 2-5 см<sup>3</sup>.

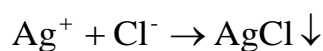
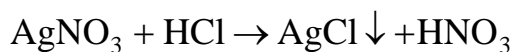
**Реактивы и материалы:** бромтимоловый синий, 0,1%-й водно-спиртовой раствор; ампулы гидрохлоридпиридоксина; раствор гидроксида натрия (NaOH), водный раствор с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup>; нитрат серебра (AgNO<sub>3</sub>), водный раствор с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup>; дихромат калия (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), насыщенный раствор (40%).

#### Методика выполнения работы

В данной работе определение гидрохлоридпиридоксина проводится методом кислотно-основного титрования с индикатором бромтимоловый синий. Определение основано на реакции гидрохлорида пиридоксина с гидроксидом натрия по реакции:



Для контроля выделившуюся при реакции соляную кислоту оттитровывают раствором нитрата серебра:



Индикатором для определения конца реакции служит калия бихромат. Произведение растворимости  $\text{AgCl}$  (белый) меньше чем  $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (оранжевый), поэтому дихромат серебра не будет образовываться пока в растворе есть хлорид-ионы и образующийся при титровании осадок будет сохранять белый цвет.

### ***1. Подготовка пробы к анализу.***

Из партии ампул отобрать среднюю пробу в количестве не менее 5 штук, их содержимое смешать в химическом стакане.

Из смешанного содержимого ампул отобрать пипеткой три аликвоты по  $2 \text{ см}^3$  в конические колбы. Добавить в колбы по  $30 \text{ см}^3$  воды и 2-3 капли бромтимолового синего (раствор в колбе приобретает желтый цвет).

### ***2. Кислотно-основное титрование.***

Оттитровать исследуемый раствор из микробюретки раствором  $\text{NaOH}$  с молярной концентрацией эквивалента  $0,1 \text{ моль/дм}^3$  до появления голубой окраски.

Результаты титрования записать в лабораторный журнал.

### ***3. Аргентометрическое титрование.***

В оттитрованный щелочью раствор добавить 2-3 капли насыщенного раствора  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и оттитровать раствором  $\text{AgNO}_3$  с молярной концентрацией эквивалента  $0,1 \text{ моль/дм}^3$  до изменения белого цвета образующегося осадка на буроватый. Результаты кислотно-основного и аргентометрического титрования должны совпадать с точностью  $0,05\text{-}0,08 \text{ см}^3$ .

### ***4. Обработка результатов.***

Усреднить результаты трех параллельных опытов.

Содержание пиридоксина (%) рассчитать по формуле:

$$\omega = \frac{0,0205 \cdot \bar{V} \cdot 100}{V_A},$$

где  $\omega$  - массовая доля пиридоксина в ампулах, %;  $\bar{V}$  - средний объём раствора  $\text{NaOH}$ , который пошёл на титрование,  $\text{см}^3$ ;  $V_A$  - аликвота раствора пиридоксина.

### ***6. Анализ результатов.***

Полученные результаты сравнить с содержанием пиридоксина, заявленным в инструкции к ампулам. Сделать выводы.

## Лабораторная работа № 1.5

### Определение массовой доли никотиновой кислоты (витамина РР) в чистых препаратах

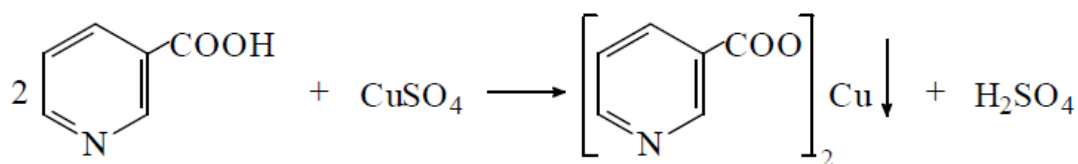
**Цель работы:** методом йодометрического титрования определить содержание никотиновой кислоты в медицинском препарате, сравнить полученные данные с заявленным в инструкции содержанием.

**Оборудование и химическая посуда:** весы аналитические; химические стаканы объемом 25,0-50,0 см<sup>3</sup>; ступка фарфоровая; воронки; фильтровальная бумага; колбы мерные на 100 см<sup>3</sup>; пипетки объемом 5,00, 10,00, 50,00 см<sup>3</sup>; колбы конические с пробкой объемом 300 см<sup>3</sup>; цилиндр мерный объемом 25 см<sup>3</sup>; бюретка объемом 2-5 см<sup>3</sup>.

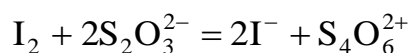
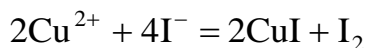
**Реактивы и материалы:** препарат никотиновой кислоты; бромтимоловый синий, 0,1%-й водно-спиртовой раствор; раствор гидроксида натрия (NaOH), водный раствор с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup>; сульфат меди (CuSO<sub>4</sub>), водный раствор с массовой концентрацией 10%; соляная кислота (HCl), разведенная 1:2; йодид калия (KI), х.ч.; тиосульфат натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), водный раствор с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup>; крахмал, 0,5 % раствор.

#### Методика выполнения работы

В данной работе определение витамина РР в виде никотиновой кислоты основано на способности этой кислоты образовывать нерастворимые комплексы меди по реакции:



Реакция проходит в стехиометрических отношениях. Раствор соли меди добавляют к раствору никотиновой кислоты в заведомом избытке, непрореагировавшие катионы Cu<sup>2+</sup> определяем с помощью непрямого йодометрического титрования по следующим реакциям:





Индикатором определения конца последней реакции служит раствор крахмала.

### ***1. Подготовка пробы к анализу.***

При анализе кристаллического препарата взять точную навеску около 0,5 г и растворит в 25 см<sup>3</sup> свежeproкипяченной горячей дистиллированной воды в мерной колбе 100 см<sup>3</sup>.

При анализе драже или таблеток взвесить 30-50 штук и определить средний вес одной штуки. Из тщательно растертой в ступке пробы взять точную навеску с таким расчетом, чтобы в ней содержалось около 0,5 г витамина РР. Далее навеску растворить в 25 см<sup>3</sup> свежeproкипяченной горячей дистиллированной воды в мерной колбе 100 см<sup>3</sup>.

### ***2. Осаждение комплексов меди.***

После охлаждения раствор в колбе нейтрализовать раствором NaOH с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (индикатор бромтимоловый синий), прибавить 10 см<sup>3</sup> 10 %-го раствора CuSO<sub>4</sub>, довести до метки и перемешать. Через 10-15 минут образовавшийся осадок отфильтровать.

### ***3. Йодометрическое титрование.***

В коническую колбу с притёртой пробкой отобрать 50 см<sup>3</sup> фильтрата, прибавить 10 см<sup>3</sup> HCl (1:2) и 2 г KI. Колбу закрыть пробкой и выдержать в темноте 10 минут.

Выделившийся йод оттитровать раствором Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (индикатор крахмал) до полного исчезновения синей окраски.

Результаты титрования записать в лабораторный журнал.

### ***4. Контрольное титрование.***

Для контрольного титрования в другой конической колбе с притёртой пробкой приготовить раствор из 5 см<sup>3</sup> 10 %-го раствора CuSO<sub>4</sub>, 10 см<sup>3</sup> HCl (1:2) и 2 г KI. После 10 минутного выдерживания в темноте выделившийся йод оттитровать раствором Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с молярной концентрацией эквивалента 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (индикатор крахмал) до полного исчезновения синей окраски.

Результаты титрования записать в лабораторный журнал.

Определение никотиновой кислоты провести три раза, результаты титрования не должны отличаться более чем на 0,05 см<sup>3</sup>.

### ***5. Обработка результатов.***

Усреднить результаты трех параллельных опытов.

Содержание никотиновой кислоты в кристаллическом препарате (%) рассчитать по формуле:

$$\omega = \frac{(V - V_1) \cdot 0,02462 \cdot 100 \cdot 100}{g \cdot 50},$$

где  $\omega$  - массовая доля никотиновой кислоты в кристаллическом препарате, %;  $V$  - средний объём раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , который пошёл на титрование контрольной пробы,  $\text{см}^3$ ;  $V_1$  - средний объём раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , который пошёл на титрование испытуемой пробы,  $\text{см}^3$ ; 0,02462 - титр раствора;  $g$  - навеска в граммах; 100 - объём раствора в котором растворена навеска; 100 - перерасчёт на проценты; 50 - аликвота раствора, взятого для титрования.

Содержание никотиновой кислоты в одной штуке драже или таблеток (%) рассчитать по формуле:

$$\omega = \frac{(V - V_1) \cdot 24,62 \cdot P \cdot 100}{g \cdot 50},$$

где  $\omega$  - массовая доля никотиновой кислоты в одной штуке драже или таблеток, %;  $V$  - средний объём раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , который пошёл на титрование контрольной пробы,  $\text{см}^3$ ;  $V_1$  - средний объём раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , который пошёл на титрование испытуемой пробы,  $\text{см}^3$ ; 24,62 - титр раствора;  $g$  - навеска в граммах;  $P$  - средний вес одной штуке драже или таблеток; 100 - перерасчёт на проценты; 50 - аликвота раствора, взятого для титрования.

### **6. Анализ результатов.**

Полученные результаты сравнить с содержанием никотиновой кислоты, заявленным в инструкции к ампулам. Сделать выводы.

## Контрольные вопросы к разделу 1

1. Витамины. Определение, общие сведения. Классификация витаминов: классическая, функциональная, химическая.
  2. Витамин С. Химическое строение, химические свойства, обусловленные наличием в молекуле АК гидроксогрупп.
  3. Окислительно-восстановительные свойства аскорбиновой кислоты.
  4. Факторы сохранности витамина С в пищевых продуктах. Какие химические свойства аскорбиновой кислоты обуславливают существенное снижение её содержания в пищевых продуктах при их кулинарной обработке?
  5. Какие окислители используются для качественных реакций на витамин С. Указать соответствующие химические реакции.
  6. Методы количественного определения витамина С. Пробоподготовка.
  7. Методы количественного определения витамина С. Титриметрические методы.
  8. Методы количественного определения витамина С. Спектральные и электрохимические методы.
  9. Перечислите основные блоки установки для кулонометрического титрования при постоянной силе тока и объясните их назначение.
  10. Приведите электродные реакции, которые протекают на катоде и аноде во время определения витамина С методом кулонометрического титрования?
  11. Методы количественного определения витамина С. Хроматографические и биологические методы.
  12. Методы количественного определения витамина С. Почему применяемые для анализа лекарственных форм аскорбиновой кислоты методы йодо- и йодатометрии нельзя использовать для анализа биологических объектов?
  13. Применение аскорбиновой кислоты в промышленности.
  14. Назовите пищевое сырьё с наибольшим содержанием витамина С.
  15. Стабилизаторы витамина С.
  16. Витамин В<sub>1</sub>. Химическое строение, природная форма.
  17. Физико-химические свойства витамина В<sub>1</sub>.
  18. Сохранение и стабилизация витамина В<sub>1</sub> в пищевых продуктах.
  19. Приведите качественные реакции витамина В<sub>1</sub>.
  20. Методы количественного определения витамина В<sub>1</sub>.
  21. Витамин В<sub>2</sub>. Химическое строение, природные формы.
  22. Физико-химические свойства рибофлавина.
  23. Сохранение и стабилизация витамина В<sub>2</sub> в пищевых продуктах.
- Применение витамина В<sub>2</sub>.
24. Приведите качественные реакции витамина В<sub>2</sub>.
  25. Методы количественного определения витамина В<sub>2</sub>.
  26. Витамин В<sub>3</sub>. Химическое строение, физико-химические свойства.

27. Методы количественного определения витамина В<sub>3</sub>. Сохранение и стабилизация витамина В<sub>3</sub> в пищевых продуктах.
28. Ниацин. Химическое строение и природные формы.
29. Химические свойства ниацина.
30. Приведите качественные реакции витамина РР.
31. Методики количественного определения витамина РР. Сохранение и стабилизация витамина РР в пищевых продуктах. Применение витамина РР.
32. Витамин В<sub>6</sub>. Химическое строение, физико-химические свойства.
33. Приведите качественные реакции витамина В<sub>6</sub>.
34. Методики количественного определения витамина В<sub>6</sub>. Сохранение и стабилизация витамина В<sub>6</sub> в пищевых продуктах. Применение витамина В<sub>6</sub>.
35. Витамин В<sub>12</sub>. Химическое строение, физико-химические свойства. Методики количественного определения витамина В<sub>12</sub>. Сохранение и стабилизация витамина В<sub>12</sub> в пищевых продуктах. Применение витамина В<sub>12</sub>.
36. Биотин. Химическое строение, авитамины.
37. Методики количественного определения биотина. Сохранение и стабилизация биотина в пищевых продуктах. Применение биотина.
38. Фолиевая кислота. Химическое строение, природные формы, авитамины.
39. Химические свойства фолиевой кислоты. Сохранение и стабилизация фолиевой кислоты в пищевых продуктах. Применение фолиевой кислоты.
40. Приведите качественные реакции витамина В<sub>с</sub>.
41. Методики количественного определения фолиевой кислоты.

## Раздел 2

### Жирорастворимые витамины

#### 2.1. Витамин D

К витаминам группы D (кальциферолам) относятся стероидные соединения, производные 9,10-секохолестана, обладающие антирахитической активностью.

Отличительной особенностью химической структуры кальциферолов является наличие в их молекуле циклопентанпергидрофенантренового ядра с разомкнутым кольцом В, трех сопряженных двойных связей в положениях 10 (19), 5 и 7, а также гидроксильной группы у атома С<sub>3</sub>. Индивидуальные кальциферолы отличаются друг от друга структурой боковой цепи. Важнейшими представителями этой группы являются холекальциферол (витамин D<sub>3</sub>) и эргокальциферол (витамин D<sub>2</sub>).

Кальциферолы — бесцветные кристаллические соединения, нерастворимые в воде, хорошо растворимые в жирах и органических растворителях (спирт, эфир и др.), обладают характерным максимумом поглощения при 265 нм (молярный коэффициент экстинкции 18 300). Кальциферолы весьма чувствительны к действию света и кислорода воздуха, особенно при нагревании. В связи с этим препараты кальциферолов следует хранить на холоде, в темном стекле, под вакуумом или инертным газом.

Кальциферолы образуются в результате фотоизомеризации соответствующих провитаминов под действием ультрафиолетового излучения. Провитамином холекальциферола является 7-дегидрохолестерин, образующийся в организме из холестерина; провитамином эргокальциферола — эргостерин, основным источником которого являются дрожжи. Эргостерин служит основой промышленного получения витамина D<sub>2</sub>. Холекальциферол образуется в организме из 7-дегидрохолестерина при облучении кожи солнечным или искусственным ультрафиолетовым светом с длиной волны 280-320 нм. Как и при химическом синтезе, продуктом непосредственной фотохимической реакции при облучении 7-дегидрохолестерина является прехолекальциферол (превитамин D<sub>3</sub>), который затем превращается в холекальциферол в результате изомеризации при температуре тела. Кроме того, кальциферолы поступают в организм с пищей и в виде медицинских препаратов, применяемых с профилактической или лечебной целью.

Основные функции кальциферолов в организме связаны с поддержанием гомеостаза кальция и фосфора, осуществлением процессов минерализации и ремоделирования (перестройки) костной ткани.

Имеющиеся данные позволяют указать три процесса, непосредственное участие в которых витамина D может считаться достаточно обоснованным:

1. Всасывание кальция и неорганического фосфата в кишечнике.
2. Мобилизация кальция из скелета путем резорбции преобразованной костной ткани.
3. Реабсорбция кальция в почечных канальцах.

Хотя основным патоморфологическим проявлением недостаточности витамина D является нарушение минерализации костной ткани, тем не менее убедительные доказательства непосредственного участия этого витамина в процессах кальцификации отсутствуют. По мнению ряда исследователей, дефекты минерализации при рахите имеют вторичный характер и обусловлены снижением концентрации кальция и неорганического фосфата в плазме крови вследствие нарушения находящихся под контролем витамина D процессов всасывания этих элементов в кишечнике, их мобилизации из костной ткани и реабсорбции в почках.

Сказанное не исключает возможного участия витамина D в переносе кальция и фосфора к участкам кальцификации в костной ткани, а также в образовании и созревании ее органической матрицы, однако непосредственное участие кальциферолов в этих процессах нуждается в более строгих доказательствах.

Кальциферолы выполняют свои специфические функции в обмене веществ в форме образующихся из них в организме активных метаболитов, важнейшими из которых являются образующийся в печени 25-оксикальциферол (25(OH)D) и образующиеся в почках 1,25-диоксикальциферол (1,25(OH)<sub>2</sub>D) и 24,25-ди-оксикальциферол (24,25(OH)<sub>2</sub>D).

Кальциферолы всасываются в тонком кишечнике и с хиломикронами поступают в печень, где подвергаются гидроксигированию, в результате которого холекальциферол превращается в 25-оксихолекальциферол (25(OH)D<sub>3</sub>), а эргокальциферол — соответственно в 25-оксиэргокальциферол (25(OH)D<sub>2</sub>). Это превращение катализирует 25-гидроксилаза витамина D. 25-оксихолекальциферолы являются основной транспортной формой кальциферолов в организме. На их долю приходится большая часть

кальциферолов, циркулирующих в крови. В норме концентрация 25-оксикальциферолов в плазме крови составляет 20-40 нг/мл, снижаясь при рахите до 0-10 нг/мл и повышаясь у лиц, получающих высокие дозы витамина D, до 100-1000 нг/мл. В плазме крови 25(OH)D<sub>3</sub> как и другие формы этого витамина, переносится специфическим транспортным белком транскальциферин (рис. 2.1.2).

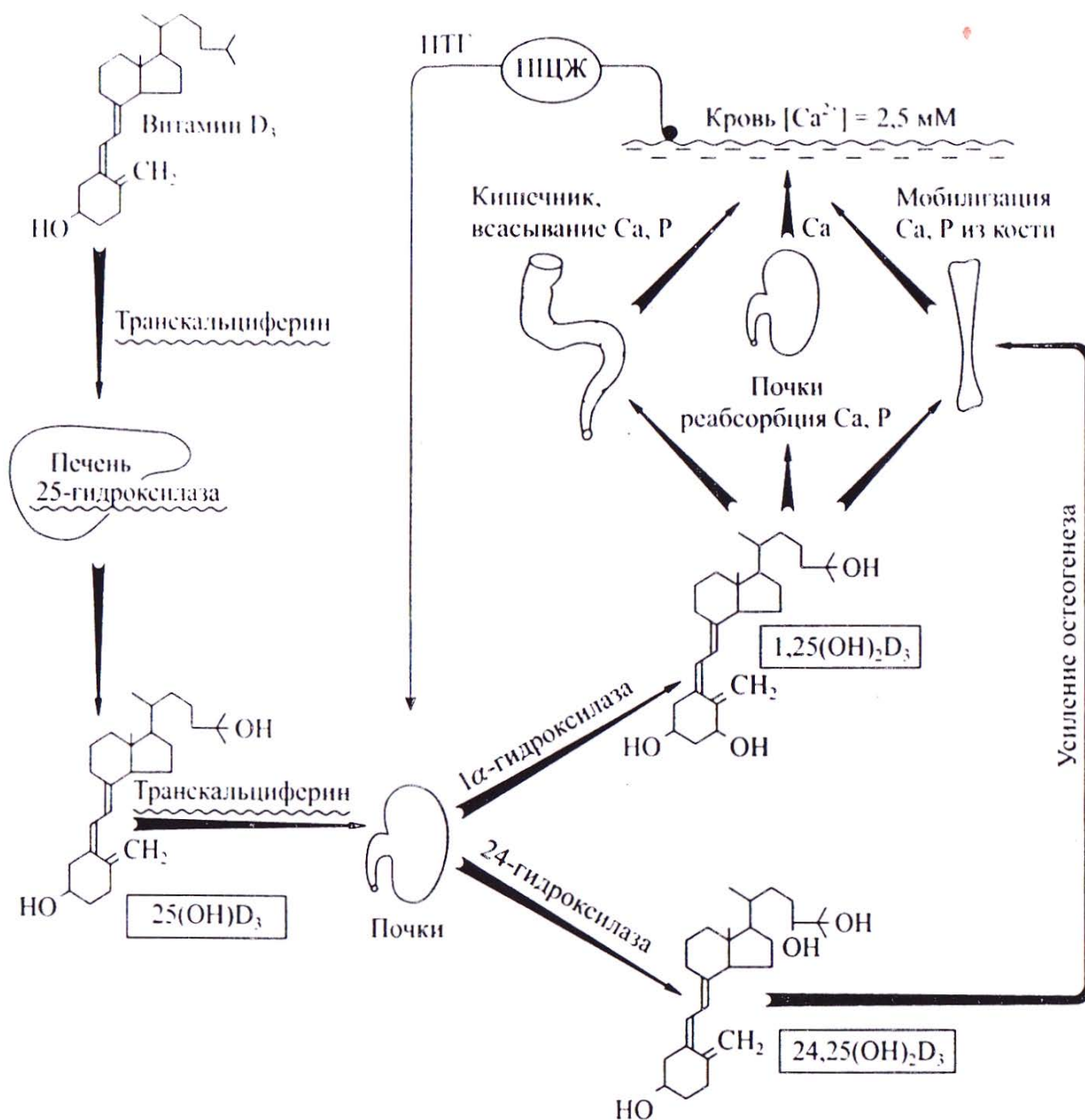


Рис 2.1.2. Гормональные формы витамина D и регуляция обмена кальция

В почках из 25(OH)D<sub>3</sub> образуются 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Первое превращение катализирует 1α-гидроксилаза 25(OH)D<sub>3</sub>, второе — 24-гидроксилаза 25(OH)D<sub>3</sub>. Аналогичным образом из 25(OH)D<sub>3</sub> образуются 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> и 24.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> является наиболее активной формой витамина D<sub>3</sub>, непосредственно ответственной за стимуляцию всасывания Ca и P в кишечнике и их мобилизацию из скелета. Биологическая активность 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> по этим показателям в 10 раз превышает активность исходного витамина D<sub>3</sub>. Образование 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в организме строго регулируется в соответствии с потребностями организма в кальции и фосфоре, что играет важную роль в поддержании гомеостаза этих элементов и постоянной концентрации кальция в плазме крови.

Важнейшим регулятором, активизирующим синтез 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, является паратгормон. Уменьшение концентрации Ca в крови при его недостаточном поступлении или усиленной утилизации стимулирует секрецию паратгормона, который активизирует в почках 1α-гидроксилазу, следствием чего является увеличение синтеза 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, усиливающего подачу Ca в кровотоки за счет увеличения сто всасывания в кишечнике и мобилизации из скелета. При чрезмерном повышении концентрации Ca в крови события развиваются в обратном направлении. Работа этой регуляторной системы, действующей по механизму обратной связи, обеспечивает поддержание постоянной концентрации Ca крови и интеграцию разнонаправленных процессов его обмена, а также адаптацию организма к различному поступлению Ca с пищей (рис. 1.4).

Наряду с паратгормоном, активизирующее влияние на синтез 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> оказывают эстрогены, пролактин, гормон роста и инсулин, а также недостаток в рационе Ca и P. Избыточное поступление Ca и P с пищей подавляет синтез 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. При торможении синтеза 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> вместо него в почках из 25(OH)D<sub>3</sub> образуется 24.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Стимулируя всасывание Ca и P в кишечнике так же эффективно, как 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в отличие от 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> не оказывает резорбцирующего действия на кость, но, наоборот, стимулирует процессы остеогенеза и минерализации костной ткани. В норме у здорового человека основной формой активных диоксипроизводных витамина D в крови является 24.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, концентрация которого составляет 0.6-3,0 нг/мл. Концентрация 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в крови существенно ниже и в норме составляет 20-50 пг/мл.



Наряду с 1,25(OH)2D3 и 24.25(OH)2D3 известны и другие метаболиты витамина D, в частности: 25.26-диоксихолекальциферол, 1,24.25-триоксихолекальциферол, 25,23-лактон 25-оксихолекальциферола и др.

Конкретный механизм действия витамина D на молекулярном уровне до конца не расшифрован. При недостатке витамина D нарушается всасывание Ca и P в кишечнике как в результате снижения проницаемости слизистой кишечника для кальция, так и нарушения активного энергозависимого транспорта этого иона против концентрационного градиента.

В соответствии с современными представлениями, образующийся из витамина D активный метаболит 1,25(OH)2D3 представляет собой гормон, который, подобно другим стероидным гормонам, регулирует на генетическом уровне биосинтез белков, ответственных за реализацию стимулирующего влияния этого витамина на всасывание кальция, и другие свойственные витамину D эффекты. В пользу этой концепции, в соответствии с которой сам витамин D, как и витамин A, рассматривается как прогормон, свидетельствует, в частности, наличие в клетках органов-мишеней витамина D высокоспецифичных внутриклеточных рецепторов его гормональной формы, обеспечивающих ее перенос к соответствующим участкам ядерного хроматина, что влечет за собой запуск транскрипции гормончувствительных генов и синтез кодируемых ими белков.

Первичный эффект 1,25(OH)2D3 может быть связан также с модификацией физико-химических свойств мембраны всасывающих клеток, создающей необходимые условия для транспорта ими кальция.

Для определения витамина D и его метаболитов используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с методами радиоконкурентного связывания.

Кальциферолы и продукты их обмена не накапливаются в органах и тканях в значительных количествах, за исключением жировой ткани, которая, по-видимому, может их депонировать. Кальциферолы выводятся из организма, главным образом, с калом от части в неизмененном виде, от части в форме лишенных антирахитической активности окисленных продуктов типа желчных кислот и их конъюгатов.

Биологическая активность витаминов группы D измеряется в международных (интернациональных) единицах (МЕ). 1 МЕ соответствует антирахитической активности 0,025 мкг кристаллического эрго- или холекальциферола на крысах. Соответственно этому, 1 мкг эрго- или холекальциферола содержит 40 МЕ витамина D.

Биологическая активность эргокальциферола и холекальциферола для человека и большинства животных одинакова, за исключением цыплят и некоторых видов южноамериканских человекообразных обезьян, в отношении которых активность холекальциферола в несколько раз превышает активность эргокальциферола. Биологическая активность 25-оксикальциферолов в 1,5-2 раза, а 1,25- диоксикальциферолов - в 5-10 раз превышает активность исходных кальциферолов.

Потребность человека в витамине D точно не установлена. При достаточной и регулярной инсоляции эта потребность может обеспечиваться за счет фотохимического образования холекальциферола в коже.

Широкая вариабельность размеров эндогенного синтеза витамина D затрудняет установление рекомендуемых величин его потребления. В соответствии с действующими в настоящее время в Российской Федерации нормами 1991 г. рекомендуемое потребление этого витамина для детей первых трех лет жизни установлено на уровне 400 МЕ (10 мкг) в сутки. Для детей более старшего возраста и взрослых оно составляет 100 МЕ (2,5 мкг), увеличиваясь для женщин в период беременности и кормления грудью до 400 МЕ.

В последнем издании соответствующих норм в США и Канаде (1997 г.) величина адекватного потребления витамина D для детей и взрослых установлена на уровне 200 МЕ (5 мкг), для мужчин и женщин от 50 до 70 лет — 400 МЕ (10 мкг) и старше 70 лет — 600 МЕ (15 мкг) в день. Увеличение размеров адекватного потребления витамина D для пожилых людей обусловлено снижением его эндогенного синтеза из-за уменьшения в этом возрасте инсоляции, а также повышенной склонностью пожилых людей к костным переломам.

Содержание витамина D в продуктах питания невелико. Им богат только жир печени некоторых рыб: трески (50-850 МЕ/мл), тунца (40 000-60 000 МЕ/мл) и др. Однако при добавлении витамина D в рацион сельскохозяйственных животных, в частности, цыплят, содержание кальциферолов в их мясе и других продуктах может возрасти и быть источником витамина D для человека. В ряде стран (Англия) источником витамина D является маргарин, специально обогащаемый этим витамином.

Недостаточное образование или поступление в организм витамина D является одной из причин рахита. Нарушение синтеза 1,25-диоксикальциферолов в почках является причиной репальных остеодистрофий при хронической почечной недостаточности. Нарушение



Токол, лежащий в основе структуры токоферолов, является в химическом отношении 2-метил-2(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-олом. т. е. 6-оксихроманом, замещенным в положении 2 метильной группой и боковой насыщенной изопреноидной цепочкой из 16 атомов углерода. Индивидуальные токоферолы, обозначаемые греческими буквами  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ , отличаются друг от друга количеством и положением метильных заместителей в ароматическом кольце 6-оксихромана. Важнейший из них  $\alpha$ -токоферол является 5,7,8-триметилтоколом, содержащим СН<sub>3</sub>-группы во всех свободных положениях ароматического кольца: 5, 7 и 8 (рис. 2.2.1).

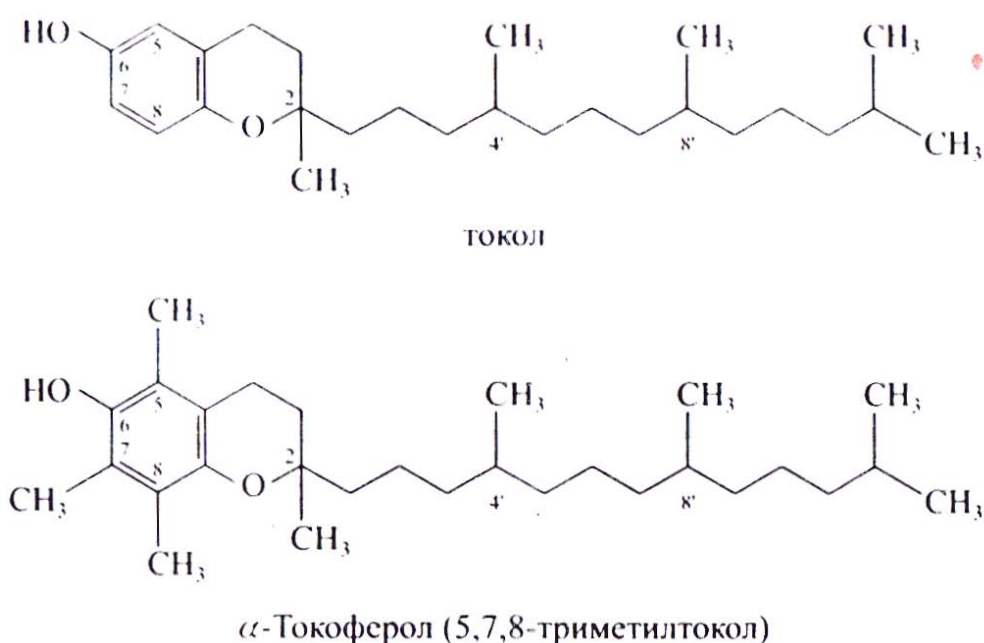


Рис. 2.2.1. Химическая структура токола и  $\alpha$ -токоферола

В молекуле токоферолов имеются три асимметрических центра — атомы углерода в положениях 2 хроманового кольца, 4' и 8' — в боковой цепи. В связи этим для каждого токоферола возможны 8 оптических изомеров и 4 рацемата. Природный  $\alpha$ -токоферол имеет R- (или D-) конфигурацию у всех асимметрических центров и является, таким образом, 2 R ,4 R ,8 R- $\alpha$ -токоферол ом. Для его обозначения рекомендуется термин R,R,R- $\alpha$ -токоферол. Иногда его обозначают также 2D,4D,8 D- $\alpha$ -токоферол, D- $\alpha$ -токоферол, d- $\alpha$ -токоферол или просто  $\alpha$ -токоферол.

Синтетический  $\alpha$ -токоферол, получаемый с использованием природного фитола, представляет собой смесь двух эпимеров: R,R,R- $\alpha$ -токоферола и 2S,4'R,8'D- $\alpha$ -токоферола (2-эпи- $\alpha$ -токоферола) и обозначается как 2-амбо- $\alpha$ -токоферол.

Полностью рацемическая смесь всех 8 стереоизомеров, образующаяся при синтезе  $\alpha$ -токоферола с использованием синтетического изофитола, обозначается как полностью рацемический  $\alpha$ -токоферол, DL- $\alpha$ -токоферол или dl- $\alpha$ -токоферол.

При комнатной температуре токоферолы представляют собой светло-желтые, прозрачные масла. Некоторые из них при низкой температуре кристаллизуются. Токоферолы нерастворимы в воде, хорошо растворимы в органических растворителях (хлороформе, эфире, гексане, петролейном эфире), несколько хуже — в ацетоне и спирте. Токоферолы устойчивы к действию кислот, щелочей и нагреванию; чувствительны к ультрафиолетовому свету, кислороду воздуха и другим окислителям, которые превращают их в соответствующие хиноны. В вакууме и атмосфере инертного газа стабильны даже при нагревании до 100 °С.

Токоферолы обладают характерным для 6-оксихромапа максимумом поглощения света в области 292-298 нм. Растворы токоферолов в спирте, гекеапе и других органических растворителях обладают интенсивной флуоресценцией с максимумом возбуждения при 295 нм и излучения при 320-340 нм.

Токоферолы легко образуют сложные эфиры с различными кислотами, которые, полностью сохраняя биологическую активность, отличаются значительно большей устойчивостью к окислению и, как правило, представляют собой кристаллические вещества. Важнейшими из них являются  $\alpha$ -токоферилацетат (D- $\alpha$ -токоферилацетат) — эфир природного  $\alpha$ -токоферола и уксусной кислоты, а также DL- $\alpha$ -токоферилацетат — уксуснокислый эфир синтетического DL- $\alpha$ -токоферола.

Токоферолы легко вступают во взаимодействие со свободными радикалами и активными формами кислорода, чем определяются их антиоксидантные свойства — способность тормозить свободнорадикальные процессы перекисного окисления органических соединений, в частности ненасыщенных жирных кислот, молекулярным кислородом.

Токоферолы широко распространены в природе. Они присутствуют во всех тканях организма, где обнаруживаются, главным образом, в липопротеиновых мембранах клеток и субклеточных органелл.

Токоферолы выполняют в живых тканях роль биологических антиоксидантов, инактивирующих свободные радикалы и тем самым препятствующих развитию свободнорадикальных процессов перекисного окисления ненасыщенных липидов. Поскольку ненасыщенные липиды являются важнейшим компонентом биологических мембран, эта функция токоферолов имеет большое значение для поддержания структурной целостности и функциональной активности липопротеиновых мембран клеток и субклеточных органелл.

В стабилизирующем действии токоферолов на биологические мембраны существенная роль может также принадлежать физико-химическому взаимодействию между боковой изопреноидной цепочкой молекулы токоферолов и углеводородной цепью полиненасыщенных жирных кислот, в частности арахидоновой, входящих в состав мембранных фосфолипидов.

Таким образом, функциональная роль и механизм действия витамина Е предопределены его химической структурой и свойствами. Наличие изопреноидной цепи придает токоферолам липидорастворимость и способность локализоваться в мембранах клеток и субклеточных органелл, а наличие фенольного гидроксила в хромановом кольце предопределяет его свойства биологического антиоксиданта и способность тормозить свободнорадикальное окисление мембранных фосфолипидов.

Наряду с защитой от окислительного поврежения клеточных и субклеточных мембран, важнейшей функцией витамина Е, по-видимому, является торможение свободнорадикального окисления липопротеидов процесса, которому и настоящее время придается ведущая роль в патогенезе атеросклероза и связанных с ним сердечно-сосудистых заболеваниях.

Другим объектом, в защите которого от окисления активными формами кислорода витамин Е принимает участие совместно с другими антиоксидантами: аскорбиновой кислотой, глутатионом и (или)  $\alpha$ -линоевой кислотой — являются белки с функционально активными тиоловыми группами и остатками метионина, легко поддающимися окислению. Исключительно важным окислительным процессом, находящимся под контролем витамина Е, является окисление арахидоновой кислоты до таких метаболически высокоактивных продуктов, как простагландины, лейкотриены и тромбоксаны. С этим связано влияние, оказываемое витамином Е на агрегацию тромбоцитов,

хемотаксис фагоцитов, освобождение интерлейкина-1 из макрофагов и тем самым — на весь каскад иммунных реакций.

Наряду с этим имеются данные о возможной вовлеченности витамина Е в процессы, связанные с биосинтезом нуклеиновых кислот и экспрессией генов, а также с обменом веществ в митохондриях.

Функция токоферолов как биологических антиоксидантов в организме тесно взаимосвязана с функциями других компонентов антиоксидантной системы организма, в частности селена, входящего в состав глутатионпероксидазы, восстанавливающей гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот и других органических соединений.

Недостаточность витамина Е у взрослых людей встречается довольно редко и, как правило, бывает обусловлена нарушениями всасывания токоферолов (при стеаторее, удалении части тонкого кишечника и т. п.). Эндогенный дефицит витамина Е возникает при абетаполиневрозе — наследственном заболевании, обусловленном генетическим дефектом синтеза и секреции  $\beta$ -липопротеидов, осуществляющих транспорт токоферолов из печени к другим тканям.

Поскольку плацента плохо пропускает токоферолы к плоду, то недостаточность витамина Е часто наблюдается у новорожденных детей, находящихся на искусственном вскармливании.

Недостаток витамина Е у недоношенных, усугубляемый оксигенацией, может быть причиной анемии, ретинопатии и нарушений зрения (супралентальная фиброплазия), бронхо-пульмональной дисплазии, внезапной гибели новорожденных. Поскольку коровье молоко значительно более бедно токоферолами, чем женское, то включение токоферола в комплексную терапию недоношенных и обогащение им смесей для искусственного вскармливания является важным мероприятием в профилактике указанных нарушений.

У животных недостаток витамина Е ведет к дегенерации зародышевого эпителия семенников, снижению подвижности сперматозоидов, резорбции плодов, мышечной дистрофии, энцефаломалиции и эксудативному диатезу, накоплению в тканях пигмента липофусцина.

В основе этих проявлений лежат биохимические нарушения, обусловленные выпадением специфических функций витамина Е в организме, в частности, усиление перекисного окисления мембранных липидов, ведущее к повреждению клеточных и субклеточных мембран. Этот дефект лежит в основе таких ярких проявлений недостаточности витамина Е, как резкое усиление чувствительности эритроцитов к

нерекпеному гемолизу, утрата саркоплазматическим ретикулумом способности к аккумуляции и удержанию ионов  $Ca^{+2}$ , что ведет к нарушению работы мышц, выходу в кровь тканевых ферментов.

Биологическая активность витамина Е измеряется в мкг R,R,R- $\alpha$ -токоферола (токофероловых эквивалентах) или в международных единицах (МЕ), соответствующих активности 1 мг DL- $\alpha$ -токоферилацетата, введенного per os в тесте по предотвращению резорбции плода у крыс, лишенных витамина Е. Активность природного  $\alpha$ -токоферола на 40 % выше активности синтетического DL - $\alpha$ -токоферола.

Природный  $\alpha$ -токоферол является наиболее активным из всех токоферолов. Биологическая активность  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -токоферолов составляет соответственно 20-30, 10 и 1 % активности  $\alpha$ -токоферола. Биологическая активность токотриенолов существенно, в 5-10 раз, уступает активности соответствующих токоферолов.

Суммарную активность витамина Е при расчете, например, его содержания в продуктах питания выражают в  $\alpha$ -токофероловых эквивалентах, равных по активности 1 мкг природного R,R,R- $\alpha$ -токоферола (приложение V, табл. 26). Поскольку последний нестабилен, в качестве стандарта для определения биологической активности рекомендуется использовать эфир природного  $\alpha$ -токоферола, т. е. D- $\alpha$ -токоферилацетат.

Наряду с токоферолами способностью полностью или частично предотвращать проявления недостаточности витамина Е обладают синтетические антиоксиданты, используемые для защиты жиров и других пищевых продуктов от окислительной порчи, в частности бутилокситолуол. Эти соединения не включаются в понятие и расчет  $\alpha$ -токоферолового эквивалента.

Из продуктов наиболее богаты токоферолами растительные масла, особенно кукурузное (40-80 мг/100 г), хлопковое (50-100 мг/100 г) и из пшеничных зародышей (100-400 мг/100 г). Большая часть суммарного содержания токоферолов в подсолнечном масле приходится на  $\alpha$ -токоферол (80 %), а в кукурузном и соевом — на  $\gamma$ -токоферол (60-80 %). Продукты животного происхождения бедны витамином Е: сливочное масло — 1 мг/100 г, мясо и сало - 0,6 мг/100 г, молоко — 0,09 мг/100 г.

Потребность в витамине Е человека точно не установлена. Рекомендуемая норма потребления этого витамина составляет 10-15 мг D- $\alpha$ -токоферола в сутки. Увеличение потребления полиненасыщенных жирных кислот повышает потребность в витамине Е. В связи с этим ряд



авторов предлагают рассчитывать угу потребность исходя из содержания в пище ненасыщенных жирных кислот, принимая коэффициент 0,6 мг  $\alpha$ -токоферола на 1 г ненасыщенных жирных кислот.

Одним из основных методов оценки обеспеченности человека витамином Е является определение концентрации токоферолов в сыворотке или плазме крови. Обычно для этого используют спектрофлуориметрические методы и методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, обладающие высокой точностью и чувствительностью.

В норме концентрация токоферолов в сыворотке крови составляет 0,8–1,5 мг/100 мл, снижаясь при дефиците витамина Е. Проявления недостаточности витамина Е обычно обнаруживаются при концентрации токоферолов ниже 0,5 мг/100 мл. У новорожденных и особенно у недоношенных детей концентрация токоферолов бывает снижена до 0,2–0,4 мг/100 мл.

В качестве функциональных методов оценки обеспеченности организма витамином Е исследуют экскрецию с мочой креатина и чувствительность эритроцитов к перекисному гемолизу в изотонической среде. Оба эти показателя существенно возрастают при дефиците витамина Е.

В этих же целях предложено исследовать методом газовой хроматографии содержание в выдыхаемом воздухе пентана и этана, количество которых при дефиците витамина Е возрастает вследствие перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот.

Медицинская промышленность получает природные токоферолы путем выделения их из растительных масел, а синтетические — конденсацией метилзамещенных  $n$ -гидрохинонов с фитолом или изофитолом.

Препараты токоферолов применяют для профилактики и лечения недостаточности витамина Е, в частности, для профилактики и лечения анемии и бронхо-пульмональной дисплазии у недоношенных, появляющихся на свет с крайне низким уровнем этого витамина в крови и тканях. Имеются сообщения об успешном применении  $\alpha$ -токоферола для профилактики самопроизвольных аборт у женщин, при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, мышечной дистрофии, перемежающейся хромоты, бронхиальной астмы, склеродермии, тромбоза, облитерирующего эндартериита.

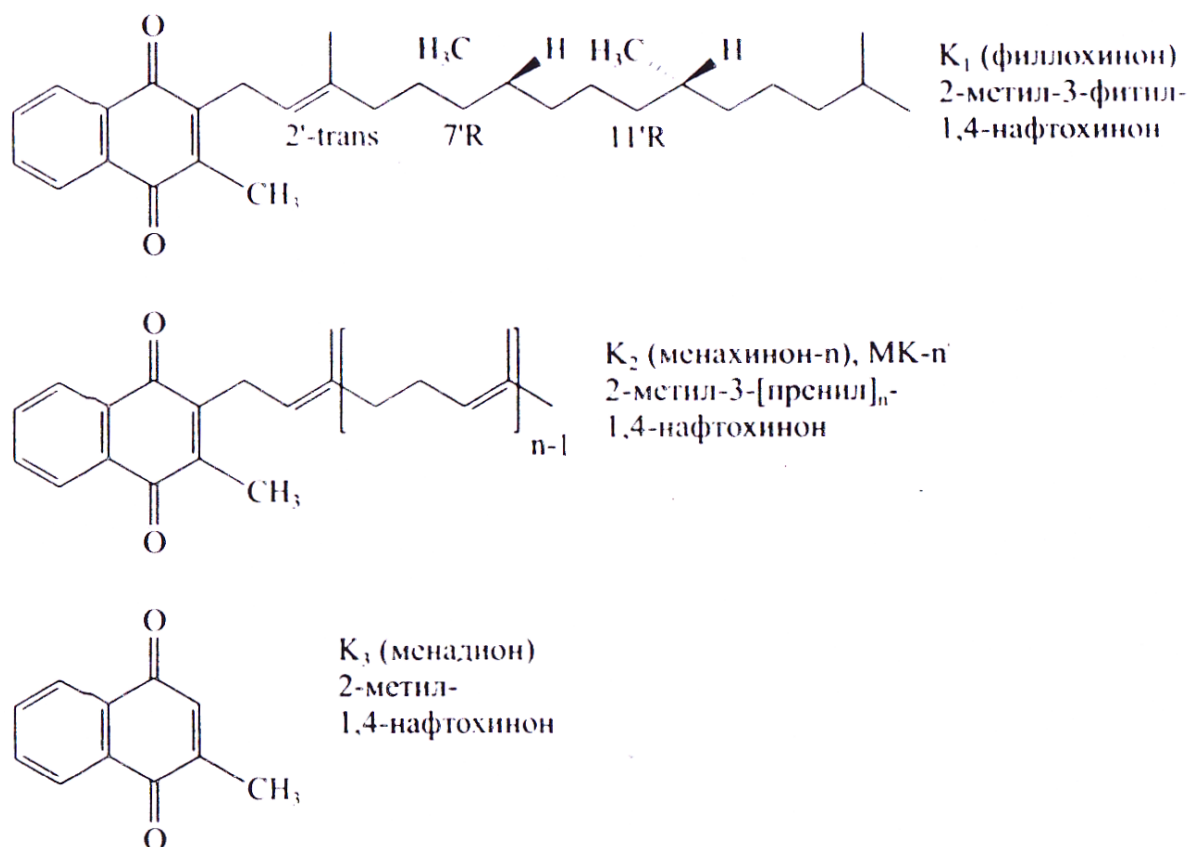
Токоферолы практически не токсичны, но в высоких дозах (300–800 мг/сут.) могут вызывать побочные эффекты, в частности, тормозить

агрегацию тромбоцитов и замедлять свертывание крови. В последние годы это свойство высоких доз  $\alpha$ -токоферола используется в качестве одного из средств вторичной профилактики инфарктов и инсультов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Верхний безопасный предел потребления витамина Е за счет всех его источников, в том числе биологически активных добавок и фармацевтических препаратов, составляет по рекомендациям, действующим в США (Dietary Reference Intakes, USA, 2000), 1000 мг в сутки.

### 2.3. Витамин К

К витаминам группы К относятся 2-метил-1,4-нафтохинон (менадион, витамин К3) и его производные, обладающие биологической активностью филлохинона (рис 2.3.1).



**Рис. 2.3.1.** Витамины группы К

Отдельные представители этой группы различаются друг от друга отсутствием или наличием и природой боковой цепочки в положении 3

нафтохинонового кольца. Важнейшими из них являются 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинон (филлохинон, витамин К<sub>1</sub>), содержащий фитильную боковую цепочку с одной двойной связью, и различные менахиноны, соединения ряда витамина К<sub>2</sub> с ненасыщенной полиизопреноидной боковой цепью, содержащей различное число изопренильных остатков, в частности, менахинон-4 (МК-4) с 4 изопренильными остатками в боковой цепи. Все природные соединения этой группы не растворимы в воде, хорошо растворяются в органических растворителях, легко окисляются кислородом воздуха.

Витамин К<sub>1</sub> (филлохинон) синтезируется в растениях, менахиноны (витамины К<sub>2</sub>) продуцируются различными бактериями или образуются в организме животных из менадиона или филлохинона путем наращивания или замены боковой цепочки.

Биологическая роль витамина К обусловлена его значением для процесса свертывания крови. Он необходим для образования в печени функционально активных форм протромбина (фактор II), проконвертина (фактор VII), а также двух других белков, участвующих в свертывании крови: фактора IX (фактор Кристмаса, или антигемофильный глобулин) и фактора X (фактор Стюарта - Прауэра) — из соответствующих неактивных белков предшественников.

Биохимический механизм действия витамина К в этих процессах опосредован его участием в качестве кофермента в реакции  $\gamma$ -карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты и молекуле белков-предшественников указанных выше факторов, к частности протромбина, с образованием остатков  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты. Вследствие этого карбоксилирования соответствующие участки молекулы белков-предшественников, содержащие остатки глутаминовой кислоты, приобретают способность связывать ионы Са<sup>+2</sup> и подвергаться активации с образованием активных факторов свертывания крови, в частности протромбина. Наряду с этим витамин К участвует в  $\gamma$ -карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты в остеокальцин — одном из основных белков костной ткани, связывающем кальций, а также в ряде других кальцийсвязывающих белков.

Недостаточность витамина К у человека и животных приводит к замедлению свертывания крови и развитию геморрагического синдрома, обусловленного угнетением синтеза протромбина, факторов VII, IX и X, а также замедлением превращения фибриногена в фибрин.

Вследствие достаточно широкого распространения витамина К в пищевых продуктах и синтеза его микрофлорой кишечника,

недостаточность этого витамина у человека встречается относительно редко и обычно бывает обусловлена нарушениями его всасывания при заболеваниях кишечника (хронические энтериты, энтероколиты), нарушениях образования и секреции желчи (при инфекционных и токсических гепатитах, циррозе печени, желчно-каменной болезни, опухолях поджелудочной железы, дискинезии желчевыводящих путей), оперативном удалении части кишечника, мальабсорбции жиров и стеаторее.

Недостаточность витамина К может также развиваться при нарушениях питания и длительном приеме антибиотиков, подавляющих синтезирующую этот витамин микрофлору кишечника.

Недостаточностью витамина К обусловлена также геморрагическая болезнь новорожденных. Особенно склонны к этому нарушению недоношенные дети и новорожденные с внутриутробной асфиксией и внутричерепной травмой. Недостаточность витамина К у новорожденных является следствием незрелости гепатобилиарной системы и механизма всасывания липидов, в частности витамина К. а также отсутствия в кишечнике новорожденных микрофлоры, синтезирующей этот витамин.

Функциональная недостаточность витамина К может возникнуть при приеме антикоагулянтов типа дикумарина, варфарина и др., являющихся антивитаминами К.

Биологическую активность витаминов группы К рекомендуется выражать в фллохиноновых эквивалентах, т. е. в мг или мкг фллохинона (витамина К<sub>1</sub>).

Потребность новорожденных детей в витамине К в первые дни жизни, по данным различных авторов, колеблется от 1-2 до 10-12 мкг. Рекомендуемая величина его потребления детьми первого полугодия жизни по нормам, принятым в США, установлена на уровне 2 мкг, для детей второго полугодия — 2.5 мкг в сутки. Рекомендуемые величины потребления витамина К. для взрослых людей установлены в нормах, принятых в США, на уровне 90 мкг в день для женщин, 120 мкг — для мужчин.

У больных механической желтухой с нарушением усвоения витамина К эффективная суточная доза, устраняющая гипопротромбинемию, составляет 10-15 мг метилнафтохинона.

Показателями обеспеченности организма витамином К служат тесты, отражающие состояние свертывающей системы крови, прежде всего протромбиновый индекс (в норме 80-100 %), а также содержание в

крови протромбина и других зависящих от витамина К факторов свертывания крови.

Для количественного определения витаминов группы К. описаны спектрофотометрические, колориметрические и флуориметрические методы.

В последние годы в этих целях с успехом используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Из пищевых продуктов витамином К наиболее богаты некоторые овощи: шпинат (40 мкг/г сухого веса), цветная и белокочанная капуста (8-30 мкг/г). томаты (4-8 мкг/г). листья крапивы (30 мкг/г). Из мясных продуктов витамином К наиболее богата печень (2—4 мкг менадиона/г сухого веса). Содержание витамина К в других продуктах не превышает 0,5-1,5 мкг/г.

## **Лабораторная работа № 2.1**

### **Качественные реакции жирорастворимых витаминов**

**Цель работы:** доказать наличие жирорастворимых витаминов в исследуемом сырье и препаратах, используя их характерные химические свойства.

**Оборудование и химическая посуда:** штатив с пробирками, водяная баня, сухой спирт, пробиркодержатель.

**Реактивы и материалы:** масляный раствор ретинола ацетата, масляный раствор эргокальциферола (витамин D<sub>2</sub>) либо рыбий жир; масляный раствор токоферола ацетата; викасол либо менадион; концентрированный раствор серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); концентрированная азотная кислота (HNO<sub>3</sub>); 10%-й раствор гидроксида натрия (NaOH); хлороформ; насыщенный (30%) раствор хлорида сурьмы (III) (SbCl<sub>3</sub>) в хлороформе; уксусный ангидрид; насыщенный раствор сульфата железа (II) (FeSO<sub>4</sub>) в ледяной уксусной кислоте; 1%-й раствор брома (Br<sub>2</sub>) в хлороформе; анилин; раствор анилина в соляной кислоте (15:1); этиловый спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH); 1%-й раствор хлорида железа (III) (FeCl<sub>3</sub>); 0,025%-й раствор цистеина; 1%-й раствор диэтилмалонового эфира; 5%-й раствор диэтилдитиокарбамата.

## Методика выполнения работы

### **Опыт 1. Качественные реакции витамина А.**

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.

При взаимодействии ретинола с  $\text{FeSO}_4$  в кислой среде образуется соединение розово-красного цвета. Каротины дают в этой реакции зеленоватое окрашивание.

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.

#### *а) Галохромная реакция с $\text{SbCl}_3$*

1 каплю масляного раствора ретинола ацетата или 2-3 капли рыбьего жира растворяют в 1 мл хлороформа и добавляют 5 см<sup>3</sup> насыщенного раствора хлорида сурьмы в перегнанном хлороформе; появляется синее окрашивание, которое постепенно переходит в розово-фиолетовое.

**Внимание!** Присутствие даже небольших количеств воды в пробирке может помешать протеканию реакции, так как в водных условиях хлорид сурьмы (III) легко превращается в хлороксид сурьмы, который не реагирует с ретинолом, вызывая помутнение раствора. Для устранения следов влаги в пробу можно добавить 1-2 капли уксусного ангидрида.

#### *б) Галохромная реакция с серной кислотой (реакция Друммонда)*

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 красно-буроватое и затем в бурое.

*в) Идентификация витамина А спектрофотометрически*

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

*г) Реакция витамина А с сульфатом железа (II)*

К 1-2 каплям рыбьего жира осторожно (работать под тягой) прибавляют 5-10 капель насыщенного раствора сульфата железа ( $\text{FeSO}_4$ ), приготовленного на ледяной уксусной кислоте, и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

**Опыт 2. Качественные реакции витамина D.**

Эргокальциферол ( $\text{D}_2$ ) и холекальциферол ( $\text{D}_3$ ) 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.

При нагревании рыбьего жира, содержащего витамин D, с анилиновым реактивом раствор приобретает красную окраску.

*а) Галохромная реакция с  $\text{SbCl}_3$*

0,3 см<sup>3</sup> раствора эргокальциферола в масле растворяют в 3 см<sup>3</sup> хлороформа. К 1 см<sup>3</sup> хлороформного раствора препарата добавляют 3-4 капли хлористого ацетила и 5 см<sup>3</sup> насыщенного раствора хлорида сурьмы в хлороформе; появляется оранжево-розовое.

*б) Бромхлороформенная проба на витамин D*

К 2 мл хлороформного раствора препарата добавляют 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора брома в хлороформе (тяга!); через некоторое время появляется зеленое или голубовато-зеленое окрашивание.

*в) Анилиновая проба на витамин D*

В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира, 5 капель хлороформа и тщательно встряхивают. Затем добавляют 1 каплю анилинового реактива, содержащего 15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты. Смесь осторожно при помешивании нагревают до кипения и кипятят примерно 30 секунд. При наличии

витамина D желтая эмульсия сначала становится зеленой, а затем красной. При стоянии эмульсия через 1-2 минуты расслаивается, при этом нижний слой окрашен в интенсивно красный цвет.

### **Опыт 3. Качественные реакции витамина E.**

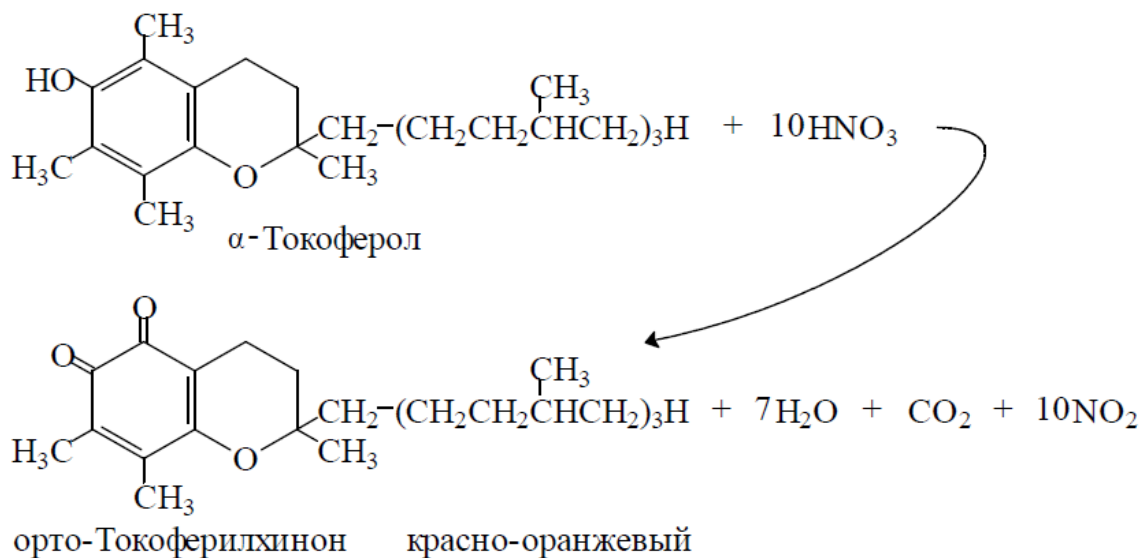
Для идентификации α-токоферола и его ацетата используется реакция с дымящей азотной кислотой при нагревании до температуры 80°C. При этом в таких жестких условиях токоферола ацетат гидролизуется, и далее образующийся α-токоферол окисляется азотной кислотой с образованием орто-токоферилхинона, окрашенного в красно-оранжевый цвет.

Орто-токоферилхинон также образуется при окислении хлорида железа (III).

Количественное определение α-токоферола ацетата основано на предварительном превращении его в α-токоферол и окислении последнего сульфатом церия в среде абсолютного этилового спирта, который устойчив к действию этого окислителя. Проведение количественного анализа в водной среде невозможно, поскольку препарат практически нерастворим в воде.

#### *а) Реакция α-токоферола с концентрированной азотной кислотой*

0,2-0,3 см<sup>3</sup> 5%-ного масляного раствора токоферола ацетата растворяют в 5 см<sup>3</sup> абсолютного этилового спирта, добавляют 1 см<sup>3</sup> дымящей азотной кислоты и осторожно нагревают в течение 15 мин на водяной бане при температуре около 80 °С (тяга!); появляется красно-оранжевое окрашивание.





*б) Реакция  $\alpha$ -токоферола с хлоридом железа (III)*

4-5 капель 0,1%-го спиртового раствора  $\alpha$ -токоферола смешивают с 0,5 см<sup>3</sup> 1%-го раствора хлорного железа. Смесь тщательно перемешивают и наблюдают появление красного окрашивания.

***Опыт 4. Качественные реакции витамина К.***

*а) Реакция с цистеином*

Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в желтый цвет.

В пробирку вносят 10 капель 0,1%-го спиртового раствора викасола, 5 капель 0,025%-го раствора цистеина и 2 капли 10%-го раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешивают и наблюдают появление желтого окрашивания.

*б) Реакция с диэтилмалоновым эфиром*

Спиртовой раствор витамина К в щелочной среде с диэтилмалоновым эфиром дает красно-фиолетовое окрашивание.

В пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> 0,1%-го спиртового раствора викасола, 0,5 см<sup>3</sup> 1%-го раствора диэтилмалонового эфира и 2 капли 1%-го раствора гидроксида калия. Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

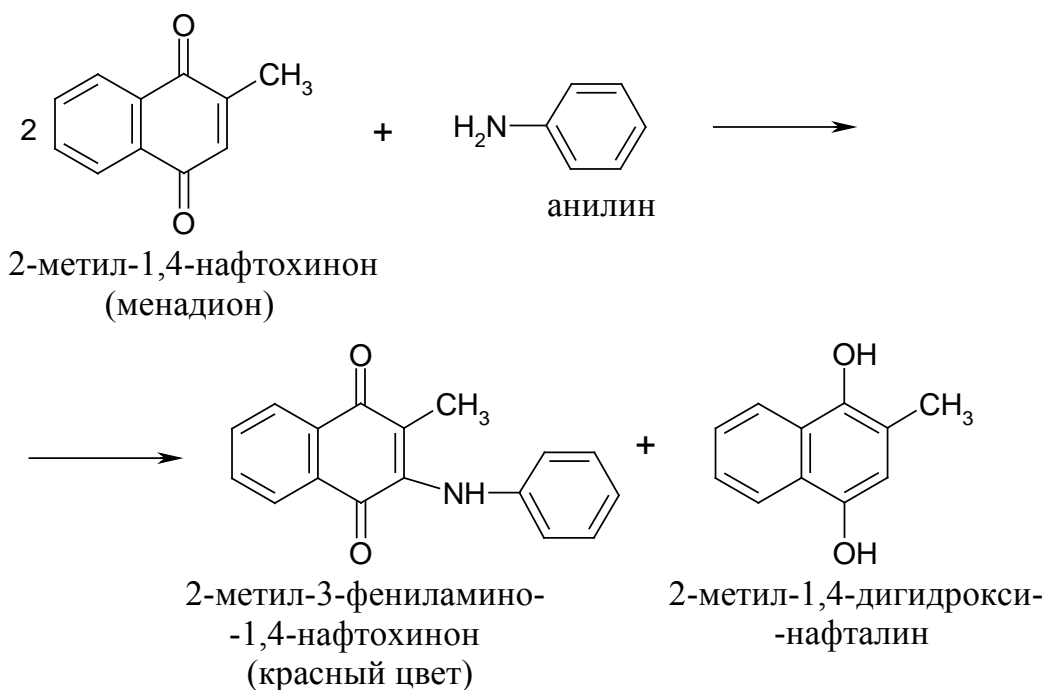
*в) Реакция с диэтилдитиокарбаматом*

Спиртовой раствор витамина К в щелочной среде в присутствии диэтилдитиокарбамата образует соединение, окрашенное в голубой цвет.

В пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> 0,2%-го спиртового раствора менадиона, 2 см<sup>3</sup> 5%-го раствора диэтилдитиокарбамата и 0,5 см<sup>3</sup> 4%-го спиртового раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешивают. Раствор приобретает голубое окрашивание.

*г) Реакция с анилином*

При взаимодействии витамина К с анилином образуется соединение, окрашенное в красный цвет. Например:



В пробирку вносят 5 капель 0,2%-го спиртового раствора менадиона (приготовленного на этаноле), 2 капли анилина и перемешивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

## Лабораторная работа № 2.2

### Определение каротиноидного состава масел шиповника и облепихи методом тонкослойной хроматографии

**Цель работы:** методом тонкослойной хроматографии определить каротиноидный состав исследуемых образцов.

**Оборудование и химическая посуда:** камера для ТСХ; пластинка для ТСХ «Силуфол»; колба 25 см<sup>3</sup>; нож; доска; ступка; тёрка.

**Реактивы и материалы:** пробы каротиноидосодержащих масел (масло шиповника, облепихи и др.) либо растительное сырьё (морковь, рябина и т.п.); стандартный раствор β-каротина; смесь для элюирования гексан – бензол (29:1); хлороформ.

## Методика выполнения работы

### **1. Подготовка пробы к анализу.**

Для проведения ТСХ анализа, приготовить растворы изучаемых объектов в хлороформе в соотношении масло – растворитель (1:2). Раствор элюента налить в камеру, закрыть крышкой и оставить на 15 мин, для насыщения камеры парами растворителя.

При анализе сырого растительного материала около 1 г сырья залить 5 см<sup>3</sup> хлороформа в колбе 25 см<sup>3</sup>, экстрагировать около 1,5 ч. Профильтровать, фильтрат использовать для определения.

Стандартный раствор β-каротина развести хлороформом до концентрации близкой к концентрации исследуемого раствора (оценить по литературным данным).

### **2. Подготовка хроматографической пластинки.**

На хроматографической пластинке разметить линию старта на расстоянии 1 см от края пластинки. На линию старта нанести пятна исследуемых растворов и стандартного раствора β-каротина (диаметр пятна не более 0,5 см).

Подсушить пластинку, не допуская, тем не менее, полного высушивания пятна пробы. Подсушивание производить без доступа прямого солнечного света.

### **3. Проведение анализа.**

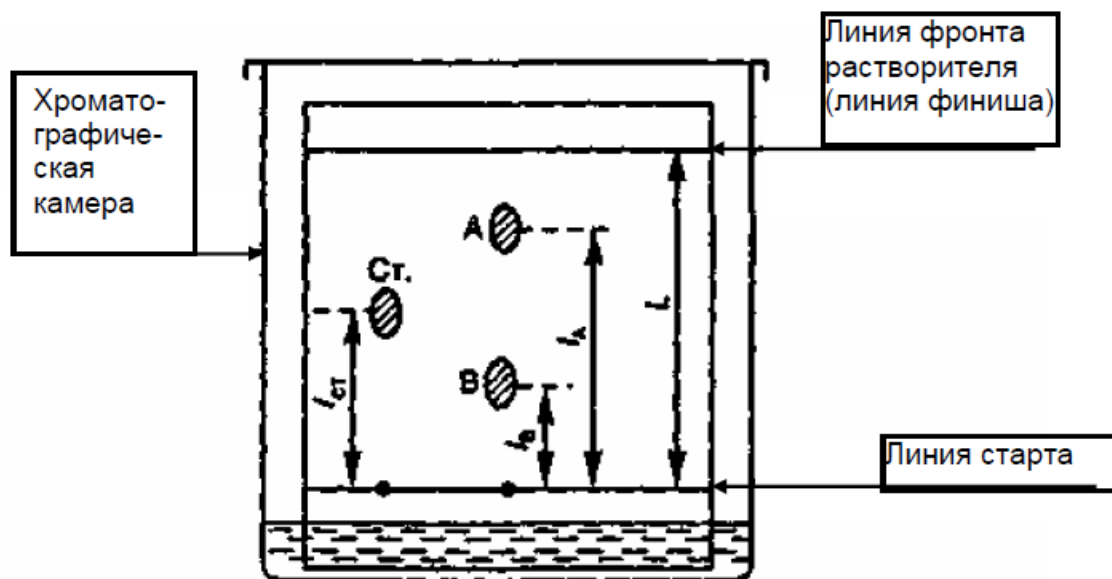
Опустить пластинку в камеру, уровень элюента на 0,3 см от начала пятна. Проводить хроматографирование в затемненном помещении или защищая хроматографическую камеру от действия прямого яркого света во избежание обесцвечивания хроматографических зон, что обусловлено высокой фотолабильностью β-каротина.

По достижению растворителя 0,5-1,0 см от конца пластинки, достать её из камеры, отметить карандашом линию фронта и дожидаться испарения элюента.

### **4. Обработка результатов.**

Так как β-каротин окрашен, проявление не требуется.

Измерить линейкой расстояние, пройденное растворителем и исследуемыми компонентами (рис. 2.2.1). Обычно при измерении выбирают точку в центре пятна.



**Рис. 2.2.1** – Схема разделения компонентов А и В методом ТСХ, заштрихованные пятна – положение компонентов на хроматограмме в конце опыта

Рассчитать подвижность  $R_f$ , которая равна отношению расстояния  $l$ , пройденного исследуемым веществом, к расстоянию  $L$ , пройденного растворителем:

$$R_f = \frac{l}{L}.$$

### 5. Анализ результатов.

Сравнить полученное значение  $R_f$  для исследуемых объектов с  $R_f$  для стандартного раствора  $\beta$ -каротина, а также с литературной величиной (0,38).

По необходимости визуально идентифицировать пятна  $\alpha$ -каротина и  $\gamma$ -каротина по величине пятен, если в природных объектах  $\alpha$ -каротина в среднем в 5 раз меньше чем  $\beta$ -каротина, а  $\gamma$ -каротина – следы.

## Лабораторная работа № 2.3

### Выделение $\beta$ -каротина из растительного сырья методом хроматографической адсорбции и его количественное определение методом спектрофотометрии

**Цель работы:** методом спектрофотометрии определить содержание каротина в растительном сырье.

**Оборудование и химическая посуда:** ступка фарфоровая с пестиком; кварцевый песок или стеклянный порошок; колба для фильтрования; воронки стеклянные; воронка делительная вместимостью 200 см<sup>3</sup>; колба Бунзена; колонка хроматографическая; вата гигроскопическая; колбы мерные 50 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>; цилиндр мерный 50 см<sup>3</sup>; фотоэлектрокалориметр.

**Реактивы и материалы:** рябина свежая или другой свежий растительный материал содержащий каротин (облепиха, морковь); стандартный раствор азобензола или бихромата калия (см. ниже); оксид алюминия (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) для хроматографических колонок; карбонат натрия (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); сульфат натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) безводный; ацетон; бензин либо петролейный эфир.

**Приготовление стандартного раствора азобензола.** 0,145 г предварительно перекристаллизованого из этилового спирта и высушенного азобензола растворяют в мерной колбе емкостью 100 см<sup>3</sup> в 95 % этиловом спирте и доводят до метки. Перед использованием 10 см<sup>3</sup> раствора разбавляют 95 % спиртом до 100 см<sup>3</sup>. Хранят раствор в темном месте.

**Приготовление стандартного раствора бихромата калия.** 0,360 г бихромата кали (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) растворяют в воде и доводят до 100 см<sup>3</sup>.

### Методика выполнения работы

Благодаря наличию у каротиноидов оранжево-желтой окраски возможно их прямое калориметрическое определение после экстракции из растительного сырья органическими растворителями (ацетон, бензин). Отделение мешающих окрашенных примесей, а также разделение каротинов на фракции производится методом хроматографической адсорбции на колонках с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

В качестве раствора сравнения при калориметрировании используют не только стандартный раствор  $\beta$ -каротина (он неустойчив), но также растворы бихромата калия и азобензола.

### ***1. Подготовка пробы к анализу.***

При анализе сырого растительного материала около 5-20 г измельчённого сырья растереть в фарфоровой ступке с кварцевым песком или стеклянным порошком. Так как каротин в кислой среде неустойчив, то для нейтрализации кислот при растирании добавить немного карбоната натрия.

После растирания в ступку постепенно добавить 10 см<sup>3</sup> ацетона и снова растереть. Содержимое ступки профильтровать под вакуумом, смыть ступку ацетоном и промыть материал на фильтре небольшими порциями ацетона до исчезновения окраски стекающего фильтрата.

Ацетоновый экстракт перенести в делительную воронку. Чтобы перевести пигмент в бензин ли, к экстракту в делительной воронке добавить 10-20 см<sup>3</sup> бензина и смесь тщательно перемешать. Ацетон из смеси удаляют промыванием водой, добавляя её небольшими порциями и слегка встряхивая смесь. Промывные воды слить, они не должны содержать растворимых в бензине пигментов.

Полностью очищенный от ацетона бензиновый раствор просушить фильтрованием через безводный сульфат натрия.

### ***2. Подготовка хроматографической колонки.***

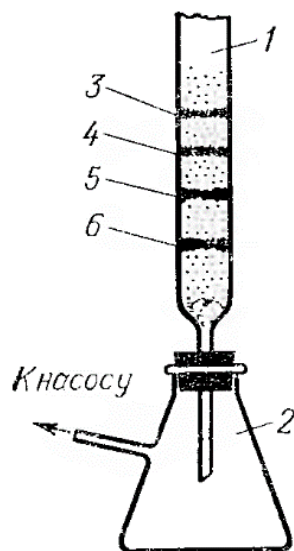
На дно хроматографической колонки диаметром 1-1,5 см и длиной 15-20 см (рис. 2.3.1) поместить плотный ватный тампон толщиной 1 см, который будет препятствовать прохождению адсорбента в приёмник. Затем в колонку внести небольшими порциями оксид алюминия, слегка уплотняя каждую порцию стеклянной палочкой. Длина столбика адсорбента в колонке должна составлять 5-7 см. Далее опять поместить ватный тампон и насыпать слой безводного сульфата натрия толщиной около 0,5 см.

### ***3. Очистка экстракта.***

Бензиновый раствор пигментов (кроме каротинов в растворе могут содержаться хлорофилл, ксантофилл, ликопин и др.) при слабом отсасывании пропустить через хроматографическую колонку. Необходимо следить, чтобы на поверхности адсорбента постоянно был слой бензина, так как каротин окисляется под действием воздуха.

Каротин адсорбируется оксидом алюминия слабее других пигментов, поэтому при пропускании через колонку чистого бензина он выйдет в приёмник первым. Визуально в колонке наблюдается отделение жёлтой полосы.

Конец хроматографирования определяют по исчезновению жёлтой окраски вытекающего из колонки элюата. Бензиновый раствор каротина перенести в мерную колбу на 100 мл и довести бензином до метки.



**Рис. 2.3.1.** – Хроматографическое разделение каротиноидов на оксиде алюминия: 1 – хроматографическая колонка; 2 – колба Бунзена; 3 – ликопин; 4 - α-каротин; 5 - β-каротин; 6 - γ-каротин.

### **3. Калориметрическое определение каротина.**

Измерить оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектрокалориметре или спектрофотометре при длине волны 440 нм, сравнивая со стандартным раствором азобензола или дихромата калия.

Если раствор каротина получился слишком концентрированным рекомендуется разбавить его растворителем.

### **4. Обработка результатов.**

Количество каротина  $X$  (в мг на 100 г) рассчитывается по формуле:

$$X = \frac{K \cdot D \cdot V \cdot 100}{D_{cm} \cdot m},$$

где  $K$  - количество мг каротина в  $1 \text{ см}^3$ , которому соответствует стандартный раствор (0,00208 мг, если стандартный раствор - дихромат калия, и 0,00235 мг, если стандартный раствор - азобензол)  $D$  - оптическая

плотность исследуемого раствора;  $D_{cm}$  - оптическая плотность стандарта;  $m$  – навеска растительного материала, г;  $V$  – объём раствора каротина, приготовленный для фотометрирования, см<sup>3</sup>.

### 5. Анализ результатов.

Сравнить полученное содержание каротина с литературными данными.

Таблица 2.3.1.

Содержание  $\beta$ -каротина в некоторых растениях

Растение	Содержание $\beta$ -каротина, мг/100 г
Морковь	9,00
Рябина красная	8,00
Рябина черноплодная	1,20
Сельдерей (зелень)	4,50
Томаты грунтовые	1,20
Томаты парниковые	0,50
Шпинат	4,50
Тыква	1,50
Абрикос	1,60
Облепиха	1,50
Шиповник	2,60

## Лабораторная работа № 2.4

### Особенности пробоподготовки при количественном определении жирорастворимых витаминов

**Цель работы:** Отобрать пробу пищевого продукта, подготовить его к анализу жирорастворимых витаминов и качественно доказать их наличие в пробе.

**Оборудование и химическая посуда:** весы; разновесы; колба ёмкостью 100 см<sup>3</sup>; обратный холодильник; пипетка 10 см<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup>, 200 см<sup>3</sup>; мерный цилиндр 10 см<sup>3</sup>, 25 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup>; водяная баня; термометр; делительная воронка; бумажный фильтр; воронки для фильтрования; колба Бунзена; водоструйный насос; установка для перегонки.



**Реактивы и материалы:** объекты для определения витаминов (рыбий жир, печень рыб или животных, молоко, молочные смеси для детского питания, яйца); раствор гидроксида калия (KOH), спиртовой 0,5 моль/дм<sup>3</sup> и 20%-й, водный 60%-й, 50%-й; диэтиловый эфир; петролейный эфир; фенолфталеин, спиртовой раствор; безводный сульфат натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); хлороформ; этиловый спирт; пирогаллол или гидрохинон; кристаллы бутилокситолуола; гексан; аскорбиновая кислота, сухая; насыщенный раствор сульфата железа (II) (FeSO<sub>4</sub>) в ледяной уксусной кислоте; концентрированный раствор серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); ; 1%-й раствор брома (Br<sub>2</sub>) в хлороформе; концентрированная азотная кислота (HNO<sub>3</sub>); 1%-й раствор хлорида железа (III) (FeCl<sub>3</sub>).

### Методика выполнения работы

Определение жирорастворимых витаминов проводят как биологическими так и физико-химическими методами. Физико-химические методы, как правило, требуют предварительного выделения, хроматографической очистки и разделения исследуемых форм витаминов.

#### *Витамин А.*

При проведении анализа и хранении проб следует учитывать высокую чувствительность витамина А и каротиноидов к УФ-свету, окислителям и температуре выше 40°C.

При анализе природных объектов сложного состава пробы предварительно омыляют раствором щелочи (KOH), добавляя пирогаллол, гидрохинон или аскорбиновую кислоту для предотвращения окисления витамина А.

Омыление производят для отделения жировой фракции, которая при этом разрушается, и более полной дальнейшей экстракции витамина А. Экстракция проводится различными растворителями, чаще всего используется диэтиловый эфир, изопропиловый спирт и др. Затем растворитель-экстрагент отгоняется и проводится определение витамина выбранным методом.

Без омыления определение витамина А производят в объектах с высоким его содержанием – высокоактивные препараты витамина А в масле, образцы печени животных, получавших высокие дозы витамина А и т.д.

Выделение каротиноидов из животных тканей происходит как при анализе витамина А (омыление→экстракция). При определении каротиноидов в растительном сырье с малым содержанием жира омыление не делают. В

качестве экстрагентов используют гексан, ацетон, петролейный эфир, этанол.

### ***Витамин D.***

Пробоподготовка подразумевает тщательную предварительную очистку исследуемого материала. В большинстве природных объектов, кроме жира печени некоторых рыб, витамина D чрезвычайно мало, что требует его концентрирование.

Обычно пробоподготовка для определения витамина D включает в себя следующие операции:

1) щелочной гидролиз продукта (омыление водно-спиртовым раствором КОН). Из-за нестойкости витаминов D в присутствии воды к раствору для омыления добавляют гидрохинон (антиоксидант);

2) экстракция неомыляемой части эфиром (гексаном) и его последующее удаление;

3) растворение остатка в хлороформе;

4) количественное определение.

В некоторых случаях при необходимости отдельного определения эргокальциферола и холекальциферола омыление не производят, только длительную экстракцию смесью хлороформ-метанол.

### ***Витамин E.***

Обычно пробоподготовка включает в себя экстракцию токоферолов органическими растворителями, осторожное омыление (в присутствии аскорбиновой кислоты) и хроматографическое разделение.

### ***Витамин K.***

В связи с высокой чувствительностью витамина K к УФ-свету и кислорода все операции проводят при рассеянном свете в инертной атмосфере.

Выделение витамина K производят различными экстрагентами в зависимости от вида объекта. В качестве экстрагентов используют изооктан, гептан, петролейный эфир, пропанол. Отдельные формы витамина разделяются с помощью колоночной или газожидкостной хроматографии.

## ***1. Отбор пробы.***

*Твёрдые жиры и масла.* Среднюю пробу твёрдых жиров и масел в количестве не менее 200 г расплавляют в склянке на водяной бане при 45-

50°C с перемешиванием во избежание расслоения, затем охлаждают и отбирают навеску для анализа.

*Жидкие жиры и масла.* Отбирают пробу пипеткой в количестве 200 см<sup>3</sup>.

*Молоко.* Молоко в количестве не менее 200 см<sup>3</sup> тщательно перемешивают.

*Твердые ткани и органы животных.* Твердые ткани и органы животных в количестве не менее 200 г перед взятием навески измельчают ножницами или в мясорубке и перемешивают в ступке.

*Яйца.* От десяти яиц отделяют желтки, взвешивают для установления массы одного желтка, затем хорошо смешивают, избегая взбалтывания, и отбирают пробу для анализа.

Навески жидких проб отбирают пипеткой, твёрдых и плохо стекающих с пипетки - весовым способом.

## ***2. Пробоподготовка и определение витамина А в пищевых продуктах.***

В зависимости от вида исследуемого продукта провести пробоподготовку и доказать наличие витамина А в продукте с помощью одной из качественных реакций (см. л.р. 2.1).

### *а) Жиры рыб и морских млекопитающих.*

Навеску жира 0,5-1 г (точная навеска) поместить в колбу емкостью 100 см<sup>3</sup>, снабженную обратным холодильником; прибавить 10 см<sup>3</sup> спиртового раствора гидроксида калия 0,5 моль/дм<sup>3</sup> и омылять в течение 0,5-1 часа на водяной бане при температуре 85-90°C.

Содержимое колбы охладить, добавить 20 см<sup>3</sup> воды и перенести в делительную воронку. Смесь экстрагировать 50 см<sup>3</sup> эфира, а затем еще 2 раза по 25 см<sup>3</sup> эфира. Во избежание образования стойкой эмульсии экстракцию проводить в хорошо охлажденном растворе при осторожном помешивании.

Объединенные эфирные вытяжки промыть водой 3-4 раза по 20 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином).

К промытым эфирным вытяжкам добавить 6-8 г безводного сульфата натрия и оставить на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промыть несколькими порциями эфира, который отфильтровать в ту же колбу. Эфир отогнать в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 50°C.

Неомыляемый остаток растворить в хлороформе и использовать для доказательства наличия витамина А.

*б) Сливочное и топленое масло и маргарин и растительные витаминизированные масла.*

Навеску масла или маргарина 10-20 г омылить 20-40 см<sup>3</sup> 20% спиртового раствора гидроксида калия в течение 1-2 часов на водяной бане при температуре 85-90°C.

К охлаждённому раствору добавить двукратный объём воды и перенести смесь в делительную воронку. Смесь экстрагировать 75 см<sup>3</sup> эфира, а затем еще 2 раза по 25 см<sup>3</sup> эфира.

Объединенные эфирные вытяжки промыть водой 3-4 раза по 20 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином).

К промытым эфирным вытяжкам добавить 6-8 г безводного сульфата натрия и оставить на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промыть несколькими порциями эфира, который отфильтровать в ту же колбу. Эфир отогнать в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 50°C.

Неомыляемый остаток растворить в хлороформе и использовать для доказательства наличия витамина А.

*в) Молоко.*

От 100 до 200 см<sup>3</sup> молока смешать с водным 60 %-ым раствором гидроксида калия и 20-40 см<sup>3</sup> этанола. Смесь поставить в тёмное место на 48 ч при температуре 20-25°C, периодически взбалтывая содержимое колбы.

Экстракцию неомыляемого остатка проводят в делительной воронке отдельными порциями эфира 4 раза: 75 см<sup>3</sup> эфира в первый раз и 30-40 см<sup>3</sup> в три последующих раза.

Объединенные эфирные вытяжки промыть водой 3-4 раза по 20 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином).

К промытым эфирным вытяжкам добавить 6-8 г безводного сульфата натрия и оставить на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промыть несколькими порциями эфира, который отфильтровать в ту же колбу. Эфир отогнать в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 50°C.

Неомыляемый остаток растворить в 5-10 см<sup>3</sup> хлороформа и использовать для доказательства наличия витамина А.

*г) Печень животных.*

К навеске печени около 3 г добавить 10-20 см<sup>3</sup> этилового спирта и 1 см<sup>3</sup> 60%-ного водного раствора гидроксида калия, поместить в колбу ёмкостью 100 см<sup>3</sup>, снабженную обратным холодильником; и нагревать на водяной бане при температуре 85-90°C не менее 2 часов до полного растворения ткани. Если растворения не произошло добавить ещё 10-20 см<sup>3</sup> спирта и продолжить омыление до полного растворения.

К содержимому колбы добавить 10-20 см<sup>3</sup> спирта и двойное (по отношению к общему объёму спирта) количество воды. Неомыляемую фракцию трижды экстрагировать эфиром: 50 см<sup>3</sup>, 25 см<sup>3</sup> и 25 см<sup>3</sup>.

Объединенные эфирные вытяжки промыть водой по 30-40 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином). К промытым эфирным вытяжкам добавить 8 г безводного сульфата натрия и оставить на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промыть несколькими порциями эфира, который отфильтровать в ту же колбу. Эфир отогнать в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 50°C. Неомыляемый остаток растворить в 10 см<sup>3</sup> хлороформа и использовать для доказательства наличия витамина А.

*д) Яйца.*

К навеске яичного желтка около 20 г добавить 10-20 см<sup>3</sup> этилового спирта и 6 см<sup>3</sup> 60%-ного водного раствора гидроксида калия, поместить в колбу ёмкостью 100 см<sup>3</sup>, снабженную обратным холодильником; и нагревать на водяной бане при температуре 85-90°C не менее 2 часов.

По окончании омыления к содержимому колбы добавить 10-20 см<sup>3</sup> спирта и двойное (по отношению к общему объёму спирта) количество воды. Неомыляемую фракцию трижды экстрагировать эфиром: 50 см<sup>3</sup>, 25 см<sup>3</sup> и 25 см<sup>3</sup>.

Объединенные эфирные вытяжки промыть водой по 30-40 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином). К промытым эфирным вытяжкам добавить 8 г безводного сульфата натрия и оставить на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промыть несколькими порциями

эфира, который отфильтровать в ту же колбу. Эфир отогнать в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 50°C.

Неомыляемый остаток растворить в 10 см<sup>3</sup> хлороформа и использовать для доказательства наличия витамина А.

## ***2. Пробоподготовка и определение витамина D в пищевых продуктах.***

В зависимости от вида исследуемого продукта провести пробоподготовку и доказать наличие витамина D в продукте с помощью одной из качественных реакций (см. л.р. 2.1).

*Жиры рыб и морских млекопитающих, растительные масла.*

Навеску жира 0,5-1 г (точная навеска) поместить в колбу емкостью 100 см<sup>3</sup>, снабженную обратным холодильником, добавить 100-150 мг пирогаллола или гидрохинона (на кончике скальпеля), 50-70 см<sup>3</sup> этилового спирта и 10-15 см<sup>3</sup> 50%-го раствора гидроксида калия. Полученный раствор нагревать на водяной бане при температуре 85±2°C в течение 25 мин, периодически помешивая содержимое колбы.

Содержимое колбы охладить, добавить 20-25 см<sup>3</sup> воды и перенести в делительную воронку. Смесь экстрагировать 50 см<sup>3</sup> эфира, а затем еще 2 раза по 50 см<sup>3</sup> эфира. При образовании устойчивой эмульсии в делительную воронку добавляют 20 см<sup>3</sup> этилового спирта.

В объединенные эфирные вытяжки добавить несколько и промыть водой 3-4 раза по 100 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином). Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр со слоем безводного сульфата натрия (30-50 г).

Эфир выпарить досуха на водяной бане в токе азота или аргона при температуре не выше 50 °С.

Сухой остаток растворить в 4 см<sup>3</sup> петролейного эфира (гексана) и использовать для доказательства наличия витамина D.

## ***3. Пробоподготовка и определение витамина E в пищевых продуктах.***

*Молочное детское питание.*

Навеску сухого продукта для гидролиза берут в зависимости от содержания витамина E в продукте (табл. 2.4.1)

Навеску растворить в 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды в колбе емкостью 100 см<sup>3</sup>, добавить 100-150 мг аскорбиновой кислоты, прилить 40 см<sup>3</sup> этилового спирта и, при помешивании, 5-7 см<sup>3</sup> 50%-го раствора гидроксида калия. Полученный раствор прокипятить в течение 30 мин.

Таблица 2.4.1

Зависимость массы навески от содержания витамина Е в продукте

Массовая доля витамина Е, 10 <sup>-4</sup> %	Содержание β-каротина, мг/100 г
8,5-15	10,0±0,4
15-45	5,0±0,4
45-120	2,0±0,4

Для жидких и пастообразных продуктов навеска около 15 г.

Содержимое колбы охладить и перенести в делительную воронку, колбу ополоснуть 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, воду слить в воронку. Если омыление прошло полностью, не должно образовываться мути при добавлении воды. В противном случае гидролиз повторить, увеличив объём щёлочи.

Смесь экстрагировать три раза по 25 см<sup>3</sup> эфира (диэтилового или петролейного).

В объединенные эфирные вытяжки промыть водой 3-4 раза по 50-60 см<sup>3</sup> до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином). Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр со слоем безводного сульфата натрия (20-30 г).

Эфир отогнать под вакуумом в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше 30°C для диэтилового эфира и 50°C для петролейного.

Сухой остаток растворить в 15 см<sup>3</sup> абсолютного этилового спирта и использовать для доказательства наличия витамина Е.

## Лабораторная работа № 2.5

### Определение массовой доли витамина А методом прямой спектрофотометрии

**Цель работы:** Определить массовую долю витамина А в пищевых продуктах методом прямой спектрофотометрии.

**Оборудование и химическая посуда:** весы; разновесы; колба 100 см<sup>3</sup>; обратный холодильник; делительная воронка; мерный цилиндр 50 см<sup>3</sup>; воронка; бумажные фильтры синяя лента; установка для

перегонки; кюветы для спектрофотометра 1 см; фарфоровая ступка.

**Реактивы и материалы:** тресковый рыбий жир; этиловый спирт; 50%-ный раствора гидроксида калия (KOH); диэтиловый эфир; фенолфталеин; безводный сульфат натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ); гексан.

**Приготовление безводного сульфата натрия.** Сульфат натрия нагревают в фарфоровой чашке при температуре  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  часто помешивая до образования рыхлого порошка.

## Методика выполнения работы

*Количественное определение витамина А в тресковом рыбьем жире с предварительным омылением пробы.*

### **1. Подготовка пробы к анализу.**

Около 1 г жира (точная навеска) поместить в колбу емкостью  $100 \text{ см}^3$ , снабженную обратным холодильником; прибавить  $30 \text{ см}^3$  спирта, не содержащего альдегидов,  $3 \text{ см}^3$  50%-ного водного раствора гидроксида калия и дефлегмировать смесь 30 мин. Содержимое колбы охладить, добавить  $50 \text{ см}^3$  воды и перенести в делительную воронку. Смесь экстрагировать  $50 \text{ см}^3$  эфира, а затем еще 2 раза по  $30 \text{ см}^3$  эфира. Объединенные эфирные вытяжки промыть водой по  $30\text{-}40 \text{ см}^3$  до нейтральной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином). К промытым эфирным вытяжкам добавить 8 г безводного сульфата натрия и оставить на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем отфильтровать содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промыть несколькими порциями эфира, который отфильтровать в ту же колбу. Эфир отогонать в токе азота или аргона на водяной бане при температуре не выше  $50^\circ\text{C}$ . Неомыляемый остаток растворить в абсолютном спирте до получения раствора, содержащего в  $1 \text{ см}^3$  около 3 мкг (8-10 МЕ) витамина А.

### **2. Проведение измерения.**

Измерить 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.

### **3. Обработка результатов.**

Содержание витамина А в международных единицах (МЕ, 1 МЕ соответствует 0,344 мкг ретинола ацетата) в 1 г жира ( $X$ ) вычислить по формуле:



$$X = \frac{D_A \cdot V}{m \cdot 100} \cdot 1850,$$

где  $D_A = 7 \cdot D_{324,5} - 2,912 \cdot D_{311} - 4,088 \cdot D_{334}$  ( $D_{324,5}$ ,  $D_{311}$ ,  $D_{334}$  - оптические плотности раствора при соответствующих длинах волн);  $m$  - навеска препарата, г;  $V$  - объём спиртового раствора, приготовленный для фотометрирования, см<sup>3</sup>; 1850 - коэффициент пересчета в МЕ.

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

### ***Количественное определение витамина А в без предварительного омыления пробы.***

В отдельных случаях в таких природных объектах как желток яйца, крови, печени и почках витамин А можно определять без предварительного омыления пробы.

#### ***1. Подготовка пробы к анализу.***

Желток предварительно сварить. От печени или другого органа отрезать часть и точно взвесить. Растереть пробу в фарфоровой ступке с 5-10-кратным количеством безводного сульфата натрия. Полученный порошок перенести в коническую колбу 200-300 см<sup>3</sup>. Провести экстракцию смесью гексан-диэтиловый эфир (4:1). Экстракцию проводить восьмикратно, объём растворителя 15 см<sup>3</sup>, время экстрагирования 5-10 мин. Отфильтровать содержимое колбы через бумажный фильтр. Фильтрат упарить досуха, остаток растворить в абсолютном спирте до получения раствора, содержащего в 1 см<sup>3</sup> около 3 мкг (8-10 МЕ) витамина А.

#### ***2. Проведение измерения.***

Измерить оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 326 нм, применяя в качестве контрольного раствора абсолютный спирт.

#### ***3. Обработка результатов.***

Содержание витамина А в международных единицах (МЕ) в 1 кг исследуемого объекта ( $X$ ) вычислить по формуле:

$$X = \frac{18,3 \cdot D_A \cdot V \cdot 10^3 \cdot 1,15}{m},$$

где  $D_A$  - оптическая плотность раствора при 326 нм;  $m$  - навеска препарата, г;  $V$  - объём спиртового раствора, приготовленный для фотометрирования, см<sup>3</sup>;  $10^3$  - коэффициент пересчета граммов в килограммы, 18,3 - массовая доля ретинола в абсолютном спирте, который имеет оптическую плотность равную 1, при 326 нм и толщине поглощающего слоя 1 см, МЕ/см<sup>3</sup>; 1,15 - коэффициент пересчета ретинола в ретинол-ацетат.

## Лабораторная работа № 2.6

### Определение массовой доли токоферола ацетата (витамина Е) в масляных растворах

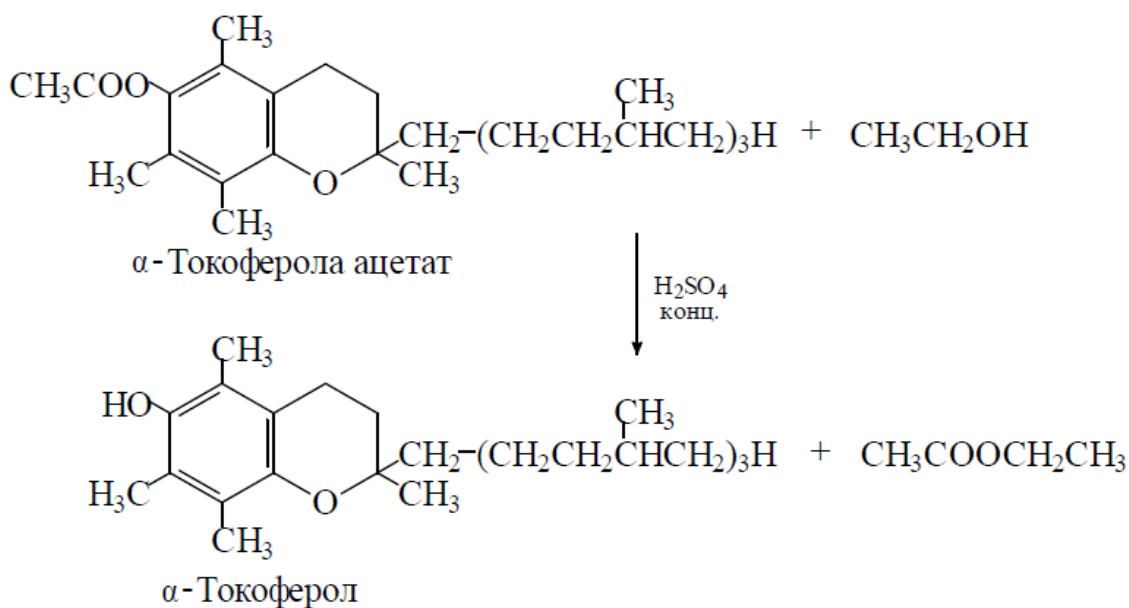
**Цель работы:** определить массовую долю витамина Е в лекарственном препарате методом цериметрического титрования.

**Оборудование и химическая посуда:** весы; разновесы; колба 100 см<sup>3</sup>; мерная колба 50 см<sup>3</sup>; обратный холодильник; водяная баня; колбы для титрования; бюретка.

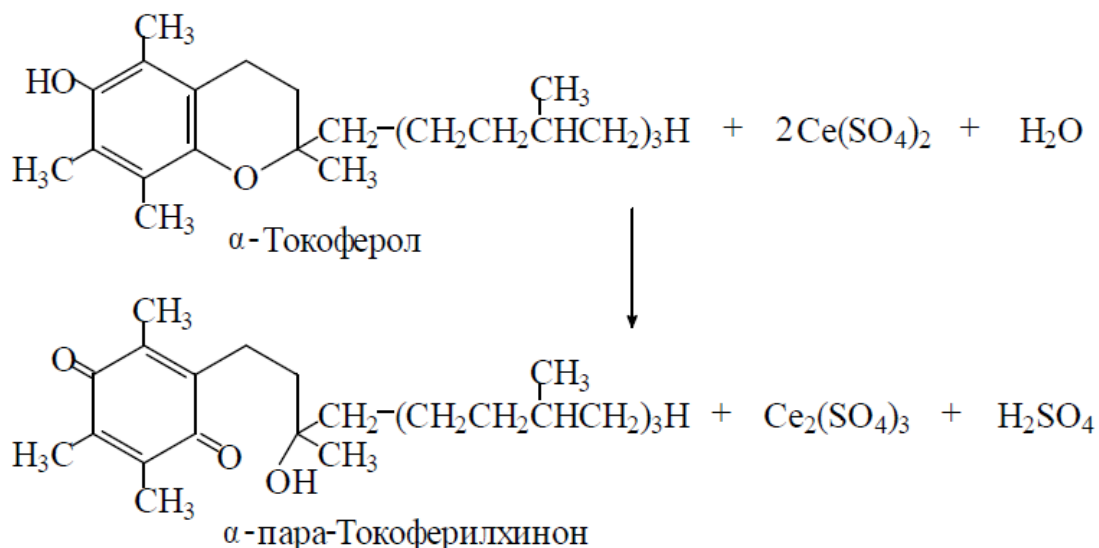
**Реактивы и материалы:** масляный раствор витамина Е; этиловый спирт абсолютный; серная кислота (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), концентрированная; раствор дифениламина в 85%-ной серной кислоте, 0,5%-ный; раствор сульфата церия (IV) (Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), 0,01 моль/дм<sup>3</sup>.

### Методика выполнения работы

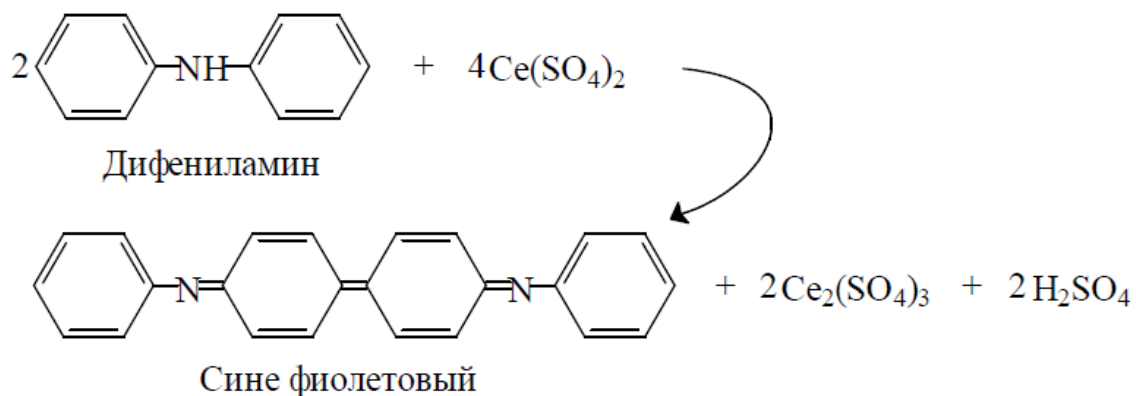
Для количественного определения токоферола ацетата в лекарственных препаратах применяется метод цериметрического титрования. Определение основано на предварительном превращении токоферола ацетата в  $\alpha$ -токоферол и окислении последнего сульфатом церия в среде абсолютного этилового спирта, который устойчив к действию этого окислителя. Проведение количественного анализа в водной среде невозможно, поскольку препарат практически нерастворим в воде.  $\alpha$ -Токоферола ацетат превращают в  $\alpha$ -токоферол реакцией переэтерификации с этиловым спиртом в присутствии концентрированной серной кислоты:



Образовавшийся  $\alpha$ -токоферол титруют водным 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствором сульфата церия с индикатором дифениламин до появления сине-фиолетового окрашивания. Сульфат церия (IV) окисляет  $\alpha$ -токоферол до  $\alpha$ -пара-токоферилхинона:



В точке эквивалентности дифениламин окисляется сульфатом церия (IV) с образованием продукта окисления сине-фиолетового цвета:



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

### 1. Подготовка пробы к анализу.

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.

### 2. Проведение измерения.

10 мл полученного 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 раствором сульфата церия (IV) 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до появления сине-фиолетового окрашивания, устойчивого в течение 10 с.

Повторить титрование три раза.

### 3. Обработка результатов.

Усреднить результаты трех параллельных опытов.

Содержание токоферола ацетата (%) рассчитать по формуле:

$$\omega = \frac{0,002364 \cdot \bar{V} \cdot 100}{m},$$

где  $\omega$  - массовая доля токоферола ацетата, %;  $\bar{V}$  - средний объём раствора  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , который пошёл на титрование,  $\text{см}^3$ ;  $m$  - навеска масляного раствора токоферола ацетата.

#### **4. Анализ результатов.**

Полученные результаты сравнить с содержанием токоферола ацетата, заявленным в инструкции к препарату. Сделать выводы.

### **Контрольные вопросы к разделу 2**

1. Витамины группы А. Химическое строение, природные формы, их биологическая активность. Антивитамины.

2. Химические свойства витамина А.

3. Каротиноиды. Химическое строение, биологическая активность, химические свойства.

4. Приведите качественные реакции витамина А.

5. Методы количественного определения витамина А и каротиноидов.

6. Приведите описание установки для выполнения тонкослойной хроматографии.

7. Какая характеристика используется для идентификации пятен, полученных при ТСХ?

8. Каким методом отделяют каротины от других красителей при их количественном определении в растительном сырье? Опишите подробно.

9. Сохранение и стабилизация каротиноидов и витамина А в пищевых продуктах. Применение.

10. Витамины группы D. Химическое строение, природные формы, их биологическая активность, провитамины.

11. Физико-химические свойства витаминов группы D. Превращение провитаминов в витамины.

12. Приведите качественные реакции витамина D.

13. Методики количественного определения витамина D.

14. Сохранение и стабилизация витамина D в пищевых продуктах. Применение.

15. Витамины группы E. Химическое строение, природные формы, их биологическая активность, провитамины.

16. Химические свойства витаминов группы E.

17. Приведите качественные реакции витамина E.

18. Методики количественного определения витамина E. Сохранение и стабилизация витамина E в пищевых продуктах. Применение.

19. Витамины группы К. Химическое строение, природные формы, их биологическая активность, провитамины.

20. Химические свойства витаминов К. Методики количественного определения витамина К. Сохранение и стабилизация витамина К в пищевых продуктах. Применение витамина К.

21. Приведите качественные реакции витамина А.

## Раздел 3

### Витаминоподобные соединения

Как уже было отмечено ранее, наряду с витаминами, необходимость которых для животных и человека установлена бесспорно, в пище имеются биологически активные вещества, дефицит которых не приводит в силу тех или иных причин к явно выраженным нарушениям или которые по своим функциям ближе не к витаминам, а к другим незаменимым пищевым веществам. К этой группе веществ обычно относят биофлавоноиды, холин, инозит, карнитин, липоевую, оротовую, пангамовую и парааминобензойную кислоты, убихиноны и витамин.

#### 3.1. Биофлавоноиды (витамин Р)

Биофлавоноиды – группа биологически активных веществ растительного происхождения, оксипроизводных флавана, обладающих способностью увеличивать прочность кровеносных капилляров. Общей чертой химической структуры различных биофлавоноидов является наличие у них нескольких фенольных гидроксилы, которые могут быть метилированы или образовывать гликозидные связи с остатками сахаров: глюкозы, рамнозы, рамноглюкозы. Известно более 2000 различных биофлавоноидов. Важнейшими из них являются производные флавана: д-катехин и l-эпикатехин, представляющие собой стереоизомеры 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавана: производные флавана: кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаоксифлаванон) и его гликозиды - кверцитрин (кверцетин-3-рамнозид) и рутин (кверцетин-3-рамноглюкозид), а также производные флаванона: геснеретин (5,7,3'-триокси-4-метоксифлаванон) и его рамноглюкозид гесиеридин. Кроме того, известны биофлавоноиды с разомкнутым пирановым кольцом: халконы и дигидрохалконы. Биологической активностью витамина Р обладают также кумарины и антоцианы.

Большинство биофлавоноидов - кристаллические вещества желтого, желто-зеленого или оранжевого цвета, нерастворимые в эфире, хлороформе и бензоле. Катехины хорошо растворяются в воде. Рутин и кверцетин практически нерастворимы в холодной воде, трудно растворимы в кипящей воде и спиртах, растворяются в разбавленных щелочах.

Как уже было отмечено, биофлавоноиды обладают способностью повышать прочность кровеносных капилляров и нормализовывать их проницаемость. Впервые это свойство было обнаружено в 1936 г. Сент-

Дьердьи с сотрудниками, которые установили, что препараты лимонного сока и красного перца, содержащие вещества флавоновой природы, излечивают геморрагические диатезы у людей, не поддающиеся лечению аскорбиновой кислотой. Эти соединения получили название «витамин Р» (по первой букве английского слова permeability - проницаемость). В дальнейшем были описаны симптомы Р-авитаминоза у человека и экспериментальных животных. По Скарборо, этими проявлениями являются боли в плечах и ногах, особенно при ходьбе, общая слабость, быстрая утомляемость. К более специфическим проявлениям Р-авитаминоза относятся мелкие внутрикожные кровоизлияния (петехии), возникающие спонтанно, особенно на участках, подвергающихся давлению, и исчезающие после приема биофлавоноидов. В отличие от мелких геморрагий, обусловленных дефицитом биофлавоноидов, обширные кровоизлияния в подкожную клетчатку и мышцы излечиваются только аскорбиновой кислотой.

Для выявления дефицита биофлавоноидов используют функциональные пробы, оценивающие прочность капилляров при воздействии на кожу дозированного положительного или отрицательного давления, например, пробу А. И. Нестерова.

Количество разнообразных в химическом отношении биофлавоноидов, поступающих с пищей, довольно велико. Кроме того, биофлавоноиды не накапливаются в организме, а подвергаются быстрым окислительным превращениям до фенольных кислот: п-оксибензойной, м-оксибензойной, ванилиновой, протокатеховой и т. д. Все это затрудняет разработку прямых методов оценки обеспеченности организма человека биофлавоноидами путем определения этих соединений или продуктов их катаболизма в крови и моче.

Потребность человека в витамине Р сколько-нибудь точно не установлена. По некоторым оценкам она может составлять 30-50 мг в сутки.

Поскольку укрепляющим капилляры действием обладают многие вещества полифенольной природы, вопрос о витаминной природе биофлавоноидов остается спорным.

Механизм капилляроукрепляющего действия биофлавоноидов также не вполне ясен. В соответствии с одной из наиболее ранних гипотез истинным капилляроукрепляющим действием обладает адреналин, роль биофлавоноидов состоит в предохранении его от окисления в адренохром. Другая гипотеза связывает капилляроукрепляющие свойства биофлавоноидов с их тормозящим действием на гиалуронидазу. Однако



убедительные данные о подобном действии биофлавоноидов в условиях целостного организма отсутствуют. Третья гипотеза связывает активность биофлавоноидов с их участием в обмене аскорбиновой кислоты. В пользу подобных представлений свидетельствуют данные Сент-Дьердьи о том, что витамин Р активен только в присутствии хотя бы следов аскорбиновой кислоты, а также сведения об экономизирующем действии биофлавоноидов в отношении витамина С. Это действие биофлавоноидов может быть обусловлено их способностью тормозить окисление аскорбиновой кислоты, катализируемое ионами тяжелых металлов, с которыми биофлавоноиды образуют хелатные комплексы

С другой стороны, биофлавоноиды могут принимать участие в ферментативном окислении аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую, которая, как полагают, является транспортной формой витамина С, легко проникающей через биологические мембраны.

Наконец, образуемая при окислении биофлавоноидов п-оксибензойная кислота является ключевым предшественником бензохинонового кольца у бихинонов, что может указывать на участие биофлавоноидов в биосинтезе этого важного переносчика электронов в цепи окислительного фосфорилирования.

Существенная роль в механизме действия биофлавоноидов принадлежит их антиоксидантным свойствам, в частности способности тормозить свободнорадикальные процессы перекисного окисления липидов и окислительной модификации липопротеидов. С этим свойством биофлавоноидов связывают перспективы их применения для снижения риска сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, а также их радиопротекторные эффекты.

Как уже отмечалось, биофлавоноиды являются продуктами жизнедеятельности растений. Особенно богаты ими листья чая, плоды цитрусовых (их кожура), шиповника, черноплодной рябины. Эти растения служат источником для получения медицинских препаратов биофлавоноидов. Значительные количества биофлавоноидов содержатся также в красном перце, черной смородине, землянике, малине, вишне, облепихе, некоторых сортах яблок, слив и винограда. В животных тканях биофлавоноиды обнаруживаются только после их приема с пищей.

В последнее время все большее внимание исследователей привлекают изофлавоны сои: гинестеин, даидзеин, глицинии - и их гликозиды: генистин, даидзин и глицитин, - обладающие эстрогеноподобной активностью и проявляющие выраженное ангиатерогенное, противоопухолевое и остеотропное действие. Для

определения отдельных биофлавоноидов в растительном сырье и биологических объектах используют различные методы хроматографии с последующей спектрофотометрией или по цветной реакции с диазотированными аминами, например с реактивом Фолина. Чувствительность последнего метода - 10-250 мкг/мл.

Биофлавоноиды: рутин, кверцетин, - а также препараты витамина Р из листьев чая, черноплодной рябины и цитрусовых применяют обычно в комплексе с аскорбиновой кислотой для профилактики и лечения С- и Р-гиповитаминозов, а также при заболеваниях, сопровождающихся повышением проницаемости кровеносных сосудов, геморрагических диатезах, атеросклерозе. Биофлавоноиды используют также в качестве пищевых красителей, антиоксидантов и дубильных веществ.

### 3.2. Холин

В химическом отношении холин представляет собой гидрат окиси триметил-β-оксиэтиламмония,  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}]\text{OH}^-$ , т. е. аминоэтиловый спирт, содержащий у атома азота три метильных группы. Это соединение с трудом кристаллизуется из-за своей исключительно высокой гигроскопичности и обычно существует в виде бесцветной вязкой сиропообразной жидкости с резко выраженными щелочными свойствами. Важнейшей солью холина и основной формой его промышленного выпуска (в том числе основным медицинским препаратом) является холинхлорид  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}]\text{Cl}^-$  - бесцветные гигроскопичные кристаллы с температурой плавления 105-107,5 °С. Как основание холина, так и его соли хорошо растворяются в воде, спирте, эфире и бензоле.

Холин широко распространен в природе, присутствует в животных тканях, растениях и микроорганизмах.

Значение холина для процессов жизнедеятельности определяется в основном следующими обстоятельствами. Холин входит в состав холинфосфатидов (лецитина) и ефнигномиелина, из которых первые являются обязательным компонентом липопротеиновых мембран клеток и субклеточных структур (митохондрий, ядер, цитоплазматического ретикулума), а второй участвует в образовании оболочки нервных клеток и волокон. Холин является также предшественником важнейшего нейромедиатора ацетилхолина и может использоваться как донор метильных групп в реакциях метилирования.

В отличие от витаминов группы В холин не принимает участия в механизмах ферментативного катализа, а используется в качестве пластического вещества при построении ряда важнейших структур живой ткани и синтезе биологически важных веществ. Кроме того, холин может синтезироваться в организме из аминокислоты серина. Все это не дает основания относить холин к витаминам. В то же время, поскольку холин выполняет в организме жизненно важные функции, а его эндогенный синтез у животных и человека ограничен, то он должен в обязательном порядке поступать с пищей и является, таким образом, незаменимым пищевым веществом.

Потребность человека в холине точно не определена и зависит от обеспеченности рациона белком (как источником серина и метионина), витамином В<sub>12</sub> и фолатом, участвующими в эндогенном синтезе холина. Поступление холина с обычным рационом составляет от 400 до 900 мг в сутки. Недостаток холина в пище в сочетании с белковой недостаточностью может вызывать жировую дегенерацию печени и способствовать развитию цирроза. У экспериментальных животных дефицит холина ведет к геморрагической дегенерации почек, в основе которой могут лежать нарушения процессов свертывания крови. Недостаток холина у человека встречается очень редко, главным образом в сочетании с белковой недостаточностью.

Надежных, хорошо разработанных тестов обеспеченности человека холином практически нет. Содержание общего холина (включая холин фосфолипидов) в цельной крови составляет 35 мг/100 мл. Свободный холин обнаруживается лишь в сыворотке крови, где его концентрация колеблется в пределах 4,7-6,8 мкг/мл.

Для количественного определения холина существуют микробиологические методы и колориметрические методы.

Холин входит в состав многих пищевых продуктов. Растительные продукты содержат меньше холина, чем животные. В последних содержание холина пропорционально содержанию в них фосфолипидов. Лучшим источником холина является яичный желток; богаты им печень (1,1-1,2 г/100 г), мозг, поджелудочная железа. Из растительных продуктов наиболее хорошим источником холина являются бобовые. В злаках холин находится в зародышевой части зерна. При варке мяса и печени потери холина составляют 18 %, растительных продуктов 11-14%.

Холин является одним из так называемых липотронных веществ, предупреждающих или уменьшающих жировую инфильтрацию печени.

Холинхлорид применяется при лечении гепатитов, цирроза печени, атеросклероза, хронического алкоголизма.

### 3.3. Инозит

Инозит в химическом отношении представляет собой шестиатомный циклический спирт гексаоксициклогексан. Он может существовать в виде восьми цис- и транс-стереоизомеров. Один из них, оптически недеятельный миоинозит (мезоинозит) является природной биологически активной формой. Это соединение существует в виде бесцветных кристаллов, с температурой плавления 225-227 °С, хорошо растворимых в воде (10-14 г/100 г), нерастворимых в органических растворителях.

Биологическая функция миоинозита определена его участием в построении инозитфосфатидов — обширной группы фосфолипидов, принимающих участие в построении мембранных структур клеток и внутриклеточных образований, в частности в нервной ткани, и играющих важную роль в транспорте катионов через биологические мембраны.

Подобно холину, инозит не является в строгом смысле витамином, хотя и относится к незаменимым пищевым веществам. Потребность человека в инозите точно неизвестна и по некоторым оценкам составляет 0,5-1,0 г в сутки. Недостаток инозита у экспериментальных животных вызывает выпадение волос, нервно-трофические расстройства (нарушение координации движений, судороги конечностей, нарушение и потерю зрения, двигательной деятельности желудка и кишечника), способствует, при недостатке белка, развитию жировой дистрофии печени, у птиц ведет к снижению содержания гемоглобина, развитию нормоцитарной анемии.

Инозит широко распространен в природе. Из продуктов животного происхождения им наиболее богаты мозг (200 мг/100 г), печень и сердце (60-200 мг/100 г). Мясо, рыба, яйца, молоко содержат меньшие количества инозита (10-50 мг/100 г). Из растительных продуктов хорошим источником инозита являются апельсины (250 мг/100 г), зеленый горошек (150-240 мг/100 г), пшеничные отруби и зародыши (соответственно 100 и 700-900 мг/100 г). Другие фрукты и овощи содержат меньше инозита (20-85 мг/100 г). Богаты инозитом дрожжи. В животных продуктах инозит присутствует главным образом в виде инозитфосфатидов, в растительных — в виде своего гексафосфорного эфира — фитина.

Концентрация свободного инозита в крови составляет 0,37-0.76 мг/100 г. Инозит используют как липотройное средство при болезнях печени. Имеются данные, что его включение в диету способствует уменьшению жировой инфильтрации печени у больных со злокачественными опухолями.

Гексафосфорный эфир инозита, фитин, присутствующий в зерновых про дуктах, способен прочно связывать ионы железа и кальция, делая невозможным их всасывание в кишечнике. Именно этим обусловлена высокая частота рахита и железодефицитной анемии в группах населения, одним из основных продуктов питания которых является хлеб из пресного теста. В дрожжевом тесте фитин расщепляется под влиянием фитазы дрожжей и тем самым утрачивает свое тормозящее действие на всасывание железа и кальция. Поскольку в желудочно-кишечном тракте человека фитаза отсутствует, то целесообразность использования фитина в лечебных целях в качестве дополнительного источника фосфора представляется сомнительной.

#### **3.4. Липоевая кислота (тиоктовая кислота, витамин N)**

В химическом отношении липоевая кислота представляет собой 6,8-дптио-октановую кислоту, т. е. октановую кислоту, содержащую в положении 6 и 8 дисульфидный мостик.

Липоевая кислота существует в виде двух оптически активных стереоизомеров и рацемата. Выделенная из природных источников (печень быка) L(+)- липоевая кислота кристаллизуется в виде желтых пластинок с температурой плавления 47,5 °С (из гексана) и вращает плоскость поляризованного света вправо + 96,7° (бензол). Тот же изомер, полученный синтетически, имеет температуру плавления 49-50 °С и +113°.

Синтетический рацемат, D,L-липоевая кислота, плавится при 60-61°С. Липоевая кислота поглощает свет в ближней ультрафиолетовой области с максимумом поглощения при 335 нм. Кроме липоевой кислоты из природных источников выделен также ее сульфоксид. Эти два соединения: природную липоевую кислоту и ее сульфоксид иногда называют соответственно  $\alpha$ -липоевой и  $\beta$ -липоевой кислотами.

Липоевая кислота легко восстанавливается цинком в кислой среде или боргидридом натрия в этаноле с образованием дигидролипоевой кислоты, содержащей вместо дисульфидной группы две SH-группы.

Биологическая активность и значение липоевой кислоты, для процессов жизнедеятельности определяются тем, что она входит в состав каталитического центра липоилтрансацилазы – одного из ферментов сложных мультиферментных комплексов, катализирующих окислительное декарбоксилирование пировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот. В ходе превращений, катализируемых укатынными комплексами, липоевая кислота, связанная амидной связью с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина в каталитическом центре липоилтрансацилазы, выполняет роль промежуточного переносчика альдегидного остатка подвергшейся декарбоксилированию пировиноградной или  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты от тиаминдифосфата на кофермент А. При этом альдегидный остаток подвергается одновременному окислению до соответствующего ацильного остатка (ацетила или сукцинила) за счет восстановления липоевой кислоты в дигидролипоевую. Таким образом, функции липоевой кислоты в этих процессах тесно переплетаются с (функциями витамина В<sub>1</sub> как предшественника тиаминдифосфата, оперирующего на первом этапе окислительного декарбоксилирования пировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот. На значение этих реакций в энергетическом и пластическом обеспечении жизнедеятельности было указано в разделе, посвященном тиамину.

Липоевая кислота является незаменимым фактором роста ряда микроорганизмов, неспособных к ее синтезу. Показана способность к синтезу липоевой кислоты кишечной палочкой. Однако вопрос о роли кишечной микрофлоры в обеспечении человека липоевой кислотой и возможности ее эндогенного синтеза в животных тканях почти не изучен, в связи с чем она не может быть с достаточным основанием отнесена к витаминам и рассматривается в группе витаминоподобных соединений.

Недостаточность липоевой кислоты у человека не описана. Ориентировочная потребность в ней человеческого организма составляет 0,5-2 мг в сутки. Источники покрытия этой потребности неясны.

Для количественного определения липоевой кислоты применяют микробиологические методы с использованием мутантных штаммов *Streptococcus faecalis* R и *Streptococcus faecalis* 10C1, *Escherichia coli* W, неспособных синтезировать эту кислоту.

Колориметрические методы, основанные на нитропруссидной реакции (чувствительность 10-100 мю мл) или на восстановлении липоевой кислоты в дигидролипоевую и взаимодействии последней с феррицианидом (чувствительность 5-50 мкг), используются для анализа

чистых препаратов липоевой кислоты и не пригодны для ее изучения в биологическом материале.

Описаны также полярографические методы определения липоевой кислоты, методы газовой и тонкослойной хроматографии.

Концентрация липоевой кислоты в сыворотке крови человека составляет 16-24 мкг/л, экскреция с мочой у детей — 7-24 мкг в сутки, у взрослых — 10-20 мкг за 12 часов.

Липоевая кислота обладает антиоксидантным и липотропным свойствами, улучшает функцию печени, оказывает дегоксицирующее действие при отравлении четыреххлористым углеродом, алкоголем, солями тяжелых металлов и других их токсикациях.

Липоевую кислоту и ее амид (линоамид) назначают с профилактической и лечебной целью при коронарном атеросклерозе, заболеваниях печени, диабетическом полиневрите, различных интоксикациях.

Выраженное гепатотропное действие липоевой кислоты может быть обусловлено ее способностью вступать в тиол-дисульфидные взаимодействия, поддерживая в восстановленном состоянии биологически активные SH-группы различных белков и ферментов.

### **3.5. Оротовая кислота (витамин В<sub>13</sub>)**

Оротовая кислота (синонимы — урацил-4-карбоновая, 2,4-диоксипиримидин-6-карбоновая кислота) представляет собой белое кристаллическое вещество с температурой плавления 345-346 °С (с разложением). Обладает максимумом поглощения в ультрафиолетовом свете при 280 нм в кислой среде (рН 2,0) и при 286 нм в щелочной (рН 12,0). Оротовая кислота растворима в воде (0,2 г/100 мл при 18 °С) и щелочах, нерастворима в разбавленных кислотах. Обладает кислотными свойствами, образует устойчивые соли с металлами, например оротат калия.

Оротовая кислота присутствует в животных тканях, растениях и микроорганизмах. Особенно богаты ею дрожжи, печень и молоко, откуда она была впервые выделена.

Биологическое значение оротовой кислоты состоит в том, что из нее в организме синтезируются пиримидиновые основания: урацил, цитозин и тимин, используемые для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Синтез пиримидиновых нуклеотидов из оротовой кислоты осуществляется путем присоединения к ней D-рибозил-5-фосфата, источником которого является 5-фосфорибозил-1-пирофосфат. Образующийся при этом оротидин-5-фосфат (оротидиловая кислота) подвергается декарбоксилированию с образованием уридин-5-фосфата (урациловой кислоты). Последний превращается в уридин- трифосфат (УТФ) и цитидинтрифосфат (ЦТФ).

Наряду с участием в синтезе нуклеиновых кислот, образующиеся из оротовой кислоты пиримидиновые нуклеотиды играют важную роль кофакторов-переносчиков: УТФ - в обмене и биосинтезе углеводов, ЦТФ - в биосинтезе фосфолипидов.

Оротовая кислота является единственным соединением с уже сформированным пиримидиновым циклом, которое используется для дальнейшего синтеза пиримидиновых нуклеотидов при его поступлении извне с пищей или фармакологическими препаратами. В отличие от нее свободные урацил, цитозин и тимин не утилизируются в тканях. Это придает оротовой кислоте особое значение единственного утилизируемого ((реформированного предшественника пиримидиновых нуклеотидов).

Оротовая кислота синтезируется в организме животных и человека из L-аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата по схеме:

аспаргиновая кислота + карбамоилфосфат → уреидоантарная кислота → дегидрооротовая кислота → оротовая кислота

В связи с наличием собственного синтеза оротовой кислоты она не является витамином для животных и человека, но служит фактором роста (незаменимым пищевым веществом) для ряда микроорганизмов, неспособных к ее синтезу.

Эндогенный синтез оротовой кислоты полностью покрывает физиологическую потребность организма в этом соединении. Однако в условиях, предъявляющих повышенные требования к интенсивности синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот, например, в период интенсивного роста, при репарационных и регенераторных процессах после операций, кровопотерь и т. п., дополнительное введение оротовой кислоты, экономя организму значительную биохимическую работу по ее синтезу и увеличивая в тканях пул этого предшественника пиримидиновых нуклеотидов, может оказывать существенное стимулирующее влияние на течение указанных процессов.



В связи с этим препараты оротовой кислоты могут включаться в комплексную терапию постгеморрагических анемий, у хирургических больных в послеоперационном периоде, при дистрофии миокарда, алиментарной и алиментарно-инфекционной дистрофии у детей, повышенных физических нагрузках и других показаниях для стимуляции анаболических процессов. Имеются данные о благоприятном влиянии оротовой кислоты на рост и развитие недоношенных детей.

Оротовая кислота мало токсична (АД50 для лабораторных животных 2500 мг/кг). Однако добавление 1 % оротовой кислоты к рациону вызывает жировую дистрофию печени, обусловленную нарушением баланса между пиримидиновыми и пурпновыми нуклеотидами. Добавление к рациону аденина (пуриновое основание) предотвращает эти нарушения, в связи с чем препараты оротовой кислоты лучше использовать в комплексе с пурпновыми основаниями, в частности с аденином.

Оротовую кислоту определяют микробиологически с *Lactobacillus bulgarius* или спектрофотометрически после предварительного выделения методами хроматографии. Предложен чувствительный ферментативный метод определения оротовой кислоты с помощью оротидилат-пирофосфорилазы и оротидилат-декарбоксилазы из пекарских дрожжей. В норме оротовая кислота в сыворотке и моче здоровых людей почти не обнаруживается. Значительные количества оротовой кислоты в моче появляются после приема ее препаратов или азауридина, нарушающего синтез пиримидиновых оснований, а также при оротата-нидурин, обусловленной врожденным дефектом использования оротовой кислоты для биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов

### **3.6. Карнитин**

В химическом отношении карнитин представляет собой внутреннюю соль  $\gamma$ -триметиламино- $\beta$ -оксимасляной кислоты  $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}(\text{H})\text{COO}$ . Рацемический D,L-карнитин представляет собой кристаллическое вещество с температурой плавления 197-212 °С (с разложением), очень гигроскопичное, хорошо растворимое в воде и спирте. Оптически активный стерсоизомер L-карнитин вращает плоскость поляризованного света влево.  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} - 23.5^\circ$ . С HCl D,L-карнитин образует гидрохлорид D,L-карнатина с точкой плавления 116 °С (с разло-

жением). Гидрохлорид - L карнитина плавится при 137-139 °С. вращает плоскость поляризованного света вправо,  $[\alpha]_D^{22} + 20,4^\circ$ .

L-карнитин присутствует в животных тканях, растениях и микроорганизмах (дрожжах). Особенно высоко его содержание в мышцах (20-50 мг/100 г).

Карнитин осуществляет важную биохимическую функцию в обмене (окислении) жирных кислот, принимая участие в транспорте последних из цитоплазмы клеток в митохондрии. На первом этапе этого процесса происходит перенос остатка жирной кислоты от цитоплазматического ацил-кофермента А на карнитин, катализируемый ацил-КоА-карнитин-D-ацилтрансферазой. Образующийся эфир жирной кислоты и карнитина легко проходит через митохондриальную мембрану и поступает внутрь митохондрий, где остаток жирной кислоты вновь переносится от карнитина на внутримитохондриальный кофермент А и подвергается последовательному окислительному расщеплению.

Животные и человек способны к собственному синтезу карнитина. в связи с чем он не является для них незаменимым пищевым веществом. В то же время ряд насекомых, например мучной червь *Tenebrio molitor*, неспособны к синтезу карнитина и должны получать его с пищей. Для них это соединение является витамином.

Поскольку карнитин способствует процессу энергообразования за счет окисления жирных кислот, он находит применение при тяжелых физических или спортивных нагрузках. В качестве лекарственного препарата используют карнитина хлорид, назначаемый в качестве анаболического средства при отсутствии аппетита, гипотрофии, задержке роста у детей, а также в комплексной терапии заболеваний у взрослых, при которых показано применение нестероидных анаболических средств.

### **3.7. Витамин U (S-метилметионин, метилметионинсульфоний)**

Витамин U в химическом отношении представляет собой соль (обычно хлорид) 3-амино-3-карбоксивопилдиметилсульфония  $[\text{HOOCCH}(\text{N}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}+(\text{CH}_3)_2]\text{Cl}^-$  и является производным аминокислоты метионина, содержащим дополнительную метильную группу, присоединенную к атому серы. Наряду с хлоридом, известны бромид, йодид, сульфат и другие соли метилметионинсульфония. Хлорид метилметионинсульфония имеет вид белого кристаллического вещества, сладко-солончатого вкуса, с запахом капусты. Он хорошо растворим в

воде, водном спирте, нерастворим в абсолютном спирте и эфире, гигроскопичен, при нагревании и длительном (до года) хранении разлагается, неустойчив на свету.

Метилметионинсульфоний является физиологически активным веществом пищи, обладающим лечебным противоязвенным действием, основным (фактором, ответственным за лечебный эффект капустного сока при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

Метилметионинсульфоний в больших количествах содержится в капусте (50-85 мг/100 г), спарже (100-160 мг/100 г), зелени петрушки, репе, перце, моркови, томате, луке.

В организме человека и животных метилметионинсульфоний активно включается в обмен веществ в качестве донора метильных групп в реакциях метилирования. Важнейшей реакцией этого типа является участие метилметионинсульфония в биосинтезе метионина из гомоцистеина. При этом образуются сразу две молекулы метионина: одна из подвергающегося метилированию гомоцистеина, а другая - из отдающего одну из метильных групп метилметионинсульфония.

Тем не менее незаменимость этого соединения для человека и животных не доказана, поэтому оно не может быть отнесено к витаминам или иным незаменимым пищевым веществам, а рассматривается как физиологически активное пищевое вещество.

Метилметионинсульфоний хлорид может применяться в комплексной терапии больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, а также хроническим гастритом. Прием этого препарата способствует снижению гипер-секреции и нормализации кислотовыделительной функции желудка, исчезновению болей и диспептических явлений, заживлению язвы, улучшению моторной функции толстого и тонкого кишечника, желчного пузыря.

Механизм терапевтического действия метилметионинсульфония полностью не выяснен. Возможно, что, участвуя в реакциях метилирования, метилметионинсульфоний способствует интенсификации обмена веществ в слизистой оболочке желудка и кишечника, стимулирует репаративные процессы, ведущие к рубцеванию и заживлению язвы. Метилируя гистамин, метилметионинсульфоний превращает его в неактивную форму, что способствует уменьшению желудочной секреции и болей. Метилметионинсульфоний может быть определен количественно микробиологическим методом с *Lactobacillus arabinus* или колориметрически, по реакции с 1,2-нафтохиносальфонатом калия.

### 3.8. Пангамовая кислота (витамин В<sub>15</sub>)

В 1951-1955 гг. из ряда растительных и животных объектов было выделено биологически активное соединение, получившее название пангамовая кислота, или витамин В<sub>15</sub>. В дальнейшем этому соединению была приписана структура диметилгллицинового эфира глюконовой кислоты. Природные и спитетическне препараты пангамовой кислоты, и частости пангамат кальция, обнаружили в экспериментальных и клинических исследованиях многообразные эффекты: способность повышать устойчивость животных к недостатку кислорода, выносливость к физическим нагрузкам, детоксицирующие свойства при отравлениях этанолом и синильной кислотой, липотропное действие при жировой инфильтрации печени, вызванной дефицитом белка и т. п. В связи с этим пангамовая кислота нашла терапевтическое применение при сердечно-сосудистых заболеваниях, атеросклерозе, заболеваниях пенсии (циррозы, гепатиты), хроническом алкоголизме, в том числе при абстинентном синдроме. Препараты пангамовой кислоты назначались также спортсменам для повышения эффективности тренировки и достижения более высоких спортивных результатов. Некоторые из этих эффектов связывают с наличием в молекуле пангамовой кислоты двух метильных групп при атоме азота, которые, как предполагалось, могут использоваться в процессах биологического метилирования.

Однако до настоящего времени данных о выполнении пангамовой кислотой какой-либо специфической функции в организме не получено. Нет доказательств, что отсутствие пангамовой кислоты может вести к каким-либо нарушениям в организме, отсутствуют сведения о потребности в ней человека и животных. Таким образом, пангамовая кислота не является витамином или иным незаменимым пищевым веществом, а скорее, относится к биологически (фармакологически) активным соединениям.

Имеются также серьезные сомнения относительно правильности приписанной пангамовой кислоте химической структуры. Исследования, выполненные в 1965-1967 гг. А. М. Юркевичем с сотрудниками, показали, что диметилловый эфир глюконовой кислоты является крайне неустойчивым соединением, быстро подвергающимся гидролизу даже в нейтральной среде. Эти данные даюг основание считать, что структура диметилгллицинового эфира глюконовой кислоты была приписана природной пангамовой кислоте неточно. То же относится и к

синтетическим препаратам пангамовой кислоты, в частности пангамату кальция.

По мнению А. М. Юркевича с сотрудниками, последний препарат в действительности является не кальциевой солью диметилглицинового эфира, которая в этих условиях не может быть получена из-за его нестойкости, а смесью диметилглицина и саркозина.

Не исключено, что многочисленные эффекты, приписываемые пангамовой кислоте, обусловлены действием смеси исходных соединений, используемых при ее синтезе, в частности диметилглицина, и получаемых продуктов неуставленной структуры.

### **3.9. Парааминобензойная кислота**

Парааминобензойная кислота представляет собой белое или желтоватое кристаллическое вещество с температурой плавления 186-187 °С, плохо растворимое в воде (0,34 % при 12,8 °С), лучше растворимое в 90%-ном спирте и эфире.

Парааминобензойная кислота широко распространена в природе: в животных тканях, растениях, микроорганизмах, пищевых продуктах. В значительных количествах она обнаружена в печени (2,5 мкг/г), почках (1,8 мкг/г), в крови (270 мкг/100 мл). С мочой у человека парааминобензойная кислота выводится главным образом в ацетилированном состоянии (0,8-3,3 мг/сут.) и в небольших количествах (60-280 мкг/сут.) в свободной форме.

Биологическое значение парааминобензойной кислоты состоит в том, что она входит в состав фолиевой кислоты и ее производных. Парааминобензойная кислота является фактором роста (витамином) для ряда микроорганизмов, в том числе патогенных, которые синтезируют из нее фолиевую кислоту.

Животные и человек не способны использовать парааминобензойную кислоту для синтеза фолиевой кислоты и должны получать последнюю в готовом виде с пищей. В связи с этим парааминобензойная кислота не является для животных и человека витамином. Тем не менее наличие определенного количества парааминобензойной кислоты в их пище, по-видимому, является необходимым условием нормального функционирования кишечной микрофлоры.

Наряду с этим, парааминобензойная кислота, по-видимому, способна оказывать на организм животных и человека ряд

физиологических и терапевтических эффектов. В частности, показано ее антигистаминное действие, стимулирующее влияние на центральную нервную систему, возможное влияние на пигментацию волос, фотозащитный эффект в дерматологии.

Этиловый эфир параамнобензойной кислоты — анестезин и диэтиламино- этиловый эфир — новокаин нашли, как известно, исключительно широкое применение в качестве местных анестетиков.

Антагонистами параамнобензойной кислоты являются сульфаниламидные препараты, антимикробное действие которых основано на их способности конкурентно нарушать использование параамнобензойной кислоты для синтеза фолиевой кислоты микроорганизмами.

### Лабораторная работа № 3.1

#### Определение катехинов (витамина Р) в препаратах из чайного листа

**Цель работы:** методом перманганатометрического титрования определить содержание витамина Р в настое или экстракте чая.

**Оборудование и химическая посуда:** весы аналитические; химические стаканы объёмом 25,0-50,0 см<sup>3</sup>; плитка электрическая; воронки; фильтровальная бумага; пипетка объёмом 10,00 см<sup>3</sup>; колбы конические для титрования; цилиндр мерный объёмом 25 см<sup>3</sup>; микробюретка объёмом 2-5 см<sup>3</sup>.

**Реактивы и материалы:** чай или готовый экстракт; индигокармин; раствор перманганата калия (KMnO<sub>4</sub>), 0,01 моль/дм<sup>3</sup>.

**Приготовление раствора индигокармина.** 1 г индигокармина растирают в фарфоровой ступке, растворяют в 50 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты мерной колбе емкостью 1000 см<sup>3</sup> и доводят водой до метки. Хранят раствор в темной посуде.

#### Методика выполнения работы

В данной работе определение витамина Р основано на способности рутина окисляться перманганатом калия (метод Левенталя). Экспериментально установлено, что 1 см<sup>3</sup> 0,02 моль/дм<sup>3</sup> раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Индикатором конца реакции служит раствор индигокармина, который вступает в реакцию с  $\text{KMnO}_4$  после того как окислится весь рутин.

### **1. Подготовка пробы к анализу.**

Точную навеску чая в количестве 0,1 г залить 50 см<sup>3</sup> горячей дистиллированной воды и кипятить в течении 5 минут. Полученный экстракт охладить.

### **2. Проведение измерения.**

10 мл полученного экстракта поместить в колбу для титрования, добавить 10 см<sup>3</sup> воды, 5 капель индигокармина, тщательно перемешать и оттитровать при постоянном перемешивании раствором перманганата калия 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до изменения синего окрашивания на устойчивое жёлтое.

Повторить титрование три раза.

Отдельно провести контрольное титрование одной дистиллированной воды без экстракта.

### **3. Обработка результатов.**

Усреднить результаты трех параллельных опытов.

Содержание витамина Р (мкг/100 г) рассчитать по формуле:

$$X = \frac{(V - V_k) \cdot 3,2 \cdot V_1}{V_2 \cdot m},$$

где  $X$  - содержание витамина Р в чае, мкг/100 г;  $V$  - средний объём раствора  $\text{KMnO}_4$ , который пошёл на титрование, см<sup>3</sup>;  $V_k$  - средний объём раствора  $\text{KMnO}_4$ , который пошёл на титрование контрольной пробы, см<sup>3</sup>; 3,2 - титр раствора;  $m$  - навеска чая в граммах;  $V_1$  - общий объём экстракта;  $V_2$  - аликвота экстракта, взятая для титрования.

## **Контрольные вопросы к разделу 3**

1. В чем отличие витаминоподобных соединений от витаминов?
2. На какие группы делятся витаминоподобные соединения?

3. Какие вещества относятся к витамину Р? В чем их общие свойства?
4. Какое свойство лежит в основе определения витамина Р в чае?
5. Какие витаминоподобные соединения синтезируются в человеческом организме?



## Список используемой литературы

1. Євлаш В.В., Торяник О.І., Коваленко В.О., Аксьонова О.Ф., Отрошко Н.О., Кузнецова Т.О. та ін. Харчова хімія // Навч. посібник. - Х.: Світ книг, 2012. - 504 с.
2. Труфанов А.В. Биохимия витаминов и антивитаминов. - М.: Колос, 1972. – 328 с.
3. Иваненко Е.Ф. Биохимия витаминов. - К.: Вища школа, 1970. – 210 с.
4. Березовский В.М. Химия витаминов. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с. Яковлев В.А. Витамины и витаминные препараты. - М.: Медицина, 1973. – 296 с.
5. Матусис И.И. Витамины и антивитамины. - М.: Сов. Россия, 1975. – 237 с.
6. Колотилова А.И., Глушаков Е.П. Витамины. Химия, биохимия и физиологическая роль – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1976. – 248 с.
7. Методическое руководство по определению витаминов А, D, E, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР, С, Р и каротина в витаминных препаратах и пищевых продуктах. - М.: Медгиз, 1960. - 175 с.
8. Витамины. Под. ред. Смирнова В.Г. -М.: Медицина, 1974. - 496 с.
9. ДСТУ 2117-93 Продукти переробки овочів і фруктів. Метод визначення вітаміну РР.
10. ДСТУ 4305:2004 Фрукти, овочі и продукты їх переробки. Метод визначення каротину.
11. ДСТУ ISO 6558-2:2004 Фрукти, овочі и продукты їх переробки. Визначення вмісту каротину. Частина 2. Загальноприйняті методи (ISO 6558-2:1992, IDT).
12. ДСТУ ISO 12080-1:2007 Молоко сухе знежирене. Визначення вмісту вітаміну А. Частина 1. Колориметричний метод (ISO 12080-1:2000, IDT).
13. ДСТУ ISO 12080-2:2009 Молоко сухе знежирене. Визначення вмісту вітаміну А. Частина 2. Метод із застосуванням рідинної хроматографії високої роздільної здатності.
14. ДСТУ 4940:2008 Продукти переробки овочів і фруктів. Метод визначення вітаміну А.
15. ДСТУ 4112.23-2003 Вина і виноматеріали. Методи визначення L-аскорбінової кислоти.

16.ДСТУ 4931:2008 Напої лікєро-горілчані. Визначення масової концентрації кофеїну та сорбінової, аскорбінової, бензойної кислот методом капілярного електрофорезу.

17.ДСТУ ISO 14892/IDF 177:2009 Молоко сухе сепароване. Визначення вмісту вітаміну D із застосуванням рідинної хроматографії високої роздільної здатності.

18.ГОСТ 25999-83 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витаминов В1 и В2.

19.ГОСТ 24556-89 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С.

20.ГОСТ 29138-91 Мука, хлеб и хлебобулочные изделия пшеничные витаминизированные. Метод определения витамина В1 (тиамина).

21.ГОСТ 29139-91 Мука, хлеб и хлебобулочные изделия пшеничные витаминизированные. Метод определения витамина В2 (рибофлавина).

22.ГОСТ 29140-91 Мука, хлеб и хлебобулочные изделия пшеничные витаминизированные. Метод определения витамина РР (никотиновой кислоты).

23.ГОСТ Р 50479-93 Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения содержания витамина РР.

24.ГОСТ 26573.1-93 Премиксы. Методы определения витамина А.

25.ГОСТ 30417-96 Масла растительные. Методы определения массовых долей витаминов А и Е.

26.ГОСТ Р 50928-96 Премиксы. Методы определения витаминов А, D, Е.

27.ГОСТ Р 50929-96 Премиксы. Методы определения витаминов группы В.

28.ГОСТ 30624-98 Масла растительные. Метод обнаружения фальсификации концентратом витамина D.

29.ГОСТ 30627.1-98 Продукты молочные для детского питания. Метод измерения массовой доли витамина А (ретинола).

30.ГОСТ 30627.2-98 Продукты молочные для детского питания. Методы измерений массовой доли витамина С (аскорбиновой кислоты).

31.ГОСТ 30627.3-98 Продукты молочные для детского питания. Метод измерения массовой доли витамина Е (токоферола).

32.ГОСТ 30627.4-98 Продукты молочные для детского питания. Метод измерения массовой доли витамина РР (ниацина).

33.ГОСТ 30627.5-98 Продукты молочные для детского питания. Метод измерения массовой доли витамина В1 (тиамина).

34.ГОСТ 30627.6-98 Продукты молочные для детского питания. Методы измерений массовой доли витамина В2 (рибофлавина)

35.ГОСТ Р 51181-98 Концентраты пищевые детского и диетического питания. Методика выполнения измерений массовой доли каротиноидов.

36.ГОСТ Р 51443-99 Соки фруктовые и овощные. Метод определения содержания общих каротиноидов и их фракционного состава.

37.ГОСТ Р 52147-2003 Белково-витаминно-минеральные и амидо-витаминно-минеральные добавки. Методы определения содержания ретинола-ацетата (витамина А), эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина Е).

38.ГОСТ Р 52690-2006 Продукты пищевые. Вольтамперометрический метод определения массовой концентрации витамина С.

39.ГОСТ Р 52741-2007 Премиксы. Определение содержания витаминов: В1 (тиаминхлорида), В2 (рибофлавина), В3 (пантотеновой кислоты), В5 (никотиновой кислоты и никотиамида), В6 (пиридоксина), Вс (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза.

40.ГОСТ Р ЕН 14130-2010 Продукты пищевые. Определение витамина С с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

41.ГОСТ Р 54058-2010 Продукты пищевые функциональные. Метод определения каротиноидов.

### **Список рекомендованной литературы**

1. Євлаш В.В., Торяник О.І., Коваленко В.О., Аксьонова О.Ф., Отрошко Н.О., Кузнецова Т.О. та ін. Харчова хімія // Навч. посібник. - Х.: Світ книг, 2012. - 504 с.

2. Березовский В.М. Химия витаминов. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с.

3. Колотилова А.И., Глушаков Е.П. Витамины. Химия, биохимия и физиологическая роль – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1976. – 248 с.

4. Методическое руководство по определению витаминов А, D, Е, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР, С, Р и каротина в витаминных препаратах и пищевых продуктах. - М.: Медгиз, 1960. - 175 с.

Учебное издание

# **ХИМИЯ ВИТАМИНОВ**

Учебное пособие

ЕВЛАШ Виктория Владленовна  
ОТРОШКО Наталия Александровна  
КУЗНЕЦОВА Татьяна Олеговна

Печатается в авторской редакции

---

Подп. к печати	г.	Формат	60x84	1/16.	Бумага	офсет.
Услов. печат. лист.	Тираж	экз.	Зак. №			

---

Издатель и изготовитель  
Харьковский государственный университет питания и торговли  
ул. Клочковская, 333, Харьков, 61051.  
Свидетельство субъекта издательского дела ДК № 4417 от 10.10.2012 г.