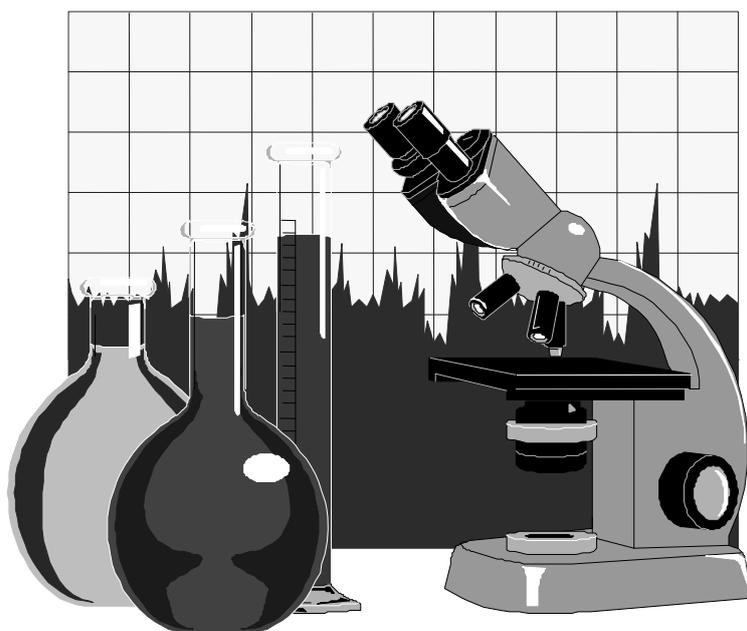




МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИТАМИНОВ

Практикум



Издательство
Калининградского государственного университета
2004

УДК 577.16 (075.8)
ББК 28.072.532 я 73
М

М Методы анализа витаминов: Практикум / Сост. Г.Н. Чупахина, П.В. Масленников. – Калининград: Изд-во КГУ, 2004. – 36 с.

В практикуме приведены методы количественного анализа водорастворимых витаминов В₁, В₂, витамина РР. Дается три метода определения витамина С, включая метод, позволяющий одновременно определять восстановленную форму аскорбиновой кислоты, окисленную форму и продукт необратимого превращения последней – дикетогулоновую кислоту. В практикум включены методы определения флавоноидных соединений с Р-витаминной активностью: рутина и антоцианов. Приведены методы количественного определения двух жирорастворимых витаминов: К и Е. Даны методы анализа общей кислотности плодов и овощей, определения сухого вещества в растительном материале и статистической обработки экспериментальных данных.

Практикум предназначен для студентов, выполняющих курсовые и дипломные работы по физиологии и биохимии, валеоэкологии, экологии человека; для аспирантов, преподавателей вузов.

Печатается по решению Редакционно-издательского совета Калининградского государственного университета.

УДК 577.16 (075.8)
ББК 28.072.532 я 73

© Чупахина Г.Н., Масленников П.В.,
составление, 2004
© Издательство КГУ, 2004

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Флюорометрическое определение витамина В ₁	5
Спектрофотометрическое определение восстановленного и окисленного рибофлавина (по Г.Н. Чупахиной, А.С. Гребенникову, Н.С. Лейба)	7
Количественное определение витамина РР по реакции с роданбромидом	9
Количественное определение аскорбиновой, дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот в растительных тканях	11
Количественное определение аскорбиновой кислоты методом титра	15
Определение витамина С в окрашенных объектах (по Бекеру)	17
Определение флавоноидных соединений с Р – витаминной активностью	18
Количественное определение витамина К	21
Количественное определение витамина Е	22
Спектрофотометрическое определение провитамина А (каротина)	24
Определение содержания фолиевой кислоты	25
Определение общей кислотности плодов и овощей	26
Определение сухого вещества в свежем растительном материале	29
Статистическая обработка данных физиолого-биохимических исследований	31
Статистическая обработка данных методом попарных сравнений	33

Введение

Витамины – это сборная группа органических соединений, имеющих разнообразное химическое строение, физические свойства и оказывающих различное физиологическое действие на организм человека. Все они объединены в отдельную группу природных органических соединений по принципу абсолютной их необходимости для гетеротрофных организмов. Витамины являются дополнительной к белкам, жирам, углеводам и минеральным веществам составной частью пищи. Они биологически активны в малых дозах, так как не являются ни основным пластическим, ни основным энергетическим материалом. Их функция каталитическая: большинство витаминов входит в состав ферментов – специфических биологических катализаторов.

Способностью самостоятельно синтезировать большинство витаминов обладают только растения и некоторые микроорганизмы. Человек усваивает их из пищи уже в готовом виде. При отсутствии или недостатке витаминов в пище, а также при их избытке наступают нарушения обмена веществ (авитаминозы, гиповитаминозы и гипервитаминозы). Этим объясняется необходимость контроля количественного содержания витаминов в продуктах питания.

Витамины делятся на водорастворимые и растворимые в жирах. К первой группе относятся: витамины В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₃ (пантотеновая кислота), витамин РР (никотиновая кислота, никотинамид), В₆ (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин), В₁₂ (цианокобаламин), фолиевая кислота (птероилглутаминовая кислота), биотин (витамин Н), витамин С (аскорбиновая кислота), витамин Р (биофлавоноиды). Группа жирорастворимых витаминов включает: А (ретинол), предшественниками которого являются каротины, Д (кальциферолы), Е (токоферолы), К (филлохиноны) и F – комплекс ненасыщенных жирных кислот, Q – убихинон.

К витаминоподобным соединениям относятся холин, липоевая кислота, оротовая кислота, пангамовая кислота (витамин В₁₅), инозит, парааминобензойная кислота, карнитин, витамин U.

В практикуме приведены наиболее доступные методы количественного анализа некоторых водо- и жирорастворимых витаминов: спектрофотометрические, колориметрические и титрационные.

Г.Н. Чупахина

ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА В₁

При окислении тиаминхлорида гексациано-(III) ферратом калия в щелочной среде образуется тиохром, обладающий сильной голубой флюоресценцией в ультрафиолетовых лучах. Для количественного определения тиаминхлорида сравнивают флюоресценцию окисленных стандартных растворов тиаминхлорида и испытуемых растворов на флюорометре.

Распространение. Тиамин распространен повсеместно и обнаруживается у разных представителей живой природы. Как правило, количество его в растениях и микроорганизмах достигает величин значительно более высоких, чем у животных. Кроме того, в первом случае витамин представлен преимущественно свободной, а во втором – фосфорилированной формой. Содержание тиаминхлорида в основных продуктах питания колеблется в довольно широких пределах в зависимости от места и способа получения исходного сырья (в мкг%): пшеница – 0,45, рожь – 0,41, картофель – 0,09, капуста белокочанная – 0,08, томаты – 0,06, свинина – 0,25, рыба свежая – 0,08, молоко коровье – 0,05.

Оборудование и реактивы. Флюорометр. Термостат на 45 °С. Баня водяная. Ступка фарфоровая, колба мерная на 100 мл. Воронки делительные на 20 мл (2 шт.) и 100 мл. Пипетки градуированные на 1 и 5 мл (по 2 шт.). Пробирки с притертыми пробками, ферментный препарат фосфатазы (мицелий гриба *Penicillium* высушивают при 45 °С и используют в качестве ферментного препарата); 2 %-ный гексациано-(III) феррат калия (готовится перед работой). Гидроксид натрия (30 %-ный). Серная кислота (0,1 н.). Изоамиловый спирт, толуол, ацетат натрия (2,5 М), содержащий ферментный препарат фосфатазы (100 мг сухого мицелия гриба настаивают с 10 мл 2,5 М раствора ацетата натрия в течение 1 ч, после чего фильтруют). Стандартный раствор тиаминхлорида (10 мг тиаминхлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. соляной кислоты, 1 мл полученного раствора доводят водой до 10 мл. В 1 мл последнего раствора содержится 1 мкг тиаминхлорида).

Ход анализа. 5 – 7 г семян гречихи (или другого растительного материала) тщательно растирают в фарфоровой ступке с 10 – 15 мл 0,1 н. раствора серной кислоты, которую добавляют небольшими порциями. Растертый материал количественно переносят в колбу на 100 мл и доводят объем смеси до 75 мл раствором 0,1 н. серной ки-

слоты. Содержимое колбы нагревают в течение 45 мин на кипящей водяной бане при частом помешивании. После охлаждения в колбу прибавляют несколько капель толуола и 5 мл 2,5 М раствора ацетата натрия, содержащего ферментный препарат фосфатазы ($\text{pH} = 4 - 4,5$). Для высвобождения связанного тиамин колбу выдерживают 2 ч в термостате при 40 – 45 °С. После охлаждения содержимое колбы переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки, хорошо перемешивают и фильтруют. Для освобождения от примеси других флюоресцирующих веществ к 50 мл полученного фильтрата добавляют 25 мл изоамилового спирта и встряхивают в течение 2 мин. После расслаивания смеси в делительной воронке спирт отбрасывают. Повторяют эту операцию 2 – 3 раза. Дальнейшую работу ведут с водной вытяжкой. Количество гексациано-(III) феррата калия, необходимое для окисления тиамин, подбирают эмпирически. С этой целью в шесть пробирок с притертыми пробками наливают по 2 мл 30 %-ного раствора гидроксида натрия и по 5 мл полученной водной вытяжки тиамин, добавляя в пять из них окислитель в количестве 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 мл соответственно. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают в течение 2 мин. В некоторых пробирках возникает желтая окраска. Тот объем окислителя, при добавлении которого появляется желтая окраска, не исчезающая в течение последующих 30 с после встряхивания, используют далее при проведении определения тиамин.

В две делительные воронки наливают по 2 мл 30 %-ного раствора гидроксида натрия и в одну из них (опытная проба) – подобранное эмпирически требуемое количество 2 %-ного раствора гексациано-(III) феррата калия, после чего оба раствора тщательно перемешивают. Далее пипеткой в обе воронки быстро вносят по 5 мл исследуемого раствора и содержимое воронок вновь перемешивают. Затем в каждую воронку добавляют по 10 мл изоамилового спирта и в течение 2 мин интенсивно встряхивают. После расслаивания смеси слой воды удаляют, а изоамиловый слой промывают еще 5 мл воды. В воронки добавляют по 2 мл этилового спирта для осветления растворов. Опытную и контрольную смеси вновь встряхивают и измеряют их флюоресценцию. Стандартный раствор тиамин окисляют так же, как и испытуемый, используя для этого 0,05 мл окислителя. Для стандартного раствора находят поправку на флюоресценцию сопутствующих веществ, для чего 1 мл

стандартного раствора тиамин обрабатывают вышеописанным способом без добавления окислителя. Содержание тиамин в исследуемом материале находят по формуле:

$$c = \frac{(A - B) \cdot V}{(A_1 - B_1) \cdot V_1 \cdot a}$$

где c – содержание тиамин (в мкг);

A – показания флюорометра для испытуемого окисленного раствора;

B – показания флюорометра для испытуемого раствора без окисления;

A_1 – показания флюорометра для 1 мкг окисленного тиамин;

B_1 – показания прибора для 1 мкг неокисленного тиамин;

V – общий объем экстракта (в мл);

V_1 – объем экстракта, взятый для определения; a – масса материала (в г) [1].

Литература

1. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие для студентов хим. специальностей. – М.: Просвещение, 1975.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО И ОКИСЛЕННОГО РИБОФЛАВИНА (по Г.Н. Чупахиной, А.С. Гребенникову, Н.С. Лейба)

Распространение. Рибофлавин широко распространен в природе. Он входит в состав растительных и животных клеток. Ряд микроорганизмов обладает способностью к биосинтезу рибофлавина. Среди растительных продуктов большое количество (мг%) рибофлавина содержится в зерновых, являющихся удовлетворительным источником этого витамина: в хлебе «Бородинский» – 0,31, в батоне из муки высшего сорта – 0,07; в картофеле – 0,05, моркови – 0,06, огурцах – 0,04, в цветной капусте – 0,1. Среди тканей животного происхождения наиболее высокое содержание рибофлавина (мг%) в печени – 4,6, почках – 3,6 и сердце – 0,9. Наилучшим источником рибофлавина в питании человека являются молочные продукты. Коровье молоко содержит около 0,2

мг%, творог и сыры – до 0,5 мг% рибофлавина. Довольно много этого витамина в яйцах, особенно богат рибофлавином желток – 0,8 мг%. Рыбные продукты содержат мало рибофлавина – до 0,1 мг%.

Рибофлавин (водорастворимый витамин В₂) входит в состав коферментов-флавинаденинмононуклеотида (ФМН) и флавинаденинди-нуклеотида (ФАД) дыхательных ферментов. В растворах рибофлавин довольно стоек, на скорость его разрушения влияют свет и рН раствора: в щелочной среде рибофлавин разрушается, а в кислой среде устойчив к нагреванию.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр. Фарфоровая ступка. Мерный цилиндр на 100 мл, термоустойчивая колба на 100 мл. Водяная баня, стеклянный фильтр №4. Соляная кислота (0,1 н.); 0,1 н. раствор NaOH (рН = 7). 0,05 н. щелочной раствор железосинеродистого калия; 18 %-ный раствор глюкозы.

Ход анализа. Для определения содержания рибофлавина навеску анализируемого растительного материала (1 г) растирают в фарфоровой ступке с добавлением 15 мл 0,1 н. раствора HCl до гомогенного состояния. Растертую массу количественно переносят в мерный цилиндр на 100 мл и доводят объем смеси 0,1 н. раствором HCl до 75 мл. Затем содержимое мерного цилиндра переносят в термоустойчивую колбу на 100 мл, которую выдерживают на водяной бане в течение 45 мин при частом помешивании. Термическая обработка в кислой среде разрушает пигменты и способствует освобождению рибофлавина. По окончании экспозиции содержимое колбы охлаждают и отфильтровывают с помощью бумажного или стеклянного фильтра №4.

Оптическую плотность раствора определяют спектрофотометрически при 445 нм по отношению к растворителю (0,1 н. раствор HCl). Содержание рибофлавина рассчитывают по калибровочному графику. Таким образом определяется окисленная форма рибофлавина.

Для определения общего содержания рибофлавина проводят окисление его восстановленной формы. Для этого в пробирку с притертой пробкой приливают 5 мл фильтрата и нейтрализуют его 0,1 н. раствором NaOH (рН = 7). Затем добавляют 0,5 мл 0,05 н. щелочного раствора железосинеродистого калия (16,5 г перекристаллизованного $K_3Fe(CN)_6 + 70$ г Na_2CO_3 в литре воды; раствор хранится в темной склянке). Избыток щелочного раствора красной кровяной соли удаляют, добавляя 1,5 мл 18 %-ного раствора глюкозы. Пробирку выдерживают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, после чего содержимое охлаждают и определяют оптическую плотность раствора при 445 нм.

Рассчитывают суммарное содержание восстановленного и окисленного рибофлавина по калибровочному графику. По разнице определяют восстановленный рибофлавин.

Для построения калибровочного графика навеску чистого рибофлавина (20 мг) растворяют в 500 мл дистиллированной воды. Из данного раствора путем разбавления готовят серию стандартных растворов, содержащих от 1,2 до 12 мкг рибофлавина в 1 мл. Оптическую плотность полученных растворов определяют при 445 нм и по результатам спектофотометрирования строят калибровочный график. Количественное содержание рибофлавина выражают в мкг/г растительной ткани [1; 2].

Литература

1. Чупахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум. – Калининград: Изд-во КГУ, 2000.

2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.М., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Колос, 1972. – С. 104 – 106.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА РР ПО РЕАКЦИИ С РОДАНБРОМИДОМ

Распространение. Никотиновая кислота довольно широко распространена в растительных и особенно в животных продуктах. Из растительных продуктов богаче всего сухие пивные дрожжи (40 мг%) и пекарские прессовые дрожжи (28 мг%). Значительное количество никотиновой кислоты содержится в зерновых (мг%): пшеница – 5, рожь – 1,1; из круп – гречка – 4, пшено – 2, рис – 1,6. Очень богаты никотиновой кислотой животные продукты, за исключением яиц (0,2 мг%) и молока (0,1 мг%): баранина – 5,8, говядина – 4, печень – 16, сердце – 8.

Оборудование и реактивы. Фотоэлектроколориметр. Центрифуга. Колба круглодонная на 250 мл с обратным воздушным холодильником. Баня водяная. Воронка Бюхнера с наружным диаметром 130 мм. Колба Бунзена (2 шт.). Колбы мерные на 10, 25, и 100 мл. Пипетки с одной меткой на 1 и 2 мл. Асканит (отбеливающая глина). Соляная кислота (1 н.). Гидроксид натрия (1 н. и 40 %-ный). Безвод-

ный фосфат калия. Ацетат свинца. Этиловый спирт (96 %-ный). Спиртовой фосфатный буфер с $pH = 5,29$ (1:1). Роданбромидный реактив (к 10 мл 0,1 н. раствора роданида калия или роданида аммония прибавляют 1 г кристаллического бромида калия и 1 мл 17 %-ного раствора соляной кислоты; к полученной смеси под тягой приливают 2 мл брома). Спиртовой раствор анилина (свежеперегнаный анилин растворяют в этиловом спирте в соотношении 1:6; хранят в темной склянке). Стандартный вводно-спиртовой (1:1) раствор никотиновой кислоты (10 мг в 1 мл).

Ход анализа. 50 г тонко размолотого сухого растительного материала заливают в круглодонной колбе на 250 мл с обратным воздушным холодильником 100 мл 1 н. раствора соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. По охлаждении прибавляют 40 %-ный раствор щелочи до $pH = 6,5$. К полученной смеси приливают 100 мл этилового спирта и выпавший осадок отделяют фильтрованием. В фильтрат вносят 2 г асканита и после интенсивного встряхивания в течение 5 мин отфильтровывают его на воронке Бюхнера. Осадок на фильтре заливают 20 мл 1 н. раствора гидроксида натрия для элюции никотиновой кислоты. Элюат переносят в центрифужную пробирку, в которую предварительно насыпают 1 г ацетата свинца, и в присутствии фенолфталеина нейтрализуют его прибавлением кристалликов фосфата калия до появления слабо-розовой окраски, после чего разбавленной соляной кислотой (1:1) доводят pH раствора до 6,0. Смесь центрифугируют при 3000 г. Прозрачный супернатант переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем водой до метки; 5 мл приготовленной вышеописанным способом вытяжки нагревают до $70^{\circ}C$, прибавляют 1 мл свежеприготовленного роданбромидного реактива и 2 мл спиртового раствора анилина, перемешивают и количественно переносят в мерную колбу на 10 мл, доводя объем жидкости до метки спиртовым раствором буфера. Оставляют при комнатной температуре на 1,5 ч, после чего фильтруют и желтый фильтрат колориметрируют при 440 нм. Содержание витамина РР рассчитывают по калибровочной кривой, которую строят по результатам колориметрирования серии стандартных растворов, приготовленных из исходного стандартного раствора с содержанием 10 мг никотиновой кислоты в 1 мл. К 5 мл соответствующего стандартного раствора добавляют все указанные выше для испытуемого раствора реактивы в

той же последовательности и по истечении 1,5 ч измеряют интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре [1].

Литература

1. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие для студентов хим. специальностей. – М.: Просвещение, 1975.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ, ДЕГИДРОАСКОРБИНОВОЙ И ДИКЕТОГУЛОНОВОЙ КИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Аскорбиновая кислота (АК) – легкоокисляемое соединение, окисление ее идет до дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК), лактоновое кольцо которой легко гидролизуеться с образованием кислоты с открытой цепью – дикетогулоновой кислоты (ДКГК).

Метод количественного определения данных кислот основан на взаимодействии 2,4-динитрофенилгидразина с ДАК и ДКГК с образованием в серной кислоте соответствующих азазонов. Азазоны ДАК и ДКГК дают красное окрашивание, используемое для фотометрического определения.

Для нахождения содержания всех кислот АК окисляют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до ДАК и содержание восстановленной формы АК определяют по разности этих кислот.

При отдельном определении ДАК и ДКГК смесь подвергают действию восстановителей, при этом восстанавливаться в АК может только ДАК. В.В. Соколовский, Л.В. Лебедева, Т.Б. Лиэлуп [1] в качестве восстановителя предложили использовать унитиол (димер-каптопропансульфонат натрия), что значительно упростило процедуру восстановления. При $pH = 7$ унитиол в течение 10 мин восстанавливает ДАК в АК. Данные авторы описали методику определения АК, ДАК и ДКГК в животных объектах, их метод был несколько видоизменен для анализа растительного материала (Г.Н. Чупахина).

Распространение. Аскорбиновая кислота является одним из наиболее широко распространенных в природе витаминов. Она синтезируется растениями и подавляющим большинством животных, чьи

ткани в общем более бедны витамином С, хотя отдельные органы содержат относительно высокие его концентрации (мг%): печень крупного рогатого скота – 20 – 40, почки – 6 – 25, сердце – 5, молоко коровье – 0,7 – 2,6. С другой стороны, семена и зерна высших растений лишены витамина С, но с первых дней прорастания в них появляется аскорбиновая кислота (до 30 мг%). Богаты витамином С листья, плоды, несколько беднее им корнеплоды (мг%): листья петрушки – 150, корень петрушки – 2 – 5, облепиха – 45 – 194, смородина черная – 70 – 400.

Оборудование и реактивы. 2 %-ный раствор 2,4-инитрофенилгидразина в 9 н. серной кислоте, содержащей 0,25 % тиомочевины. Для приготовления 100 мл реактива рассчитать, какое количество концентрированной серной кислоты необходимо взять с учетом ее концентрации и плотности, чтобы конечный раствор был 9 н. Например, исходный раствор концентрированной серной кислоты 95,6 % и плотность его 1,830. В этом случае необходимо взять 25,2 мл кислоты. В кислоте при нагревании или встряхивании растворить 2 г 2,4-динитрофенилгидразина, а затем 0,25 г тиомочевины. Полученный раствор смешать с нужным объемом воды, наливая кислотный раствор в воду так, чтобы конечный объем равнялся 100 мл. Раствор хранить в холодильнике не более одного месяца. Необходимы также 5 %-ная метафосфорная кислота (хранить в холодильнике не более двух недель), 85 %-ный раствор серной кислоты (в 100 мл дистиллята влить 900 мл концентрированной серной кислоты); $2 \cdot 10^{-3}$ М унитиол (0,84 мл 5 %-ного раствора ампулированного препарата в 100 мл фосфатного буфера 0,2 М, рН = 7) – раствор хранить не более суток; 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса). Хранить в темноте не более одной недели.

Ход анализа. Навеску листьев (около 0,5 г) залить в фарфоровой ступке 10 мл 5 %-ной метафосфорной кислоты, растереть. Гомогенат количественно перенести в мерную колбу на 25 мл, объем довести до метки метафосфорной кислотой; после встряхивания центрифугированием отделить осадок (20 мин при 3000 об/мин).

В две градуированные пробирки с притертыми пробками налить по 1,5 мл полученной вытяжки и в одну из них прибавить по каплям 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 с.

В третью пробирку налить 1,5 мл вытяжки, приготовленной на $2 \cdot 10^{-3}$ М растворе унитиола. Данная вытяжка готовится следующим образом: навеска листьев (около 0,5 г) растирается с раствором унитиола, переносится в мерную колбу на 25 мл, объем доводится до метки раствором унитиола, приготовленным на фосфатном буфере. Содержимое колбы встряхнуть, колбу поместить в холодильник на 10 мин – это время необходимо для восстановления ДАК в АК. Центрифугированием отделить осадок. Белки, находящиеся в вытяжке, осаждаются метафосфорной кислотой: к 16 мл центрифугата прибавить 4 мл 5 %-ной метафосфорной кислоты, выпавшие в осадок белки удалить центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин).

Во все три пробирки прибавить по 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразина и довести объем до 2,5 мл дистиллированной водой. Пробирки поместить в термостат на 20 мин при температуре 100 °С. По истечении указанного времени пробирки перенести в ледяную баню и в каждую из них добавить по 2,5 мл (тремя порциями) серной кислоты.

Через час в кювете окрашенные растворы фотометрируют при длине волны 520 нм на 10 мм по сравнению с контрольным раствором, который готовится и обрабатывается как опытные, только вместо вытяжки используется раствор 5 %-ной метафосфорной кислоты. По калибровочной кривой определяют, какой концентрации кислоты соответствует данная оптическая плотность.

Содержание кислоты X на 1 г навески определяется по формуле:

$$X = \frac{25 \cdot C}{1,5 \cdot n},$$

где C – концентрация раствора кислоты, соответствующая данной оптической плотности, мкг/мл;

n – навеска растительного материала, г;

25 – общий объем исследуемого раствора, мл;

1,5 – объем раствора, взятый для анализа, мл.

Количественное содержание кислот далее рассчитывается следующим образом. В пробирке с экстрактом, полученным с унитиолом, определяется только ДКГК, так как унитиол восстанавливает ДАК в АК, которая с 2,4-динитрофенилгидразином не определяется. В данную величину необходимо ввести поправку на разбавление за

счет использования метафосфорной кислоты для осаждения белков: полученный результат нужно увеличить на 20 %.

В пробирке с кислотным экстрактом определяется ДАК и ДКГК, поэтому, вычитая из данной суммы количество ДКГК, найдем величину ДАК.

В пробирке с кислотным экстрактом, где АК была окислена 2,6-дихлорфенолиндофенолом до ДАК, определяется сумма трех кислот (АК, ДАК и ДКГК). Зная значение ДАК и ДКГК, находим по разности величину АК.

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой готовят три раствора аскорбиновой кислоты в 5 %-ной метафосфорной кислоте:

1-й раствор: 100 мг АК в 250 мл метафосфорной кислоты;

2-й раствор: 0,5 мл 1-го раствора + 9,5 мл метафосфорной кислоты;

3-й раствор: 0,5 мл 2-го раствора + 4,5 мл метафосфорной кислоты.

Определенные объемы 2-го и 3-го растворов (1 мл, 0,75 мл, 0,5 мл, 0,25 мл – 2-го раствора и 1 мл, 0,5 мл – 3-го раствора), содержащие от 20 до 2 мкг АК, доводятся метафосфорной кислотой до 1,5 мл. В качестве контроля берется 1,5 мл кислоты.

Во все пробирки по каплям добавляется 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 с (АК перейдет в ДАК). Затем вносится по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и объем доводится до 2,5 мл дистиллированной водой. Дальше пробы обрабатываются по прописи, данной в разделе «ход анализа».

С использованием показаний оптической плотности для растворов ДАК разной концентрации, полученных с помощью фотоэлектроколориметра, строится калибровочная кривая.

Литература

1. Соколовский В.В., Лебедева Л.В., Лиэлуп Т.Б. О методе отдельного определения АК, ДАК и дикетогулоновой кислот (ДКГК) в биологических тканях // Лабораторное дело. № 3. 1974.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ТИТРА

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в щелочной среде имеет синюю окраску, а в восстановленном состоянии бесцветный [1].

Количественное определение витамина С проводят, титруя исследуемый раствор, подкисленный соляной кислотой, щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Пока в титруемом растворе содержится витамин С, приливаемый щелочной раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола будет обесцвечиваться за счет образования восстановленной формы аскорбиновой кислоты. Как только все количество витамина С, имеющееся в исследуемом растворе, окислится, 2,6-дихлорфенолиндофенол не будет восстанавливаться и титруемый раствор приобретет розовую окраску за счет перехода щелочного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола синего цвета в 2,6-дихлорфенолиндофенол красного цвета в кислой среде.

Зная количество 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование, и его титр, установленный по аскорбиновой кислоте, вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом растворе.

Оборудование и реактивы. Соляная кислота, 2 %-ный раствор. Аскорбиновая кислота, кристаллическая. Серная кислота, 2 %-ный раствор. К₂К, кристаллический. Крахмал, 1 %-ный раствор. К₂О₃, точно 0,001 н. раствор (0,03568 г К₂О₃ растворяют в воде и доводят до 1 л). 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор. Для приготовления этого раствора применяют буферную фосфатную смесь (1/15 М), приготовленную по Серенсену, так как индикатор в водном растворе довольно быстро разрушается. Для этого берут водяные растворы КН₂РО₄ – 9,078 г в 1 л и Na₂НРО₄·2Н₂О – 11,867 г в 1 л. Растворы хранят отдельно. Затем их смешивают в соотношении 2:3, тогда рН = 6,9 ... 7,0. Отвешивают 0,25 г красителя, приливают 700 мл дистиллированной воды, взбалтывают и добавляют 300 мл буферной смеси. На следующий день раствор отфильтровывают и тщательно перемешивают. Определяют титр приготовленного раствора.

Ход анализа. Точную навеску исследуемого материала (сухих ягод шиповника – 1 г, хвои – 1 г, капусты – 5 г, картофеля – 5 г) тщательно растирают в фарфоровой ступке с 4 мл 2 %-ной соляной кислоты, добавив немного измельченного стекла. Затем без потерь пе-

реносят содержимое ступки в мерную колбу на 25 мл, несколько раз смывая ступку водой и сливая ее по стеклянной палочке в ту же колбу, и доводят объем раствора дистиллированной водой до метки. Полученную смесь оставляют на 5 – 10 мин. Содержимое колбы тщательно перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр и фильтрат используют для определения витамина С. Экстракт, полученный из картофеля, не фильтруют.

Для титрования отмеривают в коническую колбочку определенный объем фильтрата (шиповника – 1 мл, хвои – 5 мл, капусты – 5 мл, картофеля – всю полученную смесь без фильтрации), добавляют 4 мл 2%-ного раствора соляной кислоты и титруют из бюретки 0,001н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с. В контрольной пробе вместо вытяжки берется соответствующий объем смеси: 4 мл 2%-ной соляной кислоты и 21 мл воды.

Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола

В мерной колбе на 50 мл растворяют несколько кристалликов (1 – 1,5 мг) аскорбиновой кислоты в 2%-ной серной кислоте и доводят этой же кислотой до метки, тщательно перемешивают. В две конические колбочки берут по 5 мл приготовленного раствора аскорбиновой кислоты и после добавления кристалликов КJ (около 5 – 10 мг) и 5 капель 1%-ного раствора крахмала титруют одну колбочку 2,6-дихлорфенолиндофенолом, другую – точно 0,001 н. раствором КJО₃ (0,03568 г КJО₃ растворяют в воде и доводят до 1 л). Расчет титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте ведут по формуле:

$$T = \frac{0,088 \cdot a}{b},$$

где T – количество мг аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;

0,088 – количество мг аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия;

a – количество мл 0,001 н. раствора йодата калия, израсходованного на титрование раствора аскорбиновой кислоты;

b – количество мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование.

Расчет количества аскорбиновой кислоты в пробе производят по формуле:

$$X = \frac{T \cdot A \cdot B \cdot 100}{B \cdot \Gamma},$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты (мг%);

T – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте, т. е. количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;

A – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл), израсходованное на титрование, за вычетом контроля;

B – количество вытяжки, взятое для титрования (мл);

B – общее количество вытяжки (мл);

Γ – количество вещества, взятое для анализа (г);

100 – количество граммов исследуемого материала, взятое для вычисления процентного содержания.

Литература

1. Сиянова Н.С., Хисамутдинова В.И., Неуструева С.Н. Методическое руководство для практикума по биохимии. – Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1988. – С.90 – 94.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ОКРАШЕННЫХ ОБЪЕКТАХ (По Бекеру)

Принцип метода: 2,5-динитрофенилгидразин с дегидроаскорбиновой кислотой дает соединение, образующее с серной кислотой осадок красного цвета, интенсивность которого измеряют фотометрически.

Оборудование и реактивы. 2%-ная щавелевая кислота ($C_2O_4H_2$). Ацетатный буферный раствор, рН 5,4, который смешивают с 2%-ной щавелевой кислотой в отношении 2:1 и разбавляют водой 1:1. 2,6-дихлорфенолиндофенол – ДИФ (0,2 г растворяют в 1000 см³ воды, сосуд хорошо закрывают и хранят в холодильном шкафу). Уксусноамиловый эфир или хлороформ. 10%-ный раствор тиомочевины в водном спирте 1:1 (раствор неустойчив). 2,4-динитрофенилгидразин – ДФГ (3 г растворяют в 100 см³ 9 н. серной кислоты и фильтруют; устойчив около 4 недель). 85%-ная серная кислота. L-аскорбиновая кислота –

АК (приготавливают стандартный раствор для построения кривой растворением 0,60 г аскорбиновой кислоты в 200 см³ 2%-ного раствора щавелевой кислоты). Центрифуга, объем пробирок 50 и 100 см³. Баня со льдом. Гомогенизатор.

Ход анализа. Растительный материал измельчают под углекислым газом. Затем берут определенную навеску, в которой должно содержаться около 5 мг аскорбиновой кислоты, смешивают со 120 см³ 2%-ной щавелевой кислоты, гомогенизируют (2 мин при 4 тыс. об/мин) и после тщательной промывки стакана и ножа 2%-ной щавелевой кислотой доводят до определенного объема. Экстракт взбалтывают и после центрифугирования берут пипеткой 5 см³ прозрачного раствора в другую центрифужную пробирку, в которую уже заранее налито 12 см³ ДИФ; спустя полминуты добавляют 10 см³ хлороформа и взбалтывают до тех пор, пока лишняя краска не перейдет в органический растворитель, который после центрифугирования удаляют. Из водной фазы пипеткой берут в два стаканчика по 4 см³ жидкости, туда же добавляют 1 см³ ДФГ и каплю раствора тиомочевины; пробу ставят для реакции в термостат на 75 мин при 50 °С. Второй химический стакан обрабатывают точно так же, но без добавления ДФГ. После охлаждения в ледяной бане добавляют еще 5 см³ 85%-ной серной кислоты и спустя час измеряют экстинкцию при 540 нм. Незадолго до этого во второй стакан добавляют 1 см³ ДФГ.

Для построения калибровочной кривой из стандартного раствора, содержащего 30 мкг АК в 1 см³, берут 5 проб. В первую добавляют 1 см³ раствора аскорбиновой кислоты + 4 см³ 2%-ной щавелевой кислоты, что составляет 30 мкг на 5 см³, затем в последующие пробы приливают по 2, 3, 4 и 5 см³ аскорбиновой кислоты и щавелевой кислоты так, чтобы общий объем раствора в каждой пробирке составлял 5 см³. Затем пробы просматривают на фотоэлектроколориметре и строят калибровочный график.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С Р-ВИТАМИННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Важнейшими представителями флавоноидных соединений, обладающих биологической активностью, в связи с чем их относят к витаминам группы Р, являются флаваноны, флавоны и флавонолы. К флавонолам относятся агликоны (квертецин, кемпферол) и глико-

зиды кверцетина (рутин, кверцитрин, изокверцитрин). С флаванонами, флавонами и катехинами генетически связаны антоцианидины и их гликозиды – антоцианы.

Количественное определение рутина

Количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом. 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.

Распространение. Витамин Р содержится в тех же продуктах, что и витамин С. Много его в чае (рутин – 30 – 50 мг%), фруктах и ягодах: яблоках (катехины – 100 – 150 мг%), грушах (катехины – 100 – 200 мг%), черной смородине (антоцианы – 1000 – 1500 мг%), бруснике, клюкве, чернике, сливе, вишне, винограде и др.

Оборудование и реактивы. 0,05 н. раствор перманганата калия, индигокармин, конические колбы на 50 мл (2 шт.), пипетка на 10 мл, бюретка для перманганата калия.

Ход анализа. К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. 10 мл экстракта чая отмеривают в коническую колбу, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина. Титруют 0,05 н. раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски.

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

$$x = \frac{3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100}{10 \cdot 0,1 \cdot 1000},$$

где x – содержание витамина Р (мг%);

A – количество 0,05 н. раствора перманганата калия, пошедшее на титрование (мл);

0,1 – количество сухого вещества, взятого для анализа (г);

10 – количество вытяжки, взятое для титрования (мл);

50 – количество воды, добавленное к сухому веществу для экстракции, т. е. общее количество вытяжки (мл);

100 – общее количество вещества в г для расчета процентного содержания (1000 мкг переводят в мг) [1].

Литература

1. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Медицина, 1974. – С. 99 – 101.

Спектрофотометрическое определение суммы антоциановых пигментов

Антоцианы имеют максимум абсорбции в области 510 – 550 нм. Высокая экстинкция ($2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$) антоцианов при максимуме абсорбции в видимой области в водных растворах с низким значением рН и в спиртах, подкисленных соляной кислотой, позволяет применять абсорбцию антоцианов для их количественного определения [1]. В случае особенно лабильных антоцианов соляную кислоту заменяют на уксусную или щавелевую.

Оборудование и реактивы. 1 %-ный раствор соляной кислоты. Стеклоянный или кварцевый песок. Фарфоровая ступка. Центрифуга. Спектрофотометр.

Ход анализа. Берется навеска свежих листьев 0,2 – 1 г. Навеска растирается в фарфоровой ступке со стеклянным или кварцевым песком и 10 мл 1 %-ного раствора соляной кислоты. Растирание материала в ступке проводится до получения однородной кашицы в течение 5 мин. Далее гомогенат центрифугируют в течение 30 – 45 минут при 4500 об/мин. Содержание суммы антоцианов рассчитывают по формуле с применением удельного показателя поглощения цианидин-3,5-дигликозида в 1 %-ном водном растворе соляной кислоты (453). Поглощение данных пигментов определяют на спектрофотометре при длине волны 510 нм. Для внесения поправки на содержание зеленых пигментов П.В. Масленниковым предложено определять оптическую плотность полученных экстрактов при 657 нм.

$$X = \frac{(D_{510} - \frac{1}{3} D_{657}) \cdot V \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot A \cdot (100 - B)}, \quad (1)$$

где X – концентрация суммы антоцианов (%);

D_{510} – оптическая плотность раствора при длине волны 510 нм;

D_{657} – оптическая плотность раствора при длине волны 657 нм;

V – объем экстракта;

- E* – удельный показатель поглощения цианидин-3,5 дигликозида при длине волны 510 нм в 1 %-ном водном растворе соляной кислоты, равный 453;
- A* – масса сырья;
- B* – потеря в массе при высушивании (%).

Литература

1. Муравьева Д.А., Бубенчикова В.Н., Беликов В.В. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего // Фармакология. -1987. – Т.36. – С. 28 – 29.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА К

Метод основан на способности витамина К в щелочной среде давать с диэтилмалоновым эфиром окрашенное соединение, интенсивность окраски которого определяют колориметрически.

Распространение. Наиболее богатые источники витамина К – зеленые растения, где он содержится в хлоропластах в виде филлохинона. В животных тканях и микроорганизмах присутствуют различные формы витамина К₂. Содержание витамина К различно, особенно богаты им шпинат (4,0 – 6,0 мг%), капуста белокочанная (2,0 мг%) и тыква (4,0 мг%).

Оборудование и реактивы. Фотоэлектроколориметр. Водяная баня. Воронка Бюхнера с наружным диаметром 110 мм. Колба для фильтрования под вакуумом (Бунзена). Ступка фарфоровая с наружным диаметром 110 мм. Колбы мерные на 10 мл (2 шт.). Пипетки градуированные на 1 мл (4 шт.). Кварцевый песок. Диэтиловый эфир. Хлороформ. Карбонат натрия безводный. Сульфат натрия безводный. Диэтилмалоновый эфир (1 %-ный спиртовой). Гидроксид калия (1 %-ный). Стандартный раствор витамина К (0,04 мкг в 1 мл).

Ход анализа. 10 – 15 г измельченной моркови тщательно растирают в ступке с кварцевым песком и небольшим количеством карбоната натрия. Затем в ступку приливают 10 мл диэтилового эфира и вновь растирают. Гомогенат переносят на воронку Бюхнера, дважды ополаскивая ступку небольшими порциями эфира. Фильтруют и трижды промывают осадок на фильтре тем же экстрагентом. Эфирные вытяжки соединяют и сушат безводным сульфатом натрия, после чего

эфир выпаривают на теплой водяной бане, а остаток растворяют в 5 мл хлороформа. К полученному раствору прибавляют 1 мл 1 %-ного спиртового раствора диэтилмалонового эфира и 0,2 мл 1 %-ного раствора гидроксида калия. Общий объем доводят водой в мерной колбе до 10 мл. Одновременно ставят определение со стандартным раствором витамина К. Окрашенный раствор колориметрируют.

Рассчитывают содержание витамина К:

$$c = \frac{E_1 \cdot 0,2 \cdot 100}{E_2 \cdot a},$$

где c – содержание витамина К (мкг%);

a – масса вещества (г);

E_2 – экстинкция стандартного раствора;

E_1 – экстинкция испытуемого раствора [1].

Литература

1. *Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А.* Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие для студентов хим. специальностей. – М.: Просвещение, 1975.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА E

Распространение. Витамин E широко распространен в растительном и животном мире. Он найден в одноклеточных организмах, дрожжах, водорослях. α -токоферол встречается практически во всех животных тканях. Растительные клетки синтезируют витамина E, его концентрация особенно высока в хлоропластах. Содержание витамина E в пшеничной муке и белом хлебе составляет 2,8 – 3,4 мг на 1 кг сырого веса. Такое же содержание в бобах. В картофеле – 1 мг на 1 кг сырого веса. В неочищенных сырых яблоках – 6,4 – 11 мг, после чистки и извлечения сердцевинки – соответственно 6,7 и 3,4 мг; в сливочном масле – 29 мг, в говяжьем жире – 100 мг, в арахисовом масле – 140 мг, в кукурузном масле – 100 – 230 мг на 1 кг сырого веса.

Оборудование и реактивы. Фотоколориметр. Водяная баня. Воронка делительная на 200 мл. Колбы круглодонные на 100 и 250 мл с обратным воздушным холодильником. Колбы мерные на 25 мл (2 шт.). Цилиндры измерительные с носиком на 25 мл (4 шт.). На-

бор пипеток с одной меткой на 1, 2 и 5 мл. Молоко. Гидроксид калия (60 %-ный). Этиловый спирт (96 %-ный). Диэтиловый эфир. Сульфат калия (60 %-ный). Этиловый спирт (96 %-ный). Диэтиловый эфир. Сульфат натрия (прокаленный). Этиловый спирт (абсолютный). Азотная кислота ($d = 1,4$). Серия стандартных спиртовых растворов α -токоферола с возрастающей концентрацией (от 100 до 400 мкг в 1 мл).

Ход анализа. В колбу, снабженную воздушным обратным холодильником, вливают 100 мл молока, 25 мл 60 %-ного раствора гидроксида калия и 20 мл 96 %-ного этилового спирта. Колбу в течение 2 ч нагревают на кипящей водяной бане. Полученный гидролизат охлаждают, разбавляют 20 мл воды и количественно переносят в делительную воронку. Извлечение α -токоферола ведут диэтиловым эфиром, который вносят в делительную воронку в три приема: первая экстракция – 50 мл, две последующих – по 25 мл эфира. Соединенные вместе эфирные вытяжки промывают 3 – 4 раза дистиллированной водой в делительной воронке до полного удаления щелочи (по фенолфталеину) и обрабатывают прокаленным сульфатом натрия (5 – 7 г) до прозрачной жидкости. Экстракт фильтруют в колбу на 100 мл, а осадок на фильтре промывают небольшим количеством эфира, который присоединяют к основному экстракту. Эфир испаряют на водяной бане, а полученный сухой остаток растворяют в 5 мл абсолютного спирта и приливают 1 мл концентрированной азотной кислоты. Присоединяют к колбе обратный холодильник и нагревают ее в течение 3 мин для окисления α -токоферола. В качестве контроля используют абсолютный этиловый спирт, 5 мл которого нагревают так же, как и исследуемый раствор, с 1 мл концентрированной азотной кислоты в течение 3 мин на кипящей водяной бане. Обе колбы охлаждают и оставляют на 15 мин в темноте для развития окраски. Затем опытную и контрольную реакцию смеси переносят количественно в мерные колбы на 25 мл и доводят абсолютным спиртом до метки. Оптическую плотность окрашенного раствора находят на фотоколориметре с синим светофильтром (470 нм) против контроля и по ее величине определяют содержание витамина Е в исходном растворе по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой 5 мл каждого из серии стандартных спиртовых растворов α -токоферола с определенной его концентрацией окисляют 1 мл концентрированной азотной кислоты на кипящей водяной бане в течение 3 мин. Дальнейшие операции идентичны

описанным для контрольной и опытной проб. Полученные величины экстинций окрашенных стандартных растворов откладывают по оси ординат, а соответствующие им количества α -токоферола – по оси абсцисс. Расчет ведут по формуле:

$$c = \frac{x \cdot V \cdot d}{a \cdot 1000},$$

где c – содержание витамина Е в 1 г испытуемого материала (мг);
 x – найденное по калибровочной кривой количество витамина Е в 1 мл раствора (мкг);
 V – общий объем исследованного раствора с учетом всех разведений (мл);
 d – плотность исследованного раствора молока;
 a – масса молока (г);
1000 – коэффициент для перевода микрограммов в миллиграммы [1].

Литература

1. *Петербургский А.В.* Практикум по агрономической химии. – М.: Колос, 1968.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОВИТАМИНА А (КАРОТИНА)

Оборудование и реактивы. Ацетон. Углекислый кальций или углекислый магний. Стекланный или кварцевый песок. Фарфоровая ступка. Пробирки с притертыми пробками. Колба Бунзена. Спектрофотометр.

Ход анализа. Берется навеска свежих листьев 0,2 – 1 г. Навеска растирается в фарфоровой ступке со стекляннм или кварцевым песком (для разрушения клеточных оболочек), добавляется небольшое количество $MgCO_3$ или 1 н. раствора NH_4OH (для нейтрализации клеточного сока) и 5 – 10 мл ацетона. Растирание материала в ступке проводится до получения однородной кашицы в течение 5 мин. При растирании важно использовать достаточное количество ацетона, чтобы предотвратить разрушение пигментов от высыхания на стенках ступки [1]. Затем полученную массу переносят на стекланный пористый фильтр № 3, вставленный в колбу Бунзена с подключенным водо-

струйным насосом. Приливают небольшие порции растворителя, экстрагируют до обесцвечивания материала. Измеряют общий объем вытяжки и переносят в пробирки с притертыми пробками.

Количественное определение проводится на спектрофотометре СФ-46 спектрофотометрическим методом без предварительного разделения в 100 %-ной ацетоновой вытяжке, с последующим расчетом по формуле Хольма. Для расчета концентрации определяется оптическая плотность экстракта при длинах волн 440, 644, 662 нм:

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

Из значений экстинкций при этих 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:

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

где C – концентрация пигмента (мкг/г сухого веса);

C_x – концентрация пигмента (мкг/мл);

V – объем экстракта (мл);

M – масса сырья (г);

n – коэффициент разбавления.

Литература

1. Полевой В.В., Максимова Г.Б. Методы биохимического анализа растений. – Л: Изд-во ЛГУ, 1978.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Для количественного определения фолиевой кислоты используют молоко, из которого ее адсорбируют активированным углем. Затем ее окисляют перманганатом калия, в результате чего от фолиевой кислоты отщепляются парааминобензойная кислота, глутаминовая кислота и птеридин-6-карбоновая кислота (или альдегид), дающая интенсивно-голубую флюоресценцию с максимумом свечения при 470 нм.

Распространение. Фолаты широко распространены в природе. Большинство микроорганизмов, а также низшие и высшие растения

способны синтезировать фолаты. В тканях млекопитающих и птиц фолаты не образуются. В растительных и животных тканях обнаружено незначительное количество птероилмоноглутаминовой кислоты. Основными источниками этого витамина в питании человека являются свежие овощи и зелень (мкг%): салат, шпинат – 48 – 115, капуста – 15 – 30, морковь – 7 – 15, помидоры – 3 – 15, лук. Из продуктов животного происхождения наиболее богаты фолатами печень (220 – 294 мкг%) и почки, яичный желток (3 – 8 мкг%), сыр (8 – 19 мкг%).

Оборудование и реактивы. Флюорометр. Термостат на 40 °С. Водяная баня. Круглодонная колба (Вюрца). Мерная колба на 25 мл; воронка фильтрующая № 2; колбы мерные на 100 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл (2 шт.). Цилиндры измерительные с носиком на 25 и 100 мл (4 шт.). Свежее молоко. Толуол. Уголь активированный. Пенициллиновая пленка – источник протеолитических ферментов (глубинный мицелий *Penicillium* высушивается ацетоном и хранится в склянке с притертой пробкой). Серная кислота (2 %-ная и 15 %-ная). Гидроксид натрия (15 %-ный). Аммиак (3 %-ный) в этиловом спирте (70 %-ном). Перманганат калия (4 %-ный). Пероксид водорода (3 %-ный). Исходный стандартный раствор фолиевой кислоты (20 мг перекристаллизованной фолиевой кислоты растворяют в 100 мл воды, подщелоченной тремя каплями 10 %-ного раствора гидроксида натрия. Раствор хранят в холодильнике, в темной склянке под толуолом. Перед анализом готовят рабочий стандартный раствор фолиевой кислоты, разводя исходный стандартный раствор в 100 раз (в 1 мл рабочего стандартного раствора содержится 2 мкг фолиевой кислоты).

Ход анализа. В колбу наливают 35 мл молока, 45 мл воды и добавляют несколько капель 15 %-ного раствора серной кислоты до pH = 3,5 – 4,0. Содержимое колбы перемешивают, устанавливают обратный воздушный холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Затем жидкость в колбе охлаждают до 32 °С и доводят ее pH до 4,5 – 5,0 15 %-ным раствором гидроксида натрия. Далее в колбу вносят 200 мг пенициллиновой пленки, растворенной в 10 мл воды, 3 капли толуола, хорошо перемешивают содержимое и ферментируют 16 – 18 ч при 38 – 40 °С. Через указанный промежуток времени колбу охлаждают до комнатной температуры, содержимое фильтруют через складчатый фильтр. Оса-

док на фильтре дважды промывают небольшими порциями воды. Объем полученного фильтрата доводят водой до 100 мл. В коническую колбу вносят 50 мл фильтрата, подкисляют его 15 %-ным раствором серной кислоты до $pH = 3$ и всыпают 100 мг активированного угля. Смесь кипятят 5 мин под тягой при помешивании, затем фильтруют через пористый стеклянный фильтр под вакуумом. Колбу Бунзена заменяют и через тот же фильтр 5 раз пропускают нагретый до кипения 3 %-ный раствор аммиака в 70 %-ном спирте для снятия фолиевой кислоты с угля (всего для элюции берут 70 мл жидкости: первый раз – 20 мл, второй и третий – по 15 мл; четвертый и пятый – по 10 мл). Объединенные элюаты перегоняют в колбе Вюрца до объема 10 – 15 мл. Остаток переносят в мерную колбу на 25 мл и подкисляют 2 %-ным раствором серной кислоты до $pH = 3$, после чего по каплям добавляют 4 %-ный раствор перманганата калия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 10 мин. Далее для удаления избытка перманганата калия добавляют по каплям 3 %-ный раствор пероксида водорода и доводят pH до 4,0 – 4,5 15 %-ным раствором гидроксида натрия. Общий объем доводят водой до 25 мл. Жидкость фильтруют и измеряют интенсивность флюоресценции при 470 нм на флюорометре. Параллельно измеряют интенсивность флюоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты, который обрабатывают тем же способом, что и испытуемый раствор (контрольный опыт), и стандартного раствора без обработки. Содержание фолиевой кислоты рассчитывают по формуле:

$$c = \frac{(A - A_1) \cdot b \cdot V \cdot V_1}{A_2 \cdot a \cdot V_0},$$

где c – содержание фолиевой кислоты (мкг/мл);

A – показания флюорометра для испытуемого раствора;

A_1 – показания флюорометра для контрольного раствора;

A_2 – показания флюорометра для стандартного раствора фолиевой кислоты;

b – содержание фолиевой кислоты в 1 мл стандартного раствора;

a – масса молока (г);

V – количество фильтрата, взятого для адсорбции (мл);

V_1 – конечный объем раствора, взятого для определения (мл);

V_0 – объем гидролизата после разбавления водой (мл) [1].

Литература

1. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. Учеб. пособие для студентов хим. специальностей. – М.: Просвещение, 1975.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ

Органические кислоты извлекают из измельченной навески вещества 30-минутным нагреванием ее с дистиллированной водой на водяной бане при 80 °С. Затем в фильтрате путем титрования 0,1-нормальным раствором щелочи устанавливают общее количество кислот. Найденную величину пересчитывают на яблочную кислоту, умножая на коэффициент 0,0067.

Среднюю пробу измельчают на кухонной терке и после тщательного перемешивания отвешивают на теххимических весах в тарированном бюксе или в фарфоровой чашке 25 г мезги. Затем навеску смывают дистиллированной водой в мерную колбу емкостью 250 мл; при этом необходимо избежать потерь материала. Удобнее всего пользоваться специальной колбой с расширенным горлом.

Объем жидкости в колбе доводят примерно до 150 мл. Далее содержимое ее полчаса выдерживают в водяной бане при 80 °С; через каждые 5 мин содержимое колбы взбалтывают для лучшего взаимодействия.

После охлаждения жидкость в колбе доводят до метки дистиллированной водой, взбалтывают и фильтруют через сухой фильтр или вату. Пробу фильтрата в количестве 50 мл пипеткой переносят в стакан или коническую колбу емкостью около 250 мл и титруют 0,1 н. раствором едкого натра и калия.

Так как фильтрат обычно бывает окрашенным, то при титровании не представляется возможности использовать индикаторы. Поэтому конец титрования определяется следующим образом: на синюю лакмусовую бумажку наносят каплю дистиллированной воды и недалеко от нее – каплю раствора из колбы для титрования. Если лакмусовая бумага не окрасится в красный цвет от капли фильтрата, титрование считается законченным. Практически титрование считается законченным, когда не бывает заметного различия в окраске обеих капель (воды и испытуемого раствора).

Если раствор не окрашен, то титрование можно вести в присутствии смешанного индикатора (по одному объему 0,1 %-ных спиртовых растворов нейтрального красного и метиленового синего). При $pH = 7$ этот индикатор дает фиолетово-синее окрашивание титруемого раствора, а в щелочной среде окраска переходит в зеленую.

Умножив количество израсходованной щелочи на поправку к ее титру и на коэффициент 0,0067, найдем содержание растворимых кислот (в пересчете на яблочную) во взятой навеске вещества. Для выражения кислотности в процентах полученный результат необходимо умножить на 20 (чтобы перейти от 50 мл фильтрата, соответствующих 5 г материала, к 1000 мл раствора, эквивалентным 100 г исследуемого вещества) [1].

Литература

1. *Петербургский А.В.* Практикум по агрономической химии. – М.: Колос, 1968.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУХОГО ВЕЩЕСТВА В СВЕЖЕМ РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Берут широкий бюкс, в который помещают около 5 г чистого песка и стеклянную палочку (расположенную в бюксе по диагонали и не мешающую закрывать его крышкой). Бюкс вместе с содержимым доводят до постоянного веса при температуре $100 - 105^\circ$. Из отобранной аналитической пробы навеску вещества 6 – 7 г помещают в этот бюкс и взвешивают на аналитических весах. Для предварительной сушки материала бюкс со снятой крышкой помещают в сушильный шкаф с хорошей вентиляцией и выдерживают при температуре $20 - 60^\circ$ в течение 4 ч.

Подсушивание ведут до тех пор, пока при легком надавливании стеклянной палочкой можно установить, что вещество в бюксе стало хрупким. После этого навеску в бюксе продолжают сушить при температуре $100 - 105^\circ C$ еще 3 – 4 ч. Затем следует охлаждение в эксикаторе и взвешивание. Высушивание в течение 2 ч и взвешивание повторяют до тех пор, пока разница между двумя последними весами станет меньше 0,0003 г. Содержание сухого вещества и процент влаги вычисляют по формуле:

$$e = \frac{(a - b) \cdot 100}{(v - b)},$$

где e – процент сухого вещества;

a – масса бюкса с навеской после высушивания (г);

b – масса бюкса без навески (г);

v – вес бюкса с исходной навеской до высушивания (г).

Зная процент сухого вещества во взятой навеске, легко вычислить процент гигроскопической влаги (y):

$$y = 100 - e.$$

В эксикаторе через 20 – 30 мин бюкс закрывают и взвешивают. Эксикаторы содержат концентрированную серную кислоту или безводный хлористый кальций, которые поглощают пары воды из атмосферы, что, следовательно, исключает поглощение паров воды веществом в бюксах при их остывании.

Добавление в стаканчик песка, с которым навеска перед высушиванием основательно перемешивается стеклянной палочкой, делает ее более рыхлой и ускоряет высушивание. При отсутствии этой необходимой рыхлости на поверхности навески образуется плотная корка, а внутри вещество остается сырым. Невозможно получить точный результат, если вещество высушивается при несколько более высокой температуре, чем 105 °С, так как это ведет к увеличению веса навески вследствие окисления присоединившимся кислородом. Прибавление в весе будет маскировать окончание высушивания. При резком повышении температуры сверх 105 °С начнется обугливание вещества и потеря веса. Высушивание легко разлагающегося вещества нельзя вести даже при температуре 105 °С; это вызывает потерю углекислого газа, аммиака и других летучих соединений, которые также будут маскировать окончание высушивания; в этом случае убыль в весе ошибочно можно отнести за счет влаги, а не за счет разложения вещества. Подобные материалы необходимо сушить в вакууме [1].

Литература

1. *Петербургский А.В.* Практикум по агрономической химии. – М.: Колос, 1968.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные физиологических опытов получают в результате повторных измерений и подвергают статистическому анализу. Задача вариационной статистики состоит в оценке достоверности данных, полученных в результате отдельных наблюдений. Исходя из поставленных перед опытом требований точности, с помощью вариационных методов статистики можно определить требуемую повторность в опыте. Имея некоторую выборку, необходимо произвести следующие первичные вычисления [1]:

1. Средняя арифметическая выборки:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{x=1}^n x_i}{n},$$

где $\sum_{x=1}^n x_i$ – сумма вариантов выборки;

n – количество вариантов.

Среднее арифметическое выборки – это наиболее часто применяемый статистический показатель.

2. Для характеристики степени отклонения от среднего значения отдельных вариантов совокупности используют **среднее квадратичное отклонение (σ)** или **стандартное отклонение (s)**. По этим показателям можно и предсказать распределение значений вокруг среднего, и ответить на вопрос, достоверна ли разница между двумя группами данных.

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}},$$

где $\sum (x_i - \bar{X})^2$ – сумма квадратов отклонений отдельных вариантов от средней арифметической;

n – число вариантов;

$\sum x_i^2$ – сумма квадратов вариантов;

$(\sum x_i)^2$ – квадрат суммы вариантов.

Стандартное отклонение (s) совокупности данных служит мерой отличия этих данных от среднего арифметического. Для его подсчета используют выражение:

$$s = \sqrt{\frac{\sum fx^2}{\sum f} - \bar{x}^2},$$

где \sum – сумма;

f – частота;

x – отдельные значения и \bar{x} – среднее.

Например, в выборке из десяти раковин блюдечка (*Patella vulgaris*), отобранных на скалистом берегу и имеющих диаметры следующих размеров: 36, 34, 41, 39, 37, 43, 36, 37, 41, 39 мм, чтобы определить среднее максимальное значение диаметра и стандартное отклонение, необходимо вычислить f, fx^2 и \bar{x}^2 .

x	f	fx^2	\bar{x}^2
34	1	34	1156
36	2	72	2592
37	2	74	2738
39	2	78	3042
41	2	82	3362
43	1	43	1849
$\sum f = 10$	$\sum fx = 383$		$\sum fx^2 = 14739$

Следовательно, $\bar{x} = 38,3$; $\bar{x}^2 = 1466,9$, так как $s = \sqrt{\frac{\sum fx^2}{\sum f} - \bar{x}^2}$

$$= \sqrt{\frac{14739}{10} - 1466,9} = \sqrt{1473,9 - 1466,9} = \sqrt{7} = 2,65.$$

3. **Дисперсия** – квадрат стандартного отклонения (s^2). Дисперсия совокупности значений подсчитывается по следующей формуле:

$$(s^2) = \frac{\sum fx^2}{\sum f} - \bar{x}^2,$$

где f – число значений в совокупности

Дисперсию обычно подсчитывают в экологических исследованиях, включающих изучение питания, размножения и поведения, по-

сколькo она служит показателем распределения организмов внутри популяции.

4. Корреляция. Связь между двумя переменными x и y можно обозначить термином «корреляция». Между этими переменными могут существовать различные степени корреляции. Ее значимость можно представить с помощью статистического критерия, называемого коэффициентом корреляции. Его величина может изменяться от -1 до $+1$, что указывает на прямую (положительную) или обратную (отрицательную) зависимость между переменными x и y . Под прямой, или положительной, связью понимают такие случаи, когда увеличение одного признака влечет за собой увеличение другого. При обратной, или отрицательной, связи увеличение одного признака сопровождается уменьшением величины другого. Если величины x и y распределяются независимо друг от друга, то коэффициент корреляции равен нулю. При увеличении сопряженности между варьирующими величинами коэффициент корреляции приближается к единице, $r = 1$ означает уже не коррелятивную, а функциональную связь. Условно можно считать, что величина r от $0,1$ до $0,5$ указывает на слабую связь между признаками, которые в большей мере варьируют независимо друг от друга; значение r от $0,5$ до $0,7$ дает представление о средней степени сопряженности, и r от $0,7$ и выше свидетельствует о наличии довольно сильной связи между переменными x и y [2].

Литература

1. Полевой В.В., Максимова Г.Б. Методы биохимического анализа растений. – Л: Изд-во ЛГУ, 1978.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1968.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ МЕТОДОМ ПОПАРНЫХ СРАВНЕНИЙ

В физиологических и биохимических исследованиях встречаются случаи, когда, несмотря на несоответствие сравниваемых выборок нормальному распределению, они могут быть обработаны по параметрам нормального распределения или распределения Стьюдента благодаря возможности сопоставления пар измерений [1].

Для примера приводится статистическая обработка данных опытов по изучению действия винной кислоты на биосинтез витамина С в проростках ячменя (табл. 1). Взяты варианты: листья ячменя, находящиеся на растворе винной кислоты (x_1), и контрольные листья (x_2):

Таблица 1

Уровень витамина С в листьях ячменя, мкг/г

На растворе винной кислоты	Контроль	d	d^2	Σd^2
114,7	99,7	15,0	225,0	4686,0
132,9	100,1	31,8	1011,2	
140,6	114,4	26,2	686,4	
129,6	102,5	27,1	734,4	
120,5	86,9	33,6	1129,0	
120,5	90,5	30,0	900,0	

$$X_1 = 126,5; \quad X_2 = 99,0; \quad D = 27,5; \quad D^2 = 756,25;$$

d – разница между парными значениями сравниваемых величин;

D – разница между средними арифметическими сравниваемых совокупностей.

Средняя квадратичная ошибка различий, наблюдаемых между парными вариантами:

$$m_d = \sqrt{\frac{\left(\frac{\Sigma d^2}{n} - D^2\right)}{(n-1)}} = \sqrt{\frac{\left(\frac{4686,0}{6} - 756,2\right)}{(6-1)}} = \sqrt{4,96} = 2,22.$$

Критерий достоверности:

$$t = \frac{D}{m_d} = \frac{27,5}{2,22} = 12,39.$$

Для уровня значимости $P=0,05$ и числа степеней свободы $n=5$ табличное значение критерия достоверности $t=2,57$ (табл. 2). Полученное в опыте $t=12,39$ значительно больше табличного – значит, существующие различия между этими двумя вариантами опыта достоверны.

**Значения t при разных уровнях значимости P
и числах степеней свободы ($n-1$)**

Число степеней свободы ($n-1$)	Уровень значимости (P)			
	0,1	0,05	0,02	0,01
1	6,314	12,706	31,821	63,657
2	2,920	4,303	6,965	9,925
3	2,353	3,182	4,541	5,841
4	2,132	2,776	3,747	4,604
5	2,015	2,571	3,365	4,032
6	1,943	2,447	3,143	3,707
7	1,895	2,365	2,998	3,499
8	1,860	2,306	2,896	3,355
9	1,833	2,262	2,821	3,250
10	1,812	2,228	2,764	3,169
11	1,796	2,201	2,718	3,106
12	1,782	2,179	2,681	3,055
13	1,771	2,160	2,650	3,012
14	1,761	2,145	2,624	2,977
15	1,753	2,131	2,602	2,947
16	1,746	2,120	2,583	2,921
17	1,740	2,110	2,567	2,898
18	1,734	2,101	2,552	2,878
19	1,729	2,093	2,539	2,861
20	1,725	2,086	2,528	2,845
21	1,721	2,080	2,518	2,831
22	1,717	2,074	2,508	2,819
23	1,714	2,069	2,500	2,807
24	1,714	2,064	2,492	2,797
25	1,708	2,060	2,485	2,787
26	1,706	2,056	2,479	2,779
27	1,703	2,052	2,473	2,771
28	1,701	2,048	2,467	2,763
29	1,699	2,045	2,462	2,756
30	1,697	2,042	2,457	2,750
~	1,645	1,960	2,326	2,576

Литература

1. Чупахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений. Практикум: – Калининград: Изд-во КГУ, 2000.

Учебное издание

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВИТАМИНОВ

Практикум

Составители

Галина Николаевна Чупахина
Павел Владимирович Масленников

Редактор Л.Г. Ванцева. Корректор Е.В. Владимирова
Оригинал-макет подготовлен И.В. Осадчей

Подписано в печать 15.11.2004 г.

Бумага для множительных аппаратов. Ризограф. Формат 60×90¹/₁₆.
Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 2,3. Уч.-изд. л. 1,9. Тираж 100 экз. Заказ .

Издательство Калининградского государственного университета,
236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14