



Учреждение образования
«Международный государственный
экологический институт
имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

Е. А. Докучаева, В. Э. Сяхович,
Н. В. Богданова

**ОБЩАЯ БИОХИМИЯ:
ВИТАМИНЫ**



Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

Е. А. Докучаева, В. Э. Сяхович,
Н. В. Богданова

ОБЩАЯ БИОХИМИЯ: ВИТАМИНЫ

Практикум

Минск
«ИВЦ Минфина»
2017

УДК 577.16 (076)
ББК 28.072я73
Д 63

Авторы:

старший преподаватель кафедры биохимии и биофизики *Е. А. Докучаева*,
старший преподаватель кафедры биохимии и биофизики *В. Э. Сяхович*,
преподаватель кафедры биохимии и биофизики *Н. В. Богданова*

Под редакцией кандидата биологических наук, доцента,
заведующего кафедрой биохимии и биофизики
МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ *С. Б. Бокутя*

Рецензенты:

заведующая лабораторией «Коллекция микроорганизмов»
Государственного научного учреждения «Институт микробиологии
Национальной академии наук Беларуси», канд. биол. наук *Г. И. Новик*,
Кафедра клинической лабораторной диагностики
Государственного учреждения высшего образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Докучаева, Е. А.

Д 63 **Общая биохимия: Витамины: практикум / Е. А. Докучаева, В. Э. Сяхович, Н. В. Богданова; под ред. С. Б. Бокутя. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 52 с.**

ISBN 978-985-7142-97-2.

В практикуме помещен теоретический материал по курсу «Витамины», контрольные вопросы для подготовки к занятию, а также перечень заданий и список рекомендуемой литературы. Включены темы, в которых отражена классификация, биохимическая функция и методы качественных реакций обнаружения витаминов.

Предназначается студентам, обучающимся по специальности 1–80 02 01 «Медико-биологическое дело», преподавателям и всем интересующимся данным вопросом биохимии.

УДК 577.16 (076)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-7142-97-2

© Докучаева Е. А., Сяхович В. Э., Богданова Н. В., 2017
© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2017

Содержание

Витамины	5
Химическое строение и биохимические свойства жирорастворимых витаминов.....	7
Химическое строение и биологическая роль водорастворимых витаминов.....	16
Химические свойства водорастворимых витаминов и их анализ.....	31
Химические свойства жирорастворимых витаминов и их анализ.....	37
Приложение 1.....	47

Лабораторная работа.

Качественные реакции на жирорастворимые и водорастворимые витамины

Цель работы: изучить биологическое действие отдельных витаминов и методы их исследования витаминов в биологическом материале.

Оборудование и материалы:

- Термостат.
- Водяная баня.
- Пипетки стеклянные на 1 мл и 5 мл.
- Микропипетки автоматические.
- Цилиндры мерные на 250 мл и 100 мл.
- Пробирки стеклянные.
- Штативы для пробирок.
- Стеклянные палочки.
- Предметные стекла.
- Часовые стекла.

Реактивы:

- концентрированные кислоты – H_2SO_4 , HNO_3 , HCl ;
- NaOH , 10 % раствор;
- Zn металлический;
- FeCl_3 , 5 % и 1 % растворы;
- NaHCO_3 , 10 % раствор;
- NaNO_2 , 5 % раствор;
- сульфаниловая кислота, 1 % раствор;
- хлороформ;
- сахароза кристаллическая;
- $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 10 % раствор;
- HCl , 10 % раствор;
- $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$, 5 % раствор;
- бром в хлороформе;
- цистеин, 0,025 % спиртовой раствор;
- анилиновый реактив, раствор анилина (фениламина);
- раствор Люголя;
- растворы витаминов.

Витамины

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

Витамины, участвующие в биохимических процессах, являются либо предшественниками коферментов (витамин В₁), либо представляют собой собственно коферменты (липоамид). Некоторые витамины обеспечивают протекание ряда физиологических процессов: витамин А₂ участвует в процессе зрительного восприятия; витамин А₃ – в процессе дифференцировки клеток; витамин D – в процессе формирования костной ткани; витамин Е выполняет функцию антиоксиданта.

Наряду с витаминами, в пище содержатся биологически активные вещества, которые по своим функциям ближе не к витаминам, а к другим незаменимым пищевым веществам. Эти вещества называют *витаминоподобными*. К ним обычно относят биофлавоноиды, холин, инозитол, оротовую, пангамовую и пара-аминобензойную кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты и др.

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

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

кислоты; аминоптерин и метотрексат (противоопухолевые препараты) служат антагонистами фолиевой кислоты. К *антивитаминам* относятся также вещества, связывающие или разрушающие витамины, например ферменты тиаминаза I и II, инактивирующие тиамин; белок яйца авидин, отличается способностью связывать биотин.

Ряд витаминов представлен не одним, а несколькими соединениями, обладающими сходной биологической активностью (*витамеры*), например, витамин В₆ существует в нескольких формах – в виде пиридоксина, пиридоксаля и пиридоксамина.

Для индивидуальных соединений, обладающих витаминной активностью, рекомендуется использовать рациональные названия, отражающие их химическую природу, например рибофлавин (витамин В₂), никотинамид и никотиновая кислота (витамин РР), ретинол (витамин А₁).

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

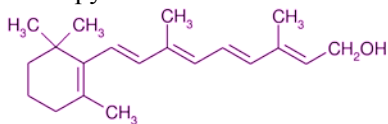
Основной специфической функцией водорастворимых витаминов в организме является их участие в качестве коферментов многих энзимов, катализирующих разнообразные реакции. Из жирорастворимых витаминов лишь витамины К и А₂ осуществляют коферментную функцию, а остальные участвуют в неферментативных физиологических процессах.

Знание функций витаминов позволяет понять причину возникновения различных патологических состояний, связанных с нарушением метаболизма веществ. Общей закономерностью является то, что дефицит того или иного витамина приводит к снижению активности соответствующего фермента и, следовательно, к торможению катализируемой этим ферментом реакции. Поскольку организм является сбалансированной саморегулирующейся системой, изменение метаболизма какого-либо вещества влечет за собой изменение обмена и других соединений. Наблюдаемые изменения в организме в целом проявляются не сразу, поскольку организм на начальном этапе дефицита какого-либо витамина компенсирует возникшее отклонение, изменяя метаболизм других веществ так, чтобы снизить отрицательное влияние дефицита витамина (состояние гиповитаминоза). Если дефицит витамина устранен, организм возвращается в нормальное состояние. В том случае, если дефицит витамина оказывается существенным и отличается длительным промежутком времени, возникает авитаминоз, который при истощении компенсаторных ресурсов организма может иметь летальные последствия.

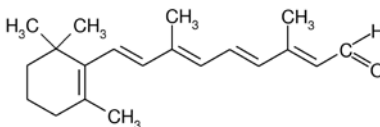
1. Химическое строение и биохимические свойства жирорастворимых витаминов

1.1. Витамин А (ретинол) (антиксерофтальмический)

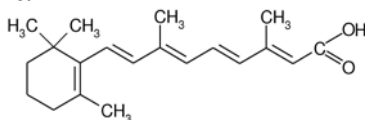
Жирорастворимый витамин А представляет собой циклический непредельный одноатомный спирт, состоящий из ретинолового кольца и боковой цепи построенной из 2-х остатков изопрена и первичной спиртовой группы:



Ретинол



Ретиналь

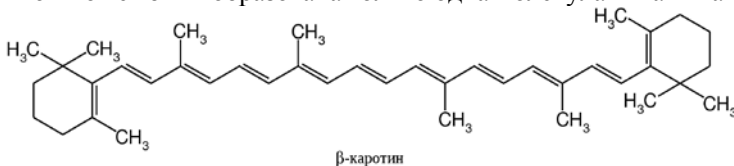


Ретиновая кислота

Спиртовая форма витамина А – ретинол, который в организме окисляется до ретиналя и ретиновой кислоты.

Биохимическая функция

Витамин А может образовываться в слизистой кишечника и печени из провитаминов – α -, β - и γ -каротинов под действием каротиноксигеназы. Наибольшей активностью обладает β -каротин, который служит предшественником двух молекул ретинола, в то время как из других провитаминов может быть образована только одна молекула витамина А.



β -каротин

В организме ретинол превращается в ретиналь и ретиновую кислоту, участвующие в регуляции ряда функций:

- 1) ретинол является структурным компонентом клеточных мембран;

2) регулирует рост и дифференцировку клеток эмбриона и молодого организма, а также деление и дифференцировку быстро пролиферирующих тканей, в первую очередь, эпителиальных – хряща и костной ткани. Он контролирует синтез белков цитоскелета, реакции распада и синтеза гликопротеинов. Синтез последних осуществляется в аппарате Гольджи. Недостаток витамина А приводит к нарушению синтеза гликопротеинов (точнее, реакций гликозилирования, то есть присоединения углеводного компонента к белку), что проявляется в потере защитных свойств слизистых оболочек;

3) является важнейшим компонентом антиоксидантной защиты организма;

4) витамин А и ретиноиды стимулируют реакции клеточного иммунитета, в частности, увеличивают активность Т-киллеров;

5) витамин А является антиканцерогеном, так как при его недостатке в организме увеличивается риск развития рака легкого и рака других локализаций;

6) участвует в фотохимическом акте зрения.

Участие витамина А в процессе зрительного восприятия

Светочувствительный аппарат глаза – сетчатка. Падающий на сетчатку свет адсорбируется и трансформируется пигментами сетчатки в другую форму энергии. У человека сетчатка содержит 2 типа рецепторных клеток: палочки и колбочки. Первые реагируют на слабое (сумеречное) освещение, а колбочки – на хорошее освещение (дневное зрение). Палочки содержат зрительный пигмент родопсин, а колбочки – йодопсин. Оба пигмента – сложные белки, отличающиеся своей белковой частью. В качестве кофермента оба белка содержат 11-*цис*-ретиноаль, альдегидное производное витамина А (рис. 1).

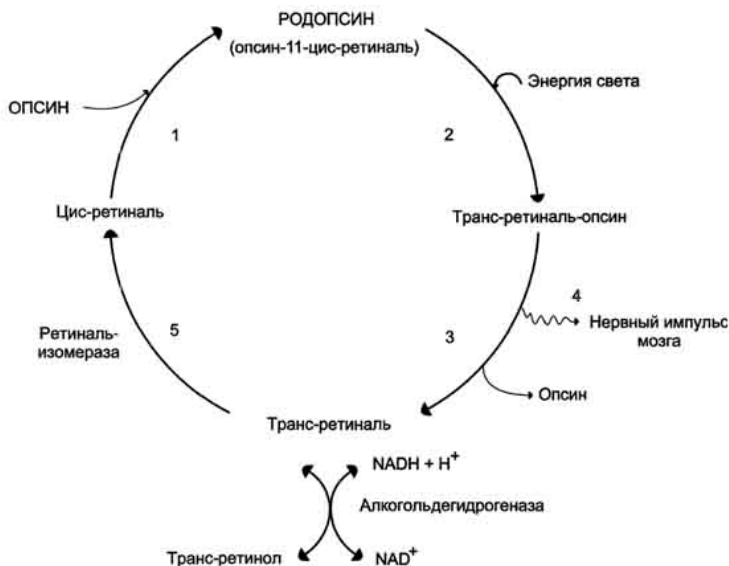
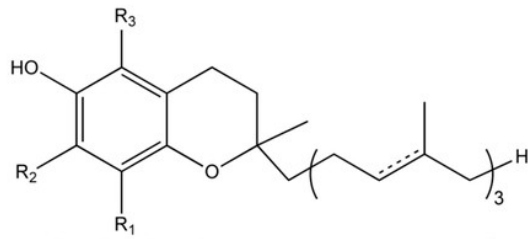
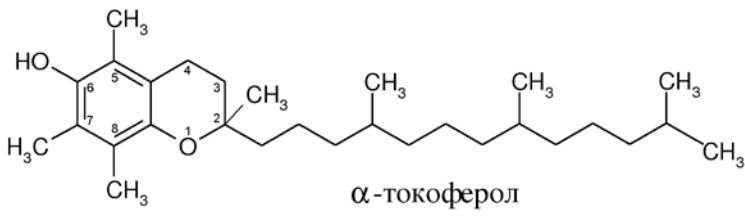


Рис. 1. Схема зрительного цикла: 1 – *цис*-ретиналь в темноте соединяется с белком опсином, образуя родопсин; 2 – под действием кванта света происходит фотоизомеризация 11-*цис*-ретинала в *транс*-ретиналь; 3 – *транс*-ретиналь-опсин распадается на *транс*-ретиналь и опсин; 4 – поскольку пигменты встроены в мембраны светочувствительных клеток сетчатки, это приводит к местной деполяризации мембраны и возникновению нервного импульса, распространяющегося по нервному волокну; 5 – заключительный этап этого процесса – регенерация исходного пигмента, происходит при участии ретиналь-изомеразы

1.2. Витамин Е (токоферол) (антистерильный)

По химической природе витамин Е представляет собой группу родственных соединений – токоферолов, молекулы которых состоят из двух компонентов: хроманолового кольца, являющегося производным бензохинона, и изопреноидной боковой цепи. Кроме токоферолов к группе витамина Е относятся α -, β -, γ - и δ -токотриенолы – аналоги соответствующих токоферолов, которые отличаются от последних наличием двойных связей в боковой цепи. Наибольшую биологическую активность проявляет α -токоферол (др.-греч. τόκος – «деторождение», и φέρειν – «принести»).



α-токоферол,	R ₁ = R ₂ = R ₃ = CH ₃	γ-токоферол,	R ₁ = R ₂ = CH ₃ R ₃ = H
α-токотриенол,	R ₁ = R ₂ = R ₃ = CH ₃	γ-токотриенол,	R ₁ = R ₂ = CH ₃ R ₃ = H
β-токоферол,	R ₁ = R ₃ = CH ₃ ; R ₂ = H	δ-токоферол,	R ₁ = R ₂ = R ₃ = H
β-токотриенол,	R ₁ = R ₃ = CH ₃ ; R ₂ = H	δ-токотриенол,	R ₁ = R ₂ = R ₃ = H

Источником токоферолов являются исключительно растительные организмы.

Биохимическая функция

Витамин Е является универсальным протектором клеточных мембран от окислительного повреждения. Он занимает такое положение в мембране, которое препятствует контакту кислорода с ненасыщенными липидами мембран (образование гидрофобных комплексов). Это защищает биомембраны от их перекисной деструкции. Антиоксидантные свойства токоферола обусловлены также способностью подвижного гидроксила хроманового ядра его молекулы непосредственно взаимодействовать с активными формами кислорода (O₂^{•-}, HO[•], HO₂[•]), свободными радикалами ненасыщенных жирных кислот (RO[•], RO₂[•]) и перекисями жирных кислот.

Мембраностабилизирующее действие витамина проявляется и в его свойстве предохранять от окисления SH-группы мембранных белков. Его антиоксидантное действие заключается также в способности защищать от окисления двойные связи в молекулах каротина и витамина А. Витамин Е (совместно с аскорбатом) способствует включению селена в состав активного центра глутатионпероксидазы, тем самым он активизирует

ферментативную антиоксидантную защиту (глутатионпероксидаза обезвреживает гидропероксиды липидов).

Токоферол является не только антиоксидантом, но и актигипоксантом, что объясняется его способностью стабилизировать митохондриальную мембрану и экономить потребление кислорода клетками. Следует отметить, что из всех клеточных органелл митохондрии наиболее чувствительны к повреждению, так как в них содержится больше всего легко окисляющихся ненасыщенных липидов. Вследствие мембраностабилизирующего эффекта витамина Е в митохондриях увеличивается сопряженность окислительного фосфорилирования, образование АТФ и креатинфосфата. Важно также отметить, что витамин контролирует биосинтез убихинона – компонента дыхательной цепи и главного антиоксиданта митохондрий.

Токоферол контролирует синтез нуклеиновых кислот (на уровне транскрипции), а также гема, микросомных цитохромов и других гемсодержащих белков.

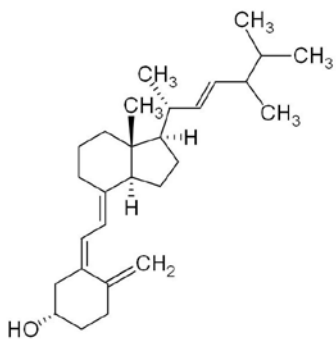
Витамин Е обладает способностью угнетать активность фосфолипазы А₂ лизосом, разрушающей фосфолипиды мембран. Повреждение мембран лизосом приводит к выходу в цитозоль протеолитических ферментов, которые и повреждают клетку.

Витамин Е является эффективным иммуномодулятором, способствующим укреплению иммунозащитных сил организма.

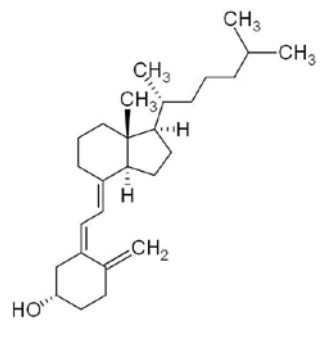
1.3. Витамин D (кальциферол)

(антирахитический)

Кальциферолы – группа химически родственных соединений, относящихся к производным стерина. Биологически наиболее активными являются витамины – D₂ и D₃. Витамин D₂ (эргокальциферол) представляет собой производное эргостерина – растительного стероида, встречающегося в некоторых грибах, дрожжах и растительных маслах (рис. 2).



Эргокальциферол



Холекальциферол

При ультрафиолетовом облучении пищевых продуктов из эргостерина образуется витамин D₂, используемый в лечебных целях. Витамин D₃ – холекальциферол образуется в коже человека из 7-дегидрохолестерина под действием УФ-лучей.

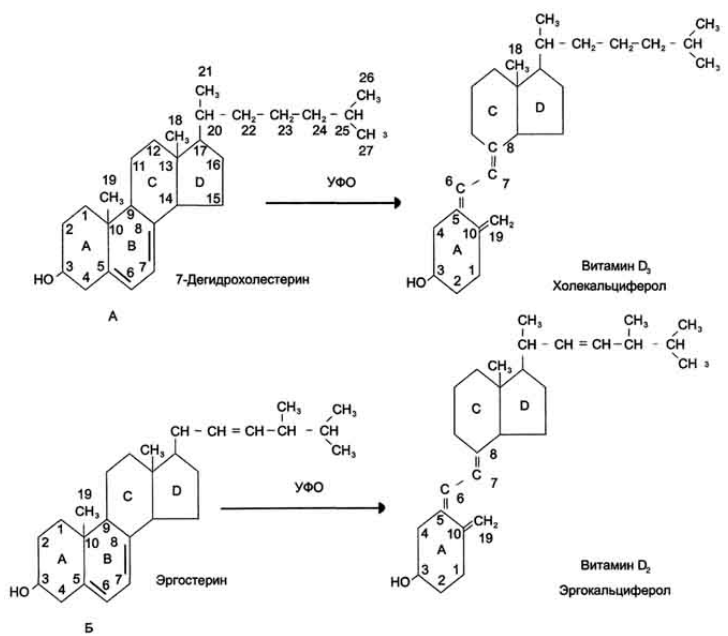
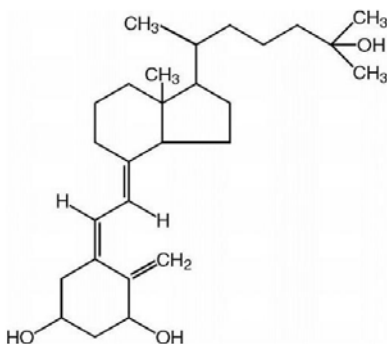


Рис. 2. Схема образования витаминов D₂ и D₃. Провитамины D₂ и D₃ представлены стерирами, у которых в кольце В присутствуют две двойные связи. При воздействии света в процессе фотохимической реакции происходит расщепление кольца В: А – 7-дегидрохолестерин, провитамин D₃, (синтезируется из холестерина); Б – эргостерин – провитамин D₂

Биохимическая функция

В организме человека витамин D₃ гидроксилируется в положениях 25 и 1 и превращается в биологически активное соединение 1,25-дигидроксиголекальциферол (кальцитриол).



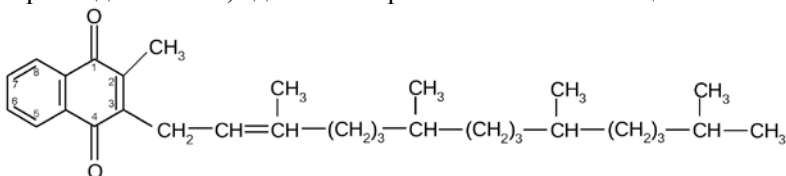
Кальцитриол

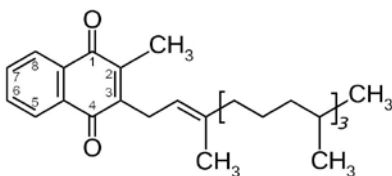
Кальцитриол выполняет гормональную функцию, участвуя в регуляции обмена Ca²⁺ и фосфатов, стимулируя всасывание Ca²⁺ в кишечнике и кальцификацию костной ткани, реабсорбцию Ca²⁺ и фосфатов в почках. При низкой концентрации Ca²⁺ или высокой концентрации D₃ он стимулирует мобилизацию Ca²⁺ из костей.

Кальцитриол принимает участие в регуляции роста и дифференцировке клеток костного мозга, обладает антиоксидантным и антиканцерогенным действием.

1.4. Витамин К (нафтохиноны) (антигеморрагический)

Витамин К по химической природе представляет ряд производных 2-метил-1,4-нафтохинона, сходного строения и близкой функции в организме. Обычно они имеют метилированный нафтохиноновый фрагмент с переменной по числу звеньев алифатической боковой цепью в положении 3. Филлохинон (также называемый витамином К₁) содержит 4 изопреноидных звена, одно из которых является ненасыщенным.

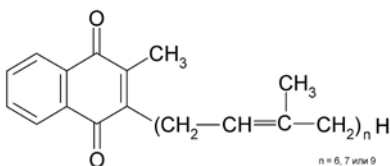




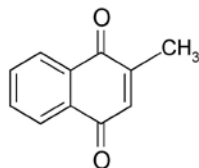
Филлохинон (витамин К₁)

В природе найдены только два витамина группы К: выделенный из люцерны витамин К₁ и выделенный из гниющей рыбной муки К₂. Кроме природных витаминов К, в настоящее время известен ряд производных нафтохинона, обладающих антигеморрагическим действием, которые получены синтетическим путем. К их числу относятся следующие соединения: витамин К₃ (2-метил-1,4-нафтохинон), витамин К₄ (2-метил-1,4-нафтогидрохинон), витамин К₅ (2-метил-4-амино-1-нафтогидрохинон), витамин К₆ (2-метил-1,4-диаминонафтохинон), витамин К₇ (3-метил-4-амино-1-нафтогидрохинон).

Витамин К существует в нескольких формах в растениях как *филлохинон* (К₁), в клетках кишечной флоры как *менахинон* (К₂). Они различаются строением и количеством изопреновых единиц в боковой цепи.



Менахинон (витамин К₂, n = 6, 7 или 9)



Менадион (витамин К₃)

Синтезированы аналоги витамина К – менадион (витамин К₃, лишенный боковой цепи) и его водорастворимый аналог викасол, последний широко применяется в медицинской практике.

В тканях образуется активная форма витамина – менахинон-4 (содержит четыре изопреноидные единицы).

Биохимическая функция

Витамин К является коферментом γ -глутаматкарбоксилазы, карбоксилирующей глутаминовую кислоту с образованием γ -карбоксиглутаминовой кислоты. γ -глутаматкарбоксилаза участвует в активации факторов свертывания крови: протромбина (фактор II), проконвертина

(фактор VII), фактора Кристмаса (фактор IX) и фактора Стюарта (фактор X). Указанные белковые факторы синтезируются как неактивные предшественники. Один из этапов их активации – карбоксилирование по остаткам глутаминовой кислоты с образованием γ -карбоксиглутаминовой кислоты, необходимой для последующего связывания ионов кальция (рис. 3).

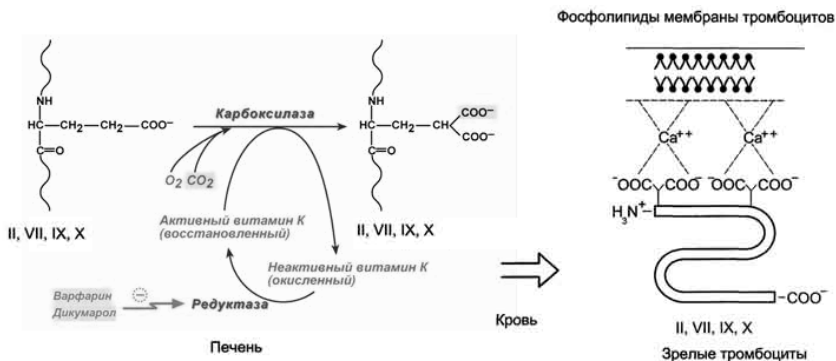
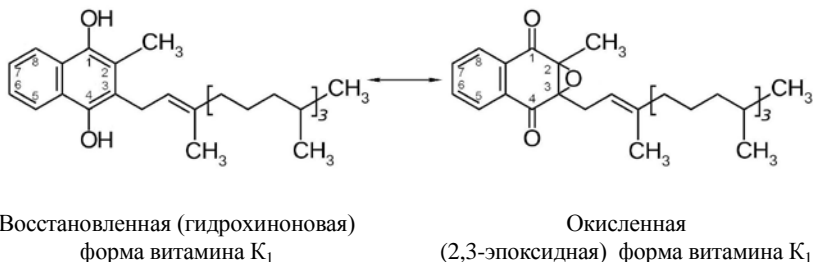


Рис. 3. Роль витамина К в процессе свертывания крови

При взаимодействии активной восстановленной формы витамина К с γ -глутаматкарбоксилазой в присутствии кислорода образуется сильное основание (алкоксид), способное отнять от γ -С атома глутаминовой кислоты водород, на место которого присоединяется CO_2 – при этом образуется γ -карбоксиглутаминовая кислота. В ходе реакции появляются короткоживущие и высоко токсичные промежуточные соединения (свободные радикалы витамина К), которые превращаются в нетоксичный 2,3-эпоксид витамина К в присутствии глутамата.

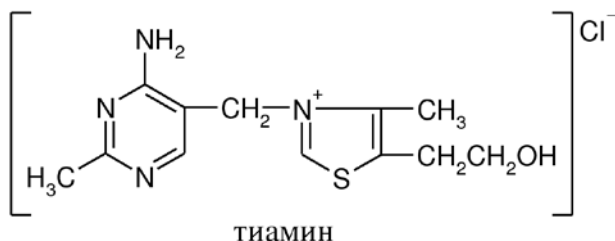


Обратная регенерация гидрохинона происходит с участием ферментов редуказ. Из сказанного следует, что при дефиците глутаминовой кислоты в клетке затрудняется обезвреживание токсичных свободных радикалов витамина К.

2. Химическое строение и биологическая роль водорастворимых витаминов

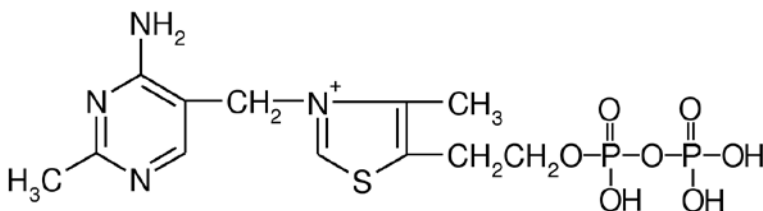
2.1. Витамин В₁ (тиамин) (антиневритный)

Тиамин по химической природе представляет собой производное тиазола и пириимидина, соединенных метиленовым мостиком:



Витамин В₁, присутствует в различных органах и тканях как в форме свободного тиаминина, так и его фосфорных эфиров: *тиаминмонофосфата* (ТМФ), *тиаминдифосфата* (ТДФ, синонимы: тиаминпирофосфат, ТПФ) и *тиаминтрифосфата* (ТТФ).

Основной коферментной формой (60–80 % от общего внутриклеточного) является *ТПФ*:



Тиаминпирофосфат (ТПФ)

Биохимическая функция

Участие ТПФ в реакции прямого декарбоксилирования пировиноградной кислоты (ПВК)

При декарбоксилировании ПВК с помощью пируватдекарбоксилазы образуется ацетальдегид, который под воздействием алкогольдегидрогеназы превращается в этанол. Незаменимым кофактором пируватдекарбоксилазы является ТПФ.

Участие ТПФ в реакциях окислительного декарбоксилирования

Окислительное декарбоксилирование пирувата катализирует пируват-дегидрогеназа. В состав пируватдегидрогеназного комплекса входит несколько структурно связанных ферментных белков и коферментов. ТПФ катализирует начальную реакцию декарбоксилирования ПВК. Окислительное декарбоксилирование ПВК является одной из ключевых реакций в обмене углеводов. В результате этой реакции ПВК, образовавшаяся при окислении глюкозы, включается в главный метаболический путь клетки – цикл Кребса, где окисляется до углекислоты и воды с выделением энергии. Таким образом, благодаря реакции окислительного декарбоксилирования ПВК создаются условия для полного окисления углеводов и утилизации всей заключенной в них энергии. Кроме того, образующаяся при действии ПДГ-комплекса активная форма уксусной кислоты служит источником для синтеза многих биологических продуктов: жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, ацетоновых тел и др.

Окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата катализирует α -кетоглутаратдегидрогеназа. Этот фермент является составной частью цикла Кребса. Строение и механизм действия α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса схожи с пируватдегидрогеназой, то есть ТПФ также катализирует начальный этап превращения кетокислоты. Таким образом, от степени обеспеченности клетки ТПФ зависит бесперебойная работа этого цикла. Кроме окислительных превращений пирувата и α -кетоглутарата, ТПФ принимает участие в окислительном декарбоксилировании кетокислот с разветвленным углеродным скелетом (продукты дезаминирования валина, изолейцина и лейцина). Эти реакции играют важную роль в процессе утилизации аминокислот и, следовательно, белков клеткой.

ТПФ – кофермент транскетолазы

Транскетолаза – фермент пентозофосфатного пути окисления углеводов. Физиологическая роль этого пути заключается в том, что он является основным поставщиком $\text{NADPH} \cdot \text{H}^+$ и рибозо-5-фосфата. Транскетолаза переносит двухуглеродные фрагменты от ксилулозо-5-фосфата к рибозо-5-фосфату, что приводит к образованию триозофосфата (3-фосфоглицеринового альдегида) и C_7 -сахара (седогептулозо-7-фосфата). ТПФ необходим для стабилизации карбаниона, образующегося при расщеплении связи C_2 - C_3 ксилулозо-5-фосфата.

Участие в синтезе ацетилхолина

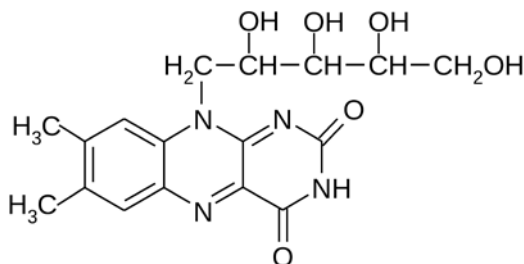
ТПФ катализирует в пируватдегидрогеназной реакции образование ацетил-КоА – субстрата ацетилирования холина. Помимо участия в ферментативных реакциях, тиамин может выполнять и не коферментные функции. Полагают, что тиамин участвует в кроветворении, на что указывает наличие врожденных тиаминзависимых анемий, поддающихся лечению высокими дозами этого витамина, а также в стероидогенезе.

2.2. Витамин В₂ (рибофлавин)

(витамин роста)

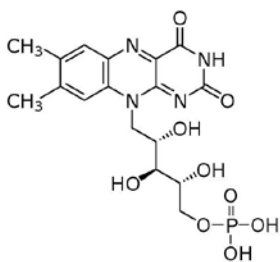
Молекула рибофлавина (витамина В₂) по химической природе представляет собой производное изоаллоксазина (7,8-диметил-10-(1'-D-рибитил)-изоаллоксазин), связанного с пятиатомным спиртом рибитолом. Витамин В₂ отличается от других витаминов желтым цветом (лат. flavus – желтый). В отличие от желтой окисленной формы рибофлавина, восстановленная форма витамина бесцветна.

Термином *флавины* обозначаются многие производные изоаллоксазина, обладающие В₂-витаминной активностью.

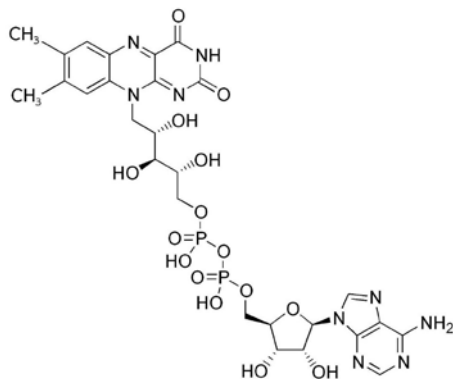


Рибофлавин (витамин В₂)

Биосинтез флавинов осуществляется растительными и многими бактериальными клетками, а также плесневыми грибами и дрожжами. Благодаря микробному биосинтезу рибофлавина в желудочно-кишечном тракте жвачные животные не нуждаются в этом витамине. У других животных и человека синтезирующихся в кишечнике флавинов недостаточно для предупреждения гиповитаминоза. В пище витамин В₂ находится преимущественно в виде своих коферментных форм – FMN (флаavinмоноклеотида) и FAD (флавинадениндуклеотида).



Флавинмононуклеотид (FMN)



Флавинаденидинуклеотид (FAD)

Биохимическая функция

Основная функция витамина В₂ состоит в том, что он является основной флавиновых коферментов – FMN и FAD, роль которых заключается в следующем:

- FMN и FAD служат коферментами оксидаз, переносящих электроны и H⁺ от окисляемого субстрата на молекулярный кислород. К ним относятся ферменты, участвующие в распаде аминокислот (оксидазы D- и L-аминокислот), нуклеотидов (ксантиноксидаза), биогенных аминов (моно- и диаминооксидазы) и др.;

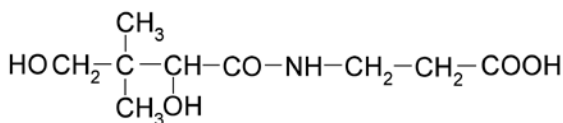
- FMN и FAD являются промежуточными переносчиками электронов и протонов в дыхательной цепи: FMN входит в состав I-го комплекса цепи тканевого дыхания, FAD – в состав II-го комплекса;

- Наряду с ТПФ и другими коферментами FAD осуществляет окислительное декарбоксилирование соответствующих кетокислот в составе пируват- и α-кетоглутаратдегидрогеназных комплексов, а также является единственным коферментом сукцинатдегидрогеназы (фермента цикла Кребса). Таким образом, рибофлавин принимает активное участие в функционировании главного метаболического пути клетки;

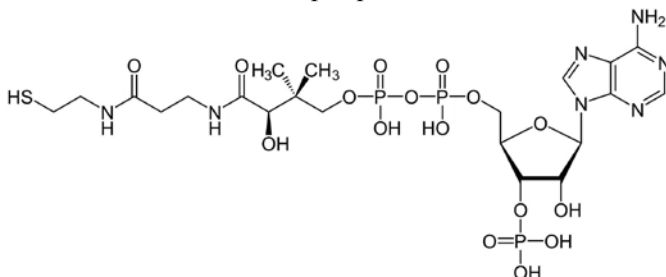
- FAD является коферментом ацил-КоА-дегидрогеназы, участвующей в реакции окисления жирных кислот в митохондриях.

2.3. Витамин В₃ (пантотеновая кислота)

Витамин В₃ широко распространен в природе, отсюда и его название – пантотеновая кислота (от *panthos* – повсюду). Пантотеновая кислота состоит из остатков D-2,4-дигидрокси-3,3-диметилмасляной кислоты и β-аланина, соединенных между собой амидной связью:



Коферментными формами витамина В₃, образующимися в цитоплазме клеток, являются *4'-фосфопантетеинат* и *CoA-SH*.



CoA-SH

В кишечнике человека пантотеновая кислота в небольших количествах продуцируется кишечной палочкой. Пантотеновая кислота представляет собой универсальный витамин, в котором или его производных нуждаются человек, животные, растения и микроорганизмы.

Биохимическая функция

Значение пантотеновой кислоты определяется исключительно важной ролью ее коферментных форм в ключевых реакциях метаболизма. Такие производные витамина как S-сульфопантетеин, способны поддерживать рост бифидобактерий – важного компонента биоценоза кишечника.

4'-фосфопантетеин является активной частью ацилпереносящего белка (АПБ) синтазы жирных кислот – представителя класса так называемых фосфопантетеинпротеинов.

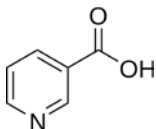
Ацетил-СоА является субстратом для синтеза жирных кислот, холестерина и стероидных гормонов, ацетоновых тел, ацетилхолина, ацетилглюкозаминов. С него начинаются реакции главного метаболического пути клетки – цикла Кребса.

Ацетил-СоА принимает участие в реакциях обезвреживания (ацетилирование биогенных аминов и чужеродных соединений).

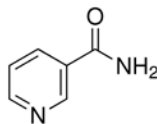
Ацетил-СоА участвует в активировании жирных кислот с образованием *ацил-СоА*. *Ацил-СоА* используется для синтеза липидов и для транспорта жирных кислот в митохондрии.

2.4. Витамин В₅ (РР никотиновая кислота, никотинамид) (антипеллагрический)

Никотиновая кислота является пиридин-3-карбоновой кислотой, никотинамид – ее амидом. Оба соединения в организме легко превращаются друг в друга и поэтому обладают одинаковой витаминной активностью:

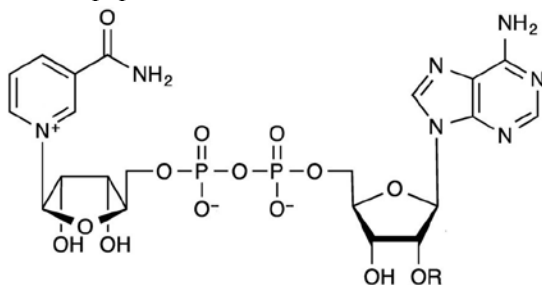


Никотиновая кислота



Никотинамид

В тканях оба соединения преимущественно используются для синтеза коферментных форм – *NAD* и *NADP*:



R = H Никотинаминадениндинуклеотид – НАД⁺ (*NAD*⁺)

R = PO₃H₂ Никотинаминадениндинуклеотид-2'-фосфат – НАДФ⁺ (*NADP*⁺)

Биохимическая функция

Почти весь имеющийся в клетках и жидких средах организма витамин РР представлен в виде никотинамида, включенного в состав коферментов – *NAD* и *NADP*.

NAD⁺ – кофермент дегидрогеназ, участвующих в реакциях окисления глюкозы, жирных кислот, глицерина, аминокислот, является коферментом дегидрогеназ цикла Кребса (исключая сукцинатдегидрогеназу). В этих реакциях кофермент выполняет функцию промежуточного акцептора электронов и протонов.

NAD⁺ – переносчик протонов и электронов в дыхательной цепи митохондрий (от окисляемого субстрата к первому комплексу цепи тканевого дыхания).

NAD^+ – субстрат ДНК-лигазной реакции при синтезе и репарации ДНК, а также субстрат для синтеза поли-АДФ-рибозы в поли-(АДФ)-рибозилировании белков хроматина.

$\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ – донор водорода в реакциях синтеза жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов и некоторых других соединений.

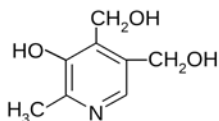
$\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ – компонент монооксигеназной цепи микросомального окисления, выполняющей функцию детоксикации антибиотиков и других чужеродных веществ.

NAD^+ и $\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ являются аллостерическими регуляторами ферментов энергетического обмена, в частности, ферментов цикла Кребса, а также реакций глюконеогенеза.

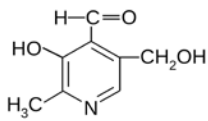
Никотинамид и N-метилникотинамид (метаболит никотинамида) являются участниками процесса метилирования т-РНК и белков.

2.5. Витамин В₆ (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин) (антидерматитный)

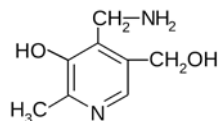
Витамин В₆ включает группу из трех соединений – природных производных пиридина, обладающих одинаковой витаминной активностью: пиридоксина, пиридоксаля, пиридоксамина, и отличающихся друг от друга наличием соответственно спиртовой, альдегидной или аминогруппы:



Пиридоксин

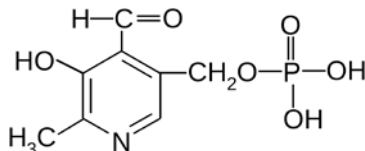


Пиридоксаль



Пиридоксамин

Коферментные функции выполняет фосфорилированное производное пиридоксина – *пиридоксальфосфат*:



Пиридоксальфосфат (PLP)

Биохимическая функция

Витамин В₆ часто называют «королем обмена аминокислот». Вместе с тем его коферментные формы участвуют в реакциях, катализируемых почти всеми классами ферментов.

Коферментные формы витамина В₆ входят в состав следующих ферментов:

- *аминотрансфераз* аминокислот, катализирующих обратимый перенос NH₂-группы от аминокислоты на α-кетокислоту, при этом образуются новая α-кетокислота и новая аминокислота;

- *декарбоксилаз* аминокислот, отщепляющих карбоксильную группу аминокислот, что приводит к образованию биогенных аминов (гистамина, серотонина, ГАМК и других), а также моноаминоксидаз, гистаминазы (диаминоксидаза) и аминотрансферазы ГАМК, обезвреживающих (окисляющих) биогенные амины;

- *изомераз* аминокислот, с помощью которых организм разрушает D-аминокислоты (в состав тканевых белков млекопитающих входят L-аминокислоты);

- *синтазы* δ-аминолевуленовой кислоты, участвующей в биосинтезе гема гемоглобина и других гемсодержащих белков; ферментов, обеспечивающих синтез витамина РР из триптофана, цистеина из серина и гомоцистеина;

- фермента, участвующего в реакциях биосинтеза сфинголипидов (из серина и пальмитоил-СоА).

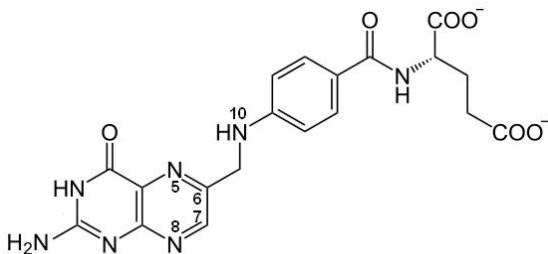
Таким образом, витамин В₆ характеризуется исключительно широким спектром биологического действия. Он принимает участие в регуляции белкового, углеводного и липидного обмена, биосинтезе гема и биогенных аминов, гормонов щитовидной железы и других биологически активных соединений. Помимо каталитического действия, пиридоксальфосфат участвует в процессе активного транспорта некоторых аминокислот через клеточные мембраны, ему присуща функция регулятора конформационного состояния гликогенфосфорилазы – главного регулируемого фермента, осуществляющего распад гликогена.

2.6. Витамин В₉ (фолиевая кислота)

(антианемический)

Фолиевая кислота (лат. *folium* – лист) состоит из трех структурных единиц: остатка птеридина, пара-аминобензойной и глутаминовой кислот.

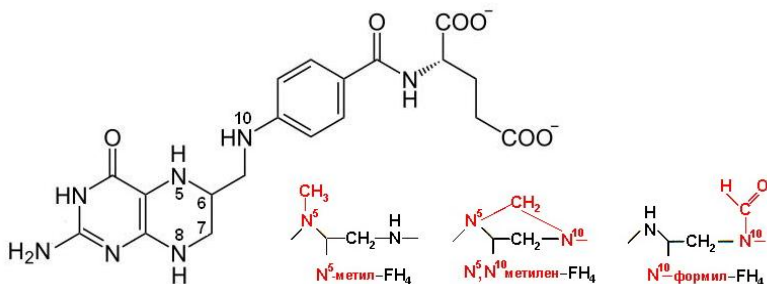
Витамин В₉ это соединение назвали из-за его способности излечивать анемию у цыплят (англ. *chicken* – цыпленок).



Фолиевая кислота

В организме человека птеридиновое кольцо не синтезируется, поэтому удовлетворение потребности в фолиевой кислоте полностью зависит от ее поступления с пищей.

Витамин В₉, всасываясь в тонком кишечнике, восстанавливается в энтероцитах до активной формы – тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК) и N⁵-метил-ТГФК:



5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота. Показаны одноуглеродные фрагменты, переносимые тетрагидрофолатом

Биохимическая функция

Коферментная форма фолиевой кислоты – ТГФК – необходима для мобилизации и использования в реакциях метаболизма одноуглеродных функциональных групп: метильной (–CH₃), метиленовой (–CH₂–), метильной (–CH=), формильной (–CHO) и формиминогруппы (–CH=NH). Присоединение этих групп по 5-му или 10-му атому азота ТГФК осуществляется ферментативно.

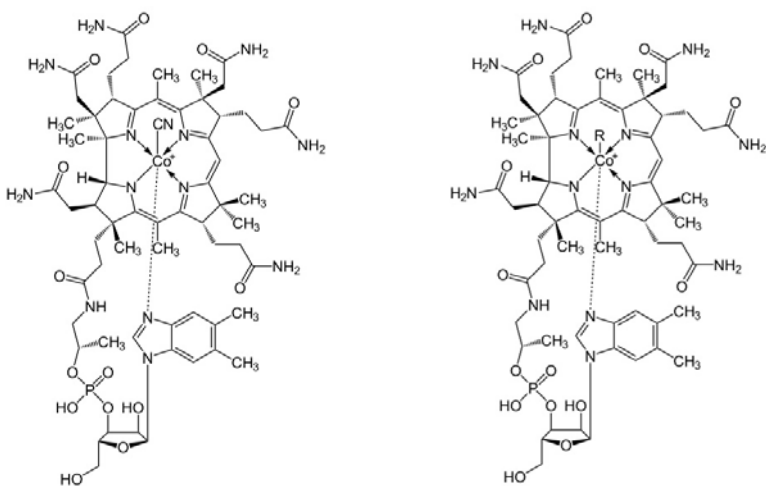
Важнейшими реакциями с участием одноуглеродных фрагментов, связанных с ТГФК, являются:

- N^5, N^{10} -метилен-ТГФК и N^{10} -формил ТГФК служат донорами соответствующих одноуглеродных радикалов при синтезе пуриновых нуклеотидов;
- N^5 -метил-ТГФК вместе с витамином B_{12} участвуют в переносе метильной группы в реакциях синтеза дТМФ и метионина;
- ТГФК вовлекается в метаболизм аминокислот: серина, глицина и метионина.

2.7. Витамин B_{12} (кобаламин) (антианемический)

Структура витамина B_{12} отличается от строения всех других витаминов своей сложностью и наличием в его молекуле иона металла – кобальта. Кобальт связан координационной связью с четырьмя атомами азота, входящими в состав порфириноподобной структуры (называемой корриновым ядром), и с атомом азота 5,6-диметилбензимидазола.

Кобальтсодержащее ядро молекулы представляет собой плоскостную структуру с перпендикулярно расположенным к ней нуклеотидом. Последний, помимо 5,6-диметилбензимидазола, содержит рибозу и фосфорную кислоту (циановая группа, связанная с кобальтом, присутствует только в очищенных препаратах витамина, в клетке она замещается водой или гидроксильной группой). Из-за присутствия в молекуле витамина кобальта и амидного азота это соединение получило название кобаламина:



Кобаламин, R = $-\text{CN}$; $-\text{OH}$; $-\text{CH}_3$; $-5'$ -дезоксадеозил

Биохимическая функция в организме

Витамин В₁₂ служит предшественником двух коферментов: *метилкобаламина* в цитоплазме и *дезоксаденозилкобаламина* в митохондриях.

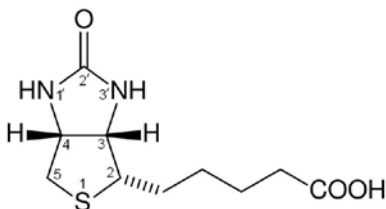
Метилкобаламин – кофермент, участвующий в образовании метионина из гомоцистеина. Кроме того, он принимает участие в превращениях производных фолиевой кислоты, необходимых для синтеза нуклеотидов – предшественников ДНК и РНК.

Дезоксаденозилкобаламин в качестве кофермента участвует в метаболизме жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов и аминокислот с разветвлённой углеводородной цепью.

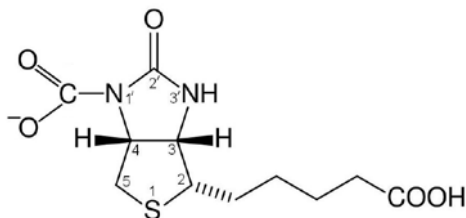
2.8. Витамин Н (биотин)

(антисеборейный)

В основе строения биотина лежит тетрагидроимидазолное кольцо, к которому присоединена молекула мочевины, а боковая цепь представлена валериановой кислотой:



N1-имидазольного кольца является местом карбоксилирования. Связываясь с ионом гидрокарбоната (HCO₃⁻), биотин превращается в *карбоксибиотин*, приобретая свойства кофермента:



Биотин способен образовывать с авидином – гликопротеином белка куриного яйца – прочный комплекс, который не расщепляется пищеварительными ферментами. Поэтому при частом употреблении сырых яиц прекращается всасывание присутствующего в пище биотина. Способ-

ность молекул авидина и биотина специфически связываться друг с другом используется в некоторых методах очистки в биотехнологии.

Биохимическая функция

Витамин Н способствует усвоению тканями ионов бикарбоната и активирует реакции карбоксилирования и транскарбоксилирования в составе следующих карбоксибиотинил-содержащих ферментов:

- *Пируваткарбоксилазы* – фермента, катализирующего АТФ-зависимое образование оксалоацетата из пирувата и HCO_3^- .

- *Пируваткарбоксилаза* является тетрамерным белком, несущим четыре молекулы биотина, каждая из которых связана с остатком лизина апофермента. Пируваткарбоксилазная реакция является наиболее важной анаэробной реакцией, особенно в печени и почках (к анаэробным относятся возмещающие, дополняющие, реакции). Так, пируваткарбоксилаза восполняет запас оксалоацетата, необходимого для функционирования цикла Кребса. Также пируваткарбоксилаза является важным митохондриальным ферментом глюконеогенеза (новообразования глюкозы):

- *ацетил-СоА-карбоксилазы* – первого фермента в реакциях биосинтеза жирных кислот. При ферментативном катализе карбоксильная группа бикарбоната передается на ацетил-СоА с образованием малонил-СоА;

- *пропионил-СоА-карбоксилазы* – фермента, участвующего в окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. При этом происходит стереоспецифический перенос активированной карбоксильной группы от карбоксибиотина к пропионил-СоА с образованием метилмалонил-КоА. Следует отметить, что ион бикарбоната может утилизироваться клеткой без участия биотина. Это имеет место в карбомилфосфатсинтетазной реакции, зависящей от карбомилфосфатсинтетазы II при синтезе пиримидинов;

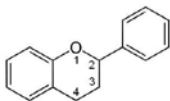
- *β -метилкротоноил-СоА-карбоксилазы* – фермента, принимающего участие в реакциях окислительного распада лейцина;

- *метилмалонил-оксалоацетат-транскарбоксилазы* – фермента, катализирующего реакцию транскарбоксилирования, а именно, обратимое превращение пирувата и оксалоацетата (другие транскарбоксилазные реакции также протекают с участием биотина).

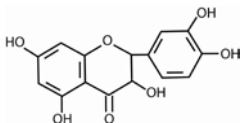
2.9. Витамин Р (биофлавоноиды)

(капилляроукрепляющий)

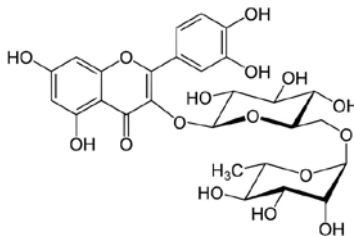
В основе строения соединений Р-витаминного действия – биофлавоноидов, представляющих собой разнообразную группу растительных полифенольных соединений – лежит ядро фенилхромана – флавана.



Флаван



Кверцетин



Рутин

Биохимическая функция в организме

Биофлавоноиды могут использоваться для построения биологически важных соединений в клетке, в частности убихинона. Витамин Р способствует стабилизации межклеточного матрикса соединительной ткани и снижению проницаемости капилляров.

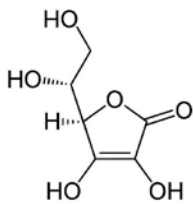
Рутин и кверцетин – полифенолы, обладающие Р-витаминной активностью, являются эффективными антиоксидантами.

Флавоноиды (катехины) зеленого чая способны оказывать выраженное цитопротекторное действие, в основе которого лежит их свойство перехватывать свободные радикалы кислорода. В отличие от витамина Е, биофлавоноиды кроме прямого антирадикального действия, могут также связывать ионы металлов с переменной валентностью, ингибируя тем самым процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) биомембран. Наиболее эффективными ловушками супероксидных радикалов кислорода являются железокомплексы флавоноидов: например, комплекс рутина с Fe^{2+} почти в 5 раз активнее самого рутина.

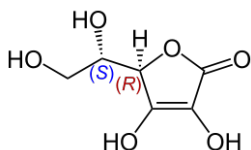
2.10. Витамин С (аскорбиновая кислота)

(антискорбутный)

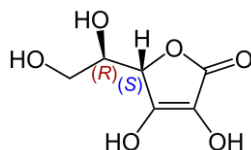
Витамин С (L-аскорбиновая кислота) является γ -лактоном 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты, близкой по структуре к глюкозе. Витаминной активностью обладает только L-изомер, D-изомер является антивитамином:



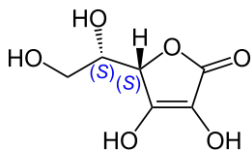
L-аскорбиновая кислота



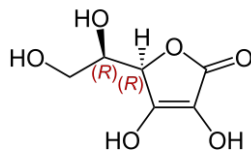
1a



1b



2a



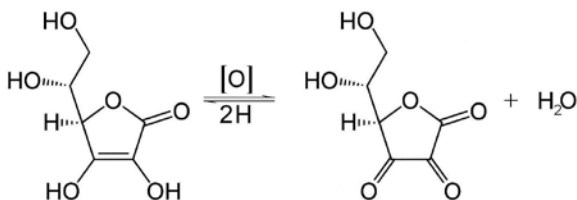
2b

Оптические изомеры аскорбиновой кислоты:
 1a – L-аскорбиновая кислота, 2a – L-изоаскорбиновая кислота,
 1b – D-изоаскорбиновая кислота, 2b – D-аскорбиновая кислота.

Как следует из формулы, аскорбиновая кислота является ненасыщенным соединением и не содержит свободной карбоксильной группы. Кислый характер этого соединения обусловлен наличием двух фенольных гидроксильных групп, способных к диссоциации с отщеплением водородных ионов, по-видимому, в основном у третьего углеродного атома.

Из-за наличия двух асимметрических атомов существуют четыре диастереомера аскорбиновой кислоты. Две условно именуемые L- и D- формы хиральны относительно атома углерода в фурановом кольце, а изо-форма является D-изомером по атому углерода в боковой этиловой цепи.

Аскорбиновая кислота существует в двух формах: восстановленной форме и окисленной форме в виде дегидроаскорбиновой кислоты. Таким образом, аскорбиновая кислота образует, так называемую редокс-пару с дегидроаскорбиновой кислотой, сохраняющей витаминные свойства:



Дегидроаскорбиновая кислота, образующаяся в клетках из аскорбиновой кислоты с участием аскорбатоксидазы, является неустойчивым соединением и легко окисляется в водной фазе с образованием 2,3-дикетоглулоновой кислоты, которая утрачивает витаминную активность.

Биохимическая функция

Витамин С занимает доминирующее положение в антиоксидантной защите, значительно превосходящей в этом отношении глутатион-SH.

Антиоксидантная функция аскорбиновой кислоты объясняется ее способностью легко отдавать два атома водорода, используемых в реакциях обезвреживания свободных радикалов. В высоких концентрациях этот витамин «гасит» свободные радикалы кислорода. Важной функцией аскорбата является обезвреживание свободного радикала токоферола (витамина Е), благодаря чему предупреждается окислительная деструкция этого главного антиоксиданта клеточных мембран. Как антиоксидант аскорбиновая кислота необходима для образования активных форм фолиевой кислоты, защиты железа гемоглобина и оксигемоглобина от окисления, поддержания железа цитохромов Р450 в восстановленном состоянии.

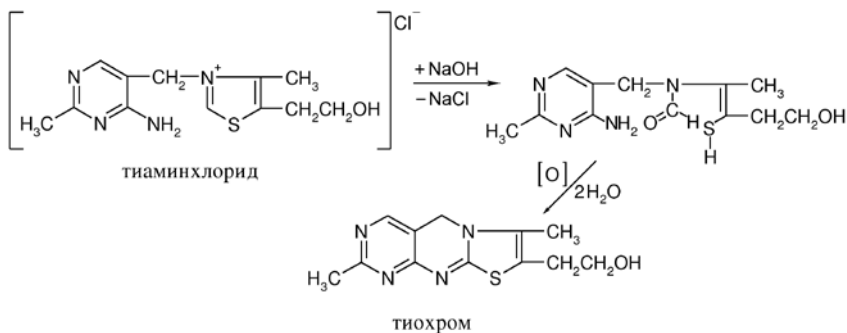
Витамин С участвует в процессе всасывания железа из кишечника и высвобождении железа из комплекса с его транспортным белком крови – трансферрином, облегчая поступление этого металла в ткани. Аскорбиновая кислота может включаться в работу дыхательной цепи митохондрий, являясь донором электронов для цитохрома С.

Благодаря способности легко окисляться и восстанавливаться, аскорбиновая кислота участвует в реакциях гидроксилирования остатков лизина и пролина при синтезе коллагена (основного белка соединительной ткани).

Витамин С активно участвует в *обезвреживании токсинов*, антибиотиков и других чужеродных для организма соединений, осуществляемых монооксигеназной системой цитохромов Р450. В составе монооксигеназной системы микросом витамин С играет роль прооксиданта: как и в реакциях гидроксилирования он обеспечивает образование свободных радикалов кислорода.

Необходимо подчеркнуть, что выраженный антиоксидантный эффект аскорбата проявляется только при совместном его введении с токоферолом, поскольку именно витамин Е способен эффективно обезвреживать свободные радикалы жирных кислот и их перекиси.

Таким образом, аскорбиновая кислота стабилизирует витамин Е, который легко разрушается, а витамин Е усиливает антиоксидантное дей-

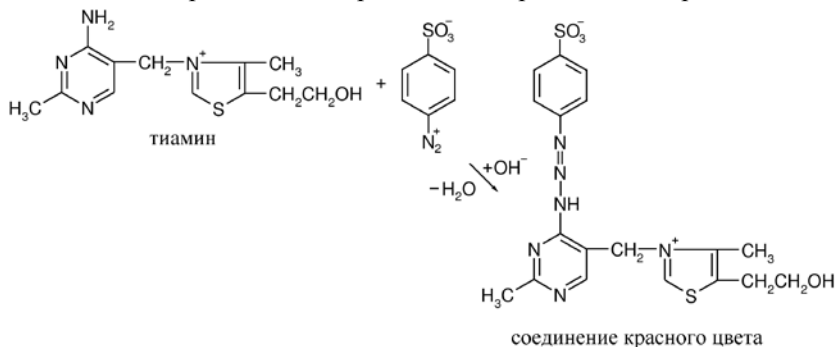


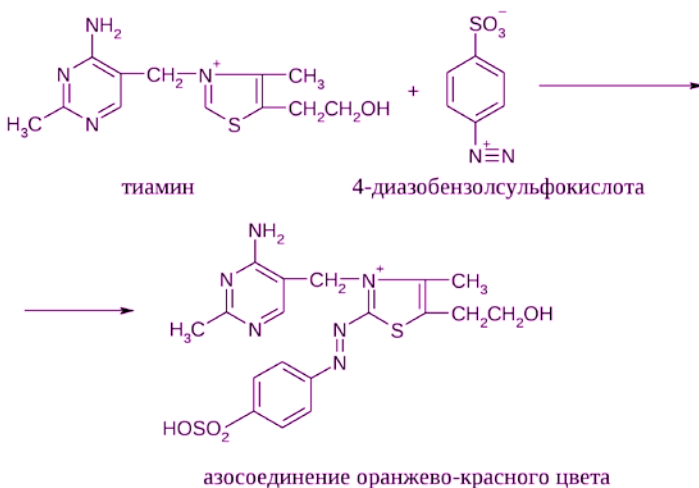
Тиохромную пробу используют для качественного и количественного флуориметрического анализа витамина В₁ в лекарственных препаратах, растительном сырье и пищевых продуктах.

Реакция с диазореактивом

Для проведения этой реакции обычно используют диазореактив, полученный из сульфаниловой кислоты.

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



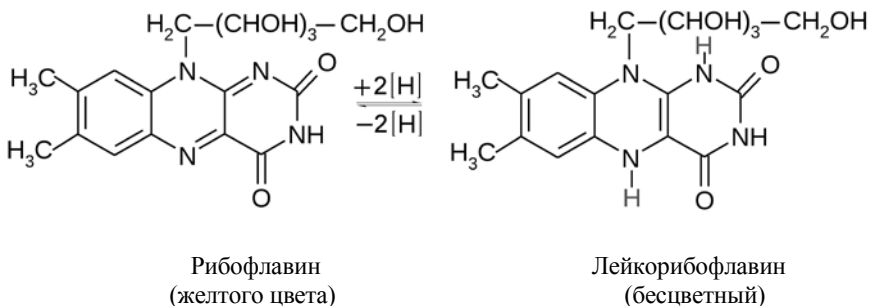


Реакция применяется для спектрофотометрического количественного анализа тиаминa в растворах.

Витамины группы В₂

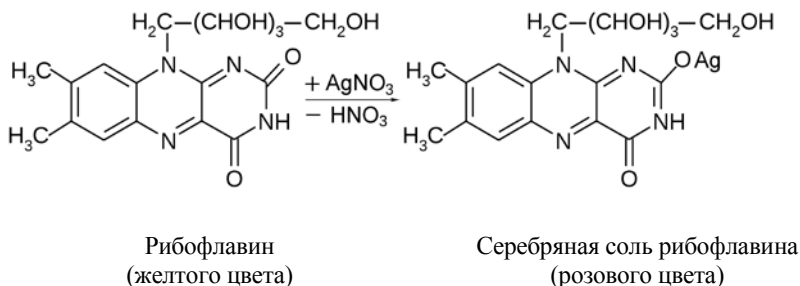
Реакция восстановления

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



Реакция с солями тяжелых металлов

Рибофлавин проявляет очень слабые кислые свойства, но образует устойчивые окрашенные соли с ионами тяжелых металлов. При добавлении к водному раствору рибофлавина раствора нитрата серебра или ацетата ртути образуются окрашенные соединения розового или оранжевого цвета, соответственно:

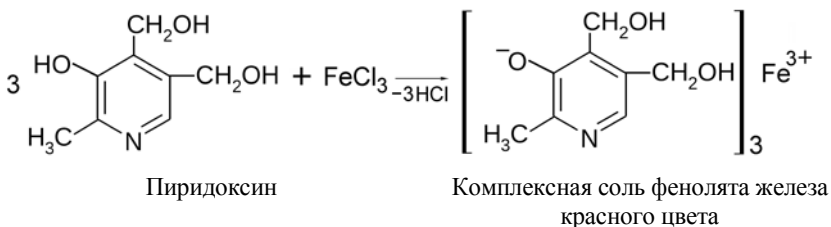


Реакции с солями серебра или ртути используются для качественно-го и количественного спектрофотометрического анализа рибофлавина.

Витамины группы В₆

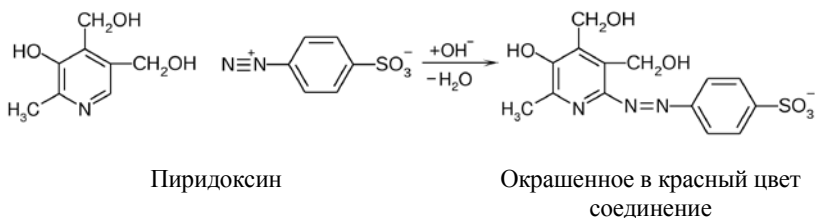
Реакция с хлоридом железа (III)

Все представители группы витаминов В₆ проявляют свойства, характерные для фенолов, в частности они дают общую реакцию подлинности на фенолы с хлорным железом, легко вступают в реакции электрофильного замещения по свободному *para*-положению к фенольному гидроксилу. При этом образуется комплексная соль фенолята железа красного цвета:



Реакция с диазореактивом

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

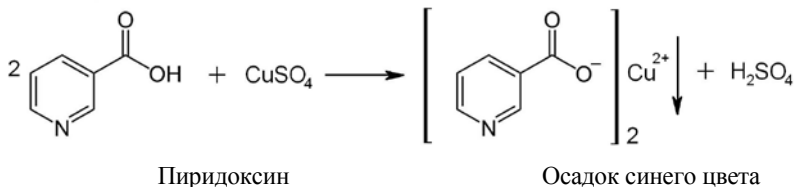


Витамины группы PP

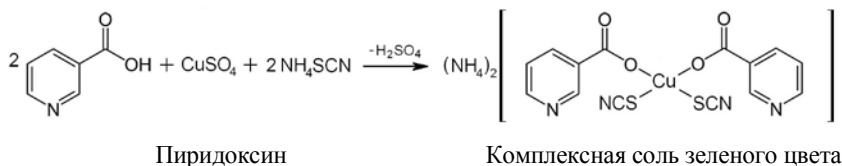
Никотиновая кислота проявляет выраженные и кислые, и основные свойства; амид никотиновой кислоты обладает только основными свойствами. Эти различия в свойствах также используются для отличия одного препарата от другого.

Реакция с солями тяжелых металлов

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

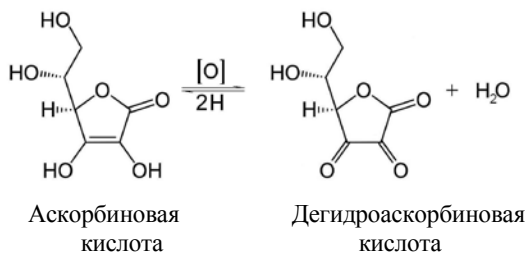


В присутствии роданид-ионов образуется комплексная соль зеленого цвета:



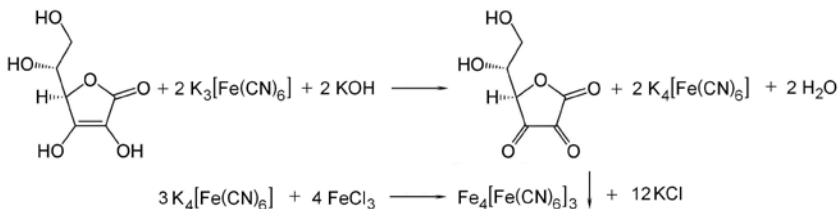
Витамин С

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



Реакция с феррицианидом калия

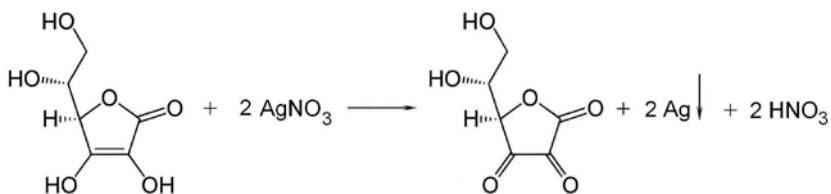
Для идентификации аскорбиновой кислоты применяют красную кровяную соль, которая в щелочной среде восстанавливается аскорбиновой кислотой до желтой кровяной соли. После подкисления реакционной смеси и добавления раствора хлорида железа (III) образуется синий осадок берлинской лазури:



Синий осадок берлинской лазури

Реакция с солями серебра

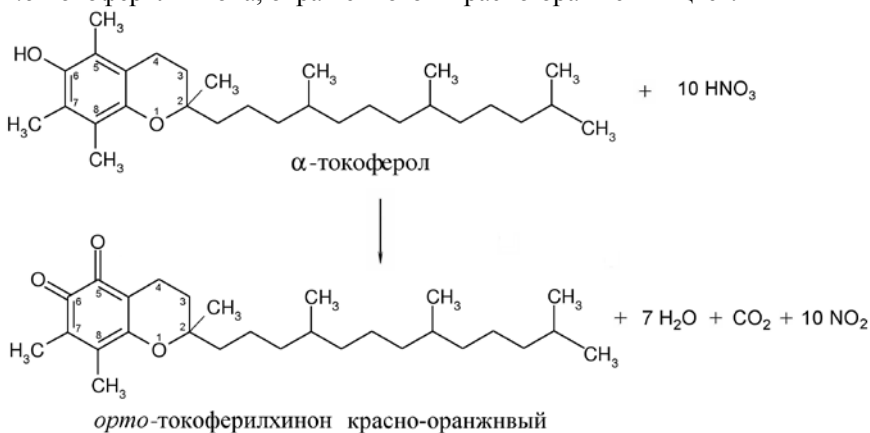
Аскорбиновая кислота восстанавливает даже такие слабые окислители, как йод, соли ртути и серебра:



Витамины группы E

Реакция с азотной кислотой

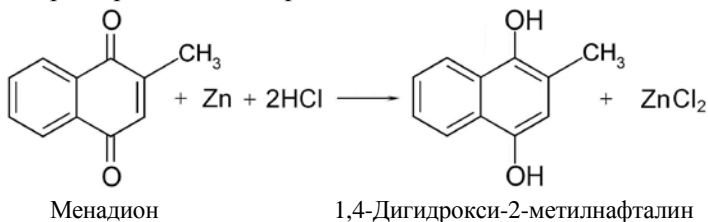
Для идентификации α -токоферола и его ацетата используется реакция с азотной кислотой с нагреванием до температуры 80°C . При этом в таких жестких условиях токоферолаацетат гидролизуется, и далее образующийся α -токоферол окисляется азотной кислотой с образованием *орто*-токоферилхинона, окрашенного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

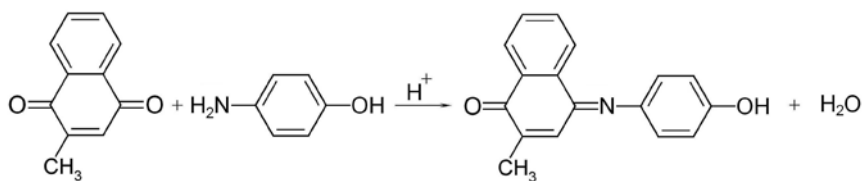


Витамины группы K

Реакция восстановления

Идентификация витаминов K_1 , K_2 и K_3 основана на реакции их восстановления, например цинком в кислой среде. При этом характерная для этих витаминов желтая окраска исчезает вследствие образования бесцветного 1,4-дигидрокси-2-метилнафталина. Эти соединения легко конденсируются с ароматическими аминами в кислой среде с образованием более глубоко окрашенных соединений. Например, при взаимодействии менадиона с *пара*-аминофенолом в кислой среде появляется синее окрашивание, характерное для индофенолов.





Менадион
(желтого цвета)

para-Аминофенол
(бесцветный)

Индофенольное соединение
синего цвета

Контрольные вопросы

1. Понятие о витаминах, провитаминах, антивитаминах.
2. Классификация и номенклатура витаминов.
3. Жирорастворимые витамины. Общая характеристика.
4. Химическое строение, свойства, биологическая роль жирорастворимых витаминов А, D, E, K.
5. Водорастворимые витамины. Общая характеристика.
6. Химическое строение, биологическая роль, коферментные формы витаминов В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В_с, В₁₂, Н, Р, С.
7. Принципы методов качественного определения витаминов.

Литература

Основная

1. Марри, Р., Греннер, Д., Мейес, П., Родуэлл, В., Биохимия человека : т. 1 – М. : Мир, 1993.
2. Горячковский, А. М. Справочное пособие по клинической биохимии. – Одесса : ОКФА, 1994.
3. Кнорре, Д. Г., Мызина, С. Д. Биологическая химия. – М. : Высшая школа, 1998.
4. Кольман, Я., Рем, К.-Г. Наглядная биохимия. – М. : Мир, 2000.
5. Северин, Е. С., Алейникова, Т. Л., Осипов, Е. В., Силаева, С. А. Биологическая химия. – М. : Медицинское информационное агентство, 2008.
6. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии. – Минск : Новое знание, 2002.
7. Кухта, В. К., Морозкина, Т. С., Олецкий, Э. И., Таганович, А. Д. Биологическая химия. – М. : Бином, 2008.
8. Березов, Т. Т., Коровкин, Б. Ф. Биологическая химия. – М. : Медицина, 2007.

9. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология. – Минск : Книжный Дом, 2004.

10. Чиркин, А. А., Данченко, Е.О. Биохимия. – М. : Медицинская литература, 2010.

Дополнительная

1. Nelson, D. L., Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman (ed.), 2004.

2. Metzler, D. Biochemistry (The chemical reactions in living cells), Elsevier, Academic Press, V. 1–2, 2003–2004.

3. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. Lubert Stryer Biochemistry, W. H. Freeman (ed.), 2006.

Ход работы

Цель: изучение химических свойств витаминов и методов их идентификации в растворе.

Задание 1. Проведение качественных реакций на водорастворимые витамины.

Витамин В₁

Реакция с диазореактивом. Витамин В₁ в щелочной среде с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель 1 % раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5 % раствора NaNO₂ (в пробирке образуется диазореактив). К диазореактиву добавляют 5 капель раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5 капель 10 % раствора NaHCO₃. На границе раздела двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Витамин В₂

Реакция восстановления рибофлавина. Реакция на витамин В₂ основана на его способности легко восстанавливаться; при этом раствор с витамином, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, в связи с тем, что восстановленная форма витамина В₂ бесцветна.

Ход работы. В пробирку вносят 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель концентрированной HCl и опускают кусочек металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается.

Витамин РР

Качественная реакция с ацетатом меди. Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Ход работы. В пробирку вносят 7 капель раствора витамина РР, затем приливают 10 капель 5 % раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$. Выдерживают в водяной бане 2–3 мин. Наблюдают выпадение осадка медной соли никотиновой кислоты.

Витамин В₆

Реакция с хлоридом железа (III). Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Ход работы. На часовое стекло нанести 3 капли 5 % раствора FeCl_3 и 3 капли раствора витамина В₆. Смесь перемешивают. Наблюдают за развитием красного окрашивания.

Витамин Р

Качественная реакция с хлоридом железа (III). Хлорид железа образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель водного раствора рутина и добавляют 3 капли 5 % раствора FeCl_3 .

Качественная реакция с концентрированной серной кислотой. Концентрированная серная кислота образует с рутином соли, растворы которых характеризуются ярко-желтой окраской.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель водного раствора рутина и прибавляют осторожно по стенке 3 капли концентрированной H_2SO_4 . На границе двух жидкостей наблюдают окрашенное в желтый цвет кольцо.

Витамин С

Качественная реакция с феррицианидом калия ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Реакция основана на способности витамина С легко вступать в окислительно-восстановительные реакции.

Ход работы. К 5 каплям раствора витамина С прибавляют по несколько капель 10 % раствора NaOH и 10 % раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Перемешивают, затем добавляют 3 капли 10 % раствора HCl (для подкисления) и 2 капли 10 % раствора FeCl_3 . Появляется сине-зеленое окраши-

вание, и постепенно образуется синий осадок берлинской лазури – $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$.

Качественная реакция с раствором Люголя. Реакция основана на способности витамина С восстанавливать молекулярный йод из раствора Люголя с образованием йодистоводородной кислоты.

Ход работы. В пробирку добавить 5 капель раствора витамина С и 2 капли раствора Люголя. Наблюдается обесцвечивание раствора.

Задание 2. Проведение качественных реакций на жирорастворимые витамины.

Витамин А

Реакция с серной кислотой. Серная кислота, обладая водоотнимающим свойством, образует с витамином А окрашенный комплекс синего цвета, переходящий затем в фиолетовый и далее в бурый цвет.

Ход работы. На часовое стекло наносят 3 капли раствора рыбьего жира, затем 5 капель хлороформа и 1 каплю концентрированной H_2SO_4 . Наблюдают соответствующее окрашивание.

Реакция с сульфатом железа (II). В пробирку вносят 3–4 капли раствора рыбьего жира в хлороформе, 5–10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) и 2–3 капли концентрированной серной кислоты. В присутствии витамина А появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

Витамин D

Бромхлороформная проба

Ход работы. На часовое стекло (под часовое стекло следует предварительно подложить лист белой бумаги) наносят 3 капли рыбьего жира и прибавляют 5 капель раствора брома в хлороформе. В присутствии витамина D смесь окрашивается в зеленовато-голубой цвет.

Реакция с анилиновым реактивом

Ход работы. В пробирку вносят 3 капли рыбьего жира, затем 5 капель хлороформа и 3 капли анилинового реактива. Осторожно нагревают пробирку до появления красного окрашивания. Пробирку оставляют в штативе остывать. Через несколько минут эмульсия разделяется. Нижний слой, при наличии витамина в исходном материале, окрашен в интенсивно красный цвет.

Витамин Е

Реакция с азотной кислотой. В присутствии азотной кислоты токоферол окисляется через промежуточное образование токоферолхинона до орто-, или парохинона, имеющего красное окрашивание.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель 0,1 % спиртового раствора витамина Е и несколько крупинок сахарозы, затем по стенке пробирки приливают 1 мл концентрированной HNO_3 . Пробирку интенсивно перемешивают и наблюдают окрашивание.

Реакция с хлоридом железа (III). Спиртовой раствор α -токоферола окисляется хлоридом железа (III) в токоферилхинон и раствор окрашивается в красный цвет.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель 0,1 % спиртового раствора витамина Е и добавляют 0,5 мл 1 % раствора FeCl_3 . Встряхнув содержимое пробирки, наблюдают появление красного окрашивания.

Витамин К

Реакция с цистеином

Ход работы. На часовое стекло наносят 5 капель 0,05 % спиртового раствора витамина К, 5 капель 0,025 % спиртового раствора цистеина и 1 каплю 10 % раствора гидроксида натрия. Наблюдают лимонно-желтое окрашивание.

Реакция с анилином

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель 0,05 % спиртового раствора витамина К, добавляют 2 капли анилина. Осторожно встряхивают содержимое пробирки и наблюдают красное окрашивание, что обусловлено образованием 1-метил-2-фениламинафтахинона.

Задание 3. Методы количественного определения витаминов.

Количественное определение рутина в чае (по Левенталю)

Принцип метода: количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Ход работы. К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. Затем 5 мл экстракта чая отмеряют в коническую колбу, добавляют 5 мл дистиллированной

воды и 5 капель индигокармина (появляется синее окрашивание). Титруют из микробюретки 0,05 н раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски.

Определяют процентное содержание рутина в чае. Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{3,2 \times 100 AV_1}{1000 V_2 P},$$

где X – содержание витамина Р в препарате (%); 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент; A – объем 0,05н раствора $KMnO_4$, израсходованного на титрование (мл); V_1 – объем, в котором растворена взятая для анализа навеска (мл); 100 – масса вещества чая для расчета процентного содержания (г); V_2 – объем экстракта чая, взятого для титрования (мл); P – навеска (мг); 1000 – множитель для перевода мкг в мг (норма содержания рутина в чае 30–50 мг/100 г).

Спектрофотометрическое определение провитамина А (каротина)

Ход работы. Навеску из свежих листьев 0,2–1 г растирают в течение 5 мин в фарфоровой ступке со стеклянным или кварцевым песком, добавляя небольшое количество $MgCO_3$ и 5–10 мл ацетона. Затем полученную массу экстрагируют, используя водоструйный насос до обесцвечивания материала. Измеряют общий объем вытяжки и переносят в пробирки с притертыми пробками.

Для расчета концентрации на спектрофотометре определяется оптическая плотность экстракта при длинах волн 440, 644, 662 нм:

$$C = 4,7 \cdot E_{440} - 0,268 \cdot (5,134 \cdot E_{662} + 20,44 \cdot E_{644})$$

Из значений экстинкций при указанных длинах волн вычисляется концентрация пигмента в ацетоновой вытяжке в мкг/мл. Исходя из найденных концентраций, рассчитывают содержание его в исследуемом образце в мкг/г сухого вещества:

$$C = C_x \frac{V \times n}{m},$$

где C – концентрация пигмента (мкг/г сухого веса); C_x – концентрация пигмента (мкг/мл); V – объем экстракта (мл); m – масса сырья (г); n – коэффициент разведения.

Количественное определение витамина С методом титрования индофеноловым реактивом

Принцип метода: количественное определение аскорбиновой кислоты в исследуемом материале основано на ее способности восстанавливать индофеноловый реактив. При титровании вытяжки исследуемого материала раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола происходит окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановление индофенолового реактива. Завершение титрования можно установить по изменению окраски. Окисленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенола имеет синюю окраску в нейтральной и щелочной среде, восстановленная форма – приобретает розовую окраску в кислой среде.

Ход работы. Навеску исследуемого материала 5–20 г (картофель, морковь, яблоки и т. п.) тщательно растирают в ступке со щепоткой стекла или кварцевого песка, добавляя порциями по 4–5 мл 2 % раствора соляной кислоты до получения однородной смеси. Далее полученную смесь переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и общий объем экстракта доводят до метки раствором кислоты. Содержимое хорошо перемешивают, настаивают 5–7 мин и фильтруют через бумажный фильтр. Полученный фильтрат должен быть совершенно прозрачным.

Берут две конические колбочки вместимостью 100–150 мл и в одну вносят 20 мл полученного фильтрата, в другую – 20 мл раствора кислоты. Содержимое колбочек титруют индофеноловым реактивом до розового цвета, удерживающегося 30 сек. Результаты записывают, и титрование повторяют с новыми порциями того же фильтрата. На основании средней величины, полученной из 2-3 определений, рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot M \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m},$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты в материале, мг/100г продукта; $(a - b)$ – разность между объемами индофенолового реактива, пошедшими на титрование опытной (a) и контрольной (b) проб, мл; M – масса аскорбиновой кислоты, соответствующая 1 мл индофенолового реактива, мг; V – общий объем экстракта, мл; V_1 – объем фильтрата, взятого для титрования, мл; m – масса исследуемого материала, г, 100 – пересчет на 100 г материала.

Оформление работы

К занятию кратко законспектировать теоретический материал по лабораторной работе.

План занятия:

1. Описать этапы работы.

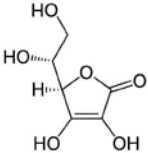
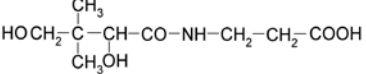
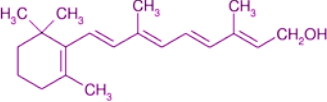
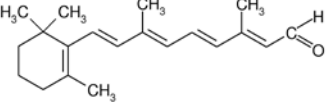
2. Описать результаты опытов по водорастворимым витаминам и занести их в таблицу:

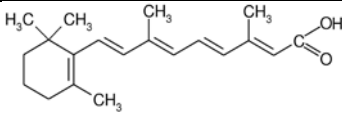
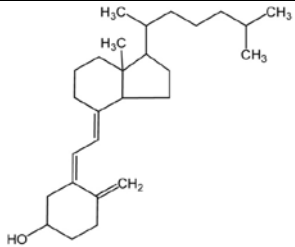
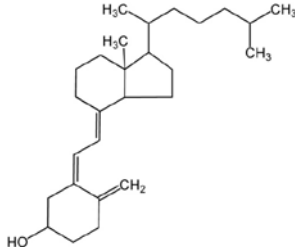
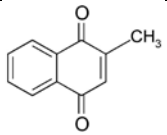
Название витамина, формула	Название кофермента	Название фермента	Признаки обнару- жения витамина

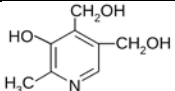
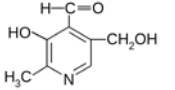
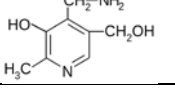
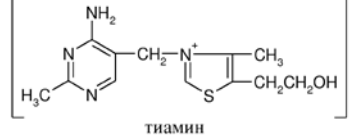
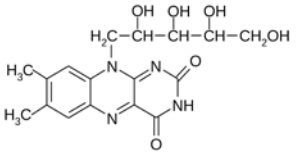
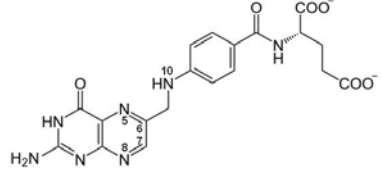
3. Сделать выводы по каждому из опытов.

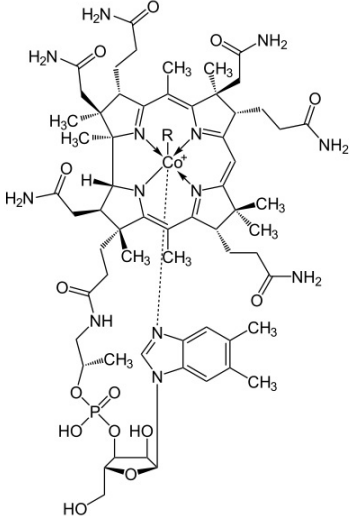
Приложение 1

Номенклатура и классификация витаминов по химическому строению и растворимости

Тривиальное название	Буквенное обозначение	Структурная формула	Растворимость
<i>Витамины алифатического ряда</i>			
Аскорбиновая кислота	С		водорастворимый
Пантотеновая кислота	В ₃		водорастворимый
<i>Витамины алициклического ряда</i>			
Ретинол	А ₁		жирорастворимый
Ретиналь	А ₂		жирорастворимый

Ретиновая кислота	A ₃		жирорастворимый
Эргокальциферол	D ₂		жирорастворимый
Холекальциферол	D ₃		жирорастворимый
<i>Витамины ароматического ряда</i>			
Менадион	K ₃		жирорастворимый

Пиридоксин	B ₆		водорастворимый
Пиридоксаль	B ₆		водорастворимый
Пиридоксамин	B ₆		водорастворимый
Тиамин	B ₁	 тиамин	водорастворимый
Рибофлавин	B ₂		водорастворимый
Фолиевая кислота	B _C		водорастворимый

<p>Метилкобаламин</p> <p>Цианкобаламин</p> <p>Оксикобаламин</p>	<p>B_{12}</p>		<p>водорастворимый</p>
---	----------------------------	--	------------------------

Учебное издание

Докучаева Евгения Александровна
Сяхович Виталий Эдуардович
Богданова Наталья Валерьевна

ОБЩАЯ БИОХИМИЯ:
ВИТАМИНЫ

Практикум

Редактор *А. В. Красуцкая*
Корректор *Л. М. Корневская*
Компьютерная верстка *Д. В. Головач*

Подписано в печать 03.05.2017. Формат 60×90 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 1,51.

Тираж 20 экз. Заказ № 256.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.