

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского**

**И.В. Стручкова,
Е.А. Кальясова
Ю.В. Сеницына**

**РИБОФЛАВИН И АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА:
ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ, КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ
АНАЛИЗ**

Электронное учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией Института биологии и биомедицины для студентов
ННГУ, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»
профилю подготовки «Биохимия»

Нижегород
2017

УДК 543
ББК 28.072
С 87

С 87 Стручкова И.В., Кальясова Е.А., Сеницына Ю.В. РИБОФЛАВИН И АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА: ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ, КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2017. - 25 с.

Рецензент: доц., к.б.н.

И.В. Балалаева

В настоящем пособии изложены теоретические основы и базовые методики проведения качественного и количественного анализа рибофлавина и аскорбата.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов старших курсов естественно-научных и медицинских специальностей. Представленные лабораторные работы могут выполняться как индивидуально, так и в малых группах. Пособие может быть использовано в процессе обучения для формирования умений и навыков работы на современной аппаратуре и оборудовании при выполнении научно-исследовательских работ в области биохимии.

Ответственный за выпуск:
председатель методической комиссии Института биологии и биомедицины
ННГУ,
к.б.н, **Е.Л. Воденеева**

УДК 543
ББК 28.072

© Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, 2017
© Стручкова И.В., Кальясова Е.А., Сеницына Ю.В.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	3
ВВЕДЕНИЕ	4
АСКОРБАТ И РИБОФЛАВИН - ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПУТИ СИНТЕЗА В ОРГАНИЗМЕ.....	6
Рибофлавин. Краткая характеристика, физиологическая роль, биосинтез.....	6
Витамин С. Краткая характеристика, физиологическая роль, биосинтез.....	8
КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА.....	11
Лабораторная работа №1. Качественное определение содержания рибофлавина.....	11
Лабораторная работа №2. Флуориметрическое определение содержания рибофлавина.....	13
КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБАТА	16
Лабораторная работа №3. Количественное определение аскорбата в плодах и овощах.....	16
Приложение 1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	21
ЛИТЕРАТУРА.....	25

ВВЕДЕНИЕ

Потребность в определении содержания витаминов существует в различных областях человеческой деятельности: при определении полноценности диеты или качества витаминсодержащих препаратов и БАДов, выявлении причин ряда заболеваний человека, контроля за составом питательных сред в некоторых биотехнологических производствах. Необходимость определения содержания витаминов закреплена в государственных стандартах (ГОСТ) оценки качества продуктов питания, кормов, лекарственных препаратов (например, ГОСТ 29139-91 Мука, хлеб и хлебобулочные изделия пшеничные витаминизированные. Метод определения витамина В₂ (рибофлавина); ГОСТ 30627.6-98 Продукты молочные для детского питания. Методы измерений массовой доли витамина В₂ (рибофлавина); ГОСТ 7047-55 Витамины А, С, Д, В₁, В₂ и РР. Отбор проб, методы определения витаминов и испытания качества витаминных препаратов; ГОСТ 24556-89 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С).

Витамины – это низкомолекулярные органические соединения-биорегуляторы, необходимые в небольших количествах для нормальной жизнедеятельности, но не синтезируемые организмом человека. Их отличительные признаки:

- 1) низкомолекулярные;
- 2) не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей;
- 3) не входят в структуру тканей и не используются как источник энергии;
- 4) необходимы в малых количествах для нормального протекания биохимических и физиологических процессов.

Витаминоподобными веществами называют соединения, которые частично синтезируются в организме и могут входить в структуру тканей (оротовая кислота, пангамовая кислота, липоевая кислота, метилметионин, эссенциальные полиненасыщенные жирные кислоты).

Высокая биологическая активность витаминов делает их регулярное употребление необходимым условием сбалансированного питания. Отсутствие витаминов в пище приводит к тяжелым специфическим заболеваниям. Основными источниками витаминов являются продукты питания животного и растительного происхождения.

Витамины усваиваются только в растворенном виде и по способности растворяться делятся на водо- и жирорастворимые. К **водорастворимым** относятся аскорбиновая кислота (витамин С), витамины группы В, биотин (Н), инозит (I), биофлавоноиды (Р); к **жирорастворимым** – ретинол (А), кальциферол (D), токоферол (Е), филлохинон (К).

Поскольку различные витамины сильно отличаются по химическому строению, единого метода их определения не существует. В целом, все методы анализа содержания витаминов можно разделить на три основные группы:

1. Основанные на специфических биологических свойствах витаминов (ферментативные методы, микробиологические и пр.).

2. Использующие физико-химические характеристики исследуемых соединений (флуоресцентные, хроматографические и спектрофотометрические методы).

3. Использующие цветные качественные реакции на некоторые витамины.

Пособие может быть использовано в процессе обучения для формирования умений и навыков работы на современной аппаратуре и оборудовании при выполнении научно-исследовательских работ в области биохимии. Лабораторные работы могут выполняться как индивидуально, так и в малых группах. Выполнение работ способствует формированию компетенций ОК-6 и ПК-1 у студентов, обучающихся по программе бакалавриата по направлению 06.03.01 "Биология".

АСКОРБАТ И РИБОФЛАВИН - ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПУТИ СИНТЕЗА В ОРГАНИЗМЕ

Рибофлавин. Краткая характеристика, физиологическая роль, биосинтез

Рибофлавин (витамин В₂) – водорастворимое соединение флавиновой природы. Флавинами (*flavus* – желтый) называют производные гетероциклического соединения 7,8-диметилизоаллоксазина. В рибофлавине 7,8-диметилизоаллоксазин связан с сахароспиртом рибитом. Витаминной активностью обладают многие естественные и синтетические производные 7,8-диметилизоаллоксазина. Кроме рибофлавина, в природных источниках содержатся его коферментные производные – ФМН и ФАД (рис.1). Именно в виде флавиновых коферментов рибофлавин входит в состав целого ряда важнейших ферментов, участвующих в тканевом дыхании, синтезе и усвоении белков, окислении углеводов, жиров у любых живых организмов. Среди таких ферментов – глюкозооксидаза, сукцинатдегидрогеназа, моноаминоксидазы, оксидазы D- и L-аминокислот и др. Отсутствие или недостаток витамина приводят к невозможности синтеза и, следовательно, функционирования этих ферментов.

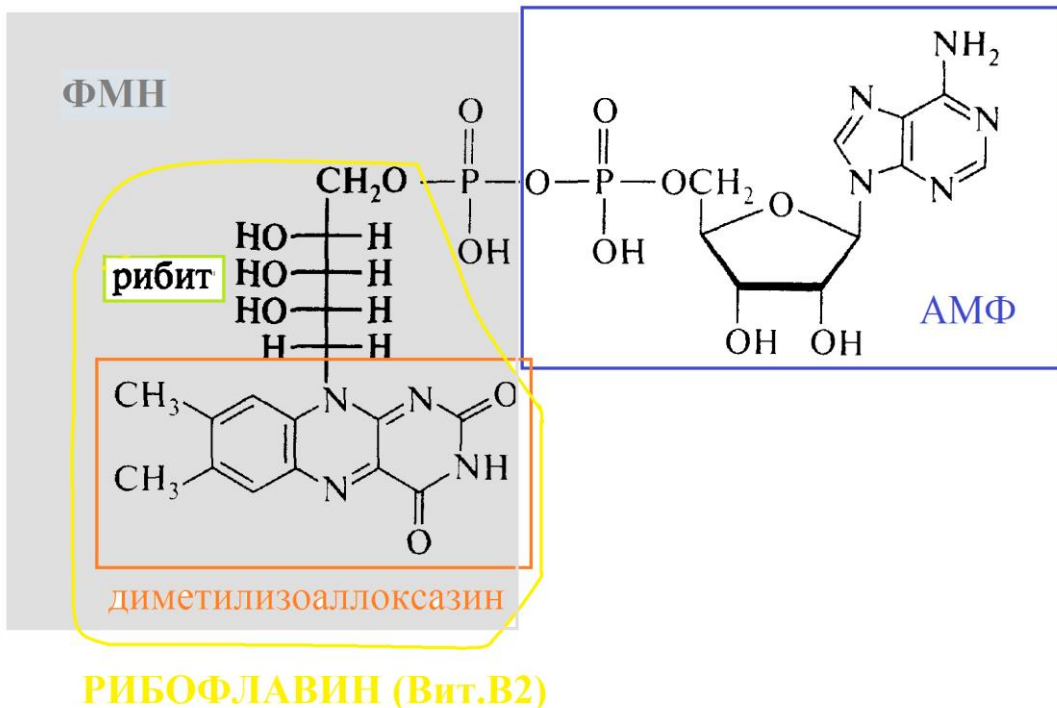


Рис. 1 Структура рибофлавина (желтый контур), ФМН (серый фон), ФАД (вся молекула в целом).

Рибофлавин синтезируется растениями, эубактериями, археями, грибами. Путь биосинтеза рибофлавина и его производных представлен на рис. 2. Он начинается с модификации ГТФ. В первой реакции от ГТФ отщепляются муравьиная кислота и пирофосфат. Получившийся продукт дезаминируется и восстанавливается разными путями: у растений и эубактерий - с участием ферментов 2,5-диамино-6-рибозиламино-4-пиримидинон-5'-фосфат-дезаминазы (II) и 5-амино-6-рибозиламино-2,4-пиримидиндион-5'-фосфатдезаминазы (III); у грибов и архей - 2,5-диамино-6-рибозиламино-4-пиримидинон-5'-фосфат-редуктазы (IV) и 2,5-диамино-6-рибитиламино-4-пиримидиндион-5'-фосфат-

дезаминазы (V). К получившемуся продукту последовательно присоединяется два четырехуглеродных остатка - производных рибозы. В результате образуется рибофлавин и, при его дальнейшем фосфорилировании и аденилировании - ФМН и ФАД.

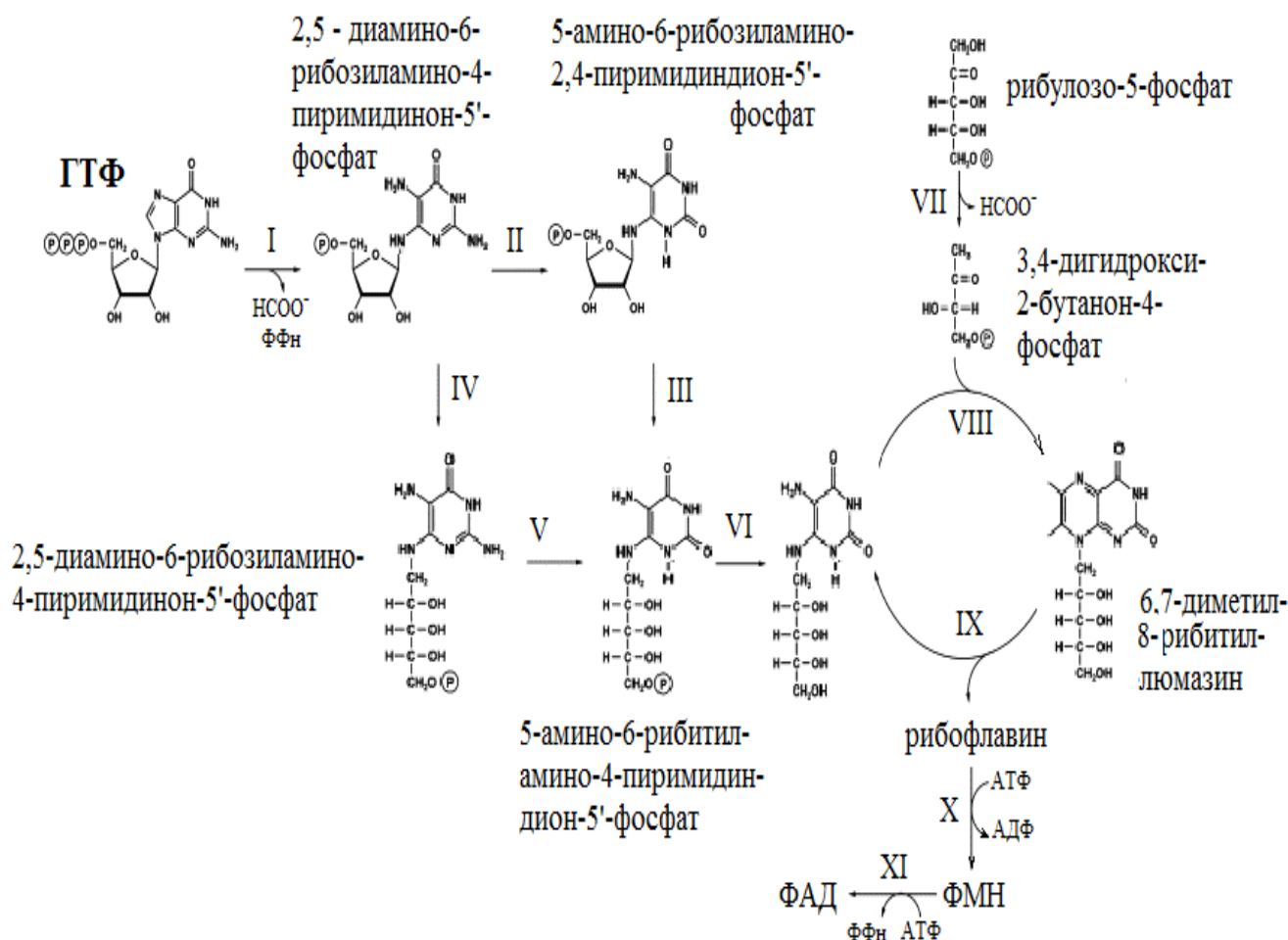


Рис. 2 Синтез рибофлавина и флавиновых коэнзимов у растений, грибов, эубактерий и архей.

Ферменты синтеза:

I - ГТФ-циклогидролаза;

II - 2,5-диамино-6-рибозиламино-4-пиримидинон-5'-фосфат деаминаза;

III - 5-амино-6-рибозиламино-2,4-пиримидиндион-5'-фосфат деаминаза;

IV - 2,5-диамино-6-рибозиламино-4-пиримидинон-5'-фосфат редуктаза;

V - 2,5-диамино-6-рибитиламино-4-пиримидинон-5'-фосфат деаминаза;

VI - гипотетическая фосфатаза;

VII - 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза;

VIII - 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин синтаза;

IX - рибофлавинсинтаза;

X - рибофлавинкиназа;

XI - ФАД-синтаза.

Животные и человек не способны к синтезу рибофлавина и должны получать его с пищей. Ферменты рибофлавин-киназа (X) и ФАД-синтаза (XI) у животных и человека имеются, поэтому эти организмы способны самостоятельно превращать полученный с пищей рибофлавин в его коферментные производные.

Суточная потребность человека 2-2,5 мг. Рибофлавин улучшает функцию печени, остроту восприятия цвета, особенно в сочетании с витамином А, повышает содержание соляной кислоты в желудочном соке, стимулирует заживление ран и ожогов. При недостатке рибофлавина в уголках рта появляются трещины (рис. 3), язык становится ярко-красным (специфическое воспаление *глоссит*), развивается светобоязнь, слезотечение, изменения в структуре глаза (кератит и др.), выпадают волосы, изъязвляются ногти, замедляется рост. В значительных количествах рибофлавин содержится в печени, почках, сырах, сметане. Особенно много этого витамина в молочной сыворотке, твороге, яичном желтке, бобовых растениях, моркови, грушах, персиках, в пекарских дрожжах.



Рис. 3 Трещины и воспаление на губах при недостатке рибофлавина

Витамин С. Краткая характеристика, физиологическая роль, биосинтез

Аскорбиновая кислота - это органическая кислота с антиоксидантными свойствами. Только L-энантиомер аскорбата (гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты) обладает свойствами витамина и известен как витамин С. D-энантиомер является авитамином.

Основная функция аскорбата у растений, животных и других организмов – восстановление многих видов свободных радикалов и минимизация разрушения окислительного стресса. Антиоксидантные свойства аскорбата основаны на существовании одноэлектронных циклических переходов между его дигидро-, монодегидро- и дегидроаскорбатными формами (рис.4).

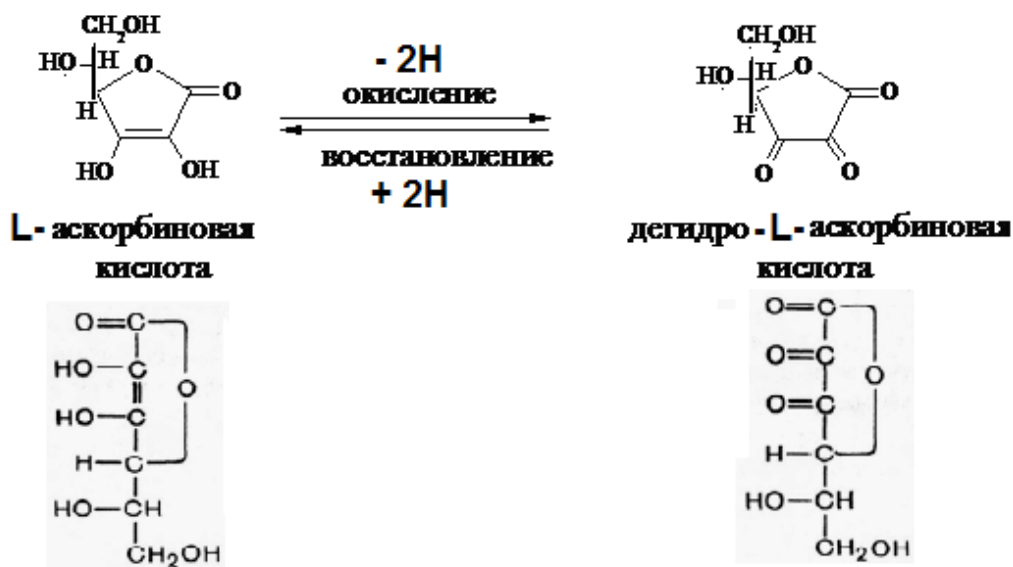


Рис. 4 Окислительно-восстановительные превращения L-аскорбата

Синтез витамина С возможен у представителей всех царств живых организмов. Он реализуется в цитозоле из D-глюкозы и протекает разными путями у растений и животных (рис. 5).

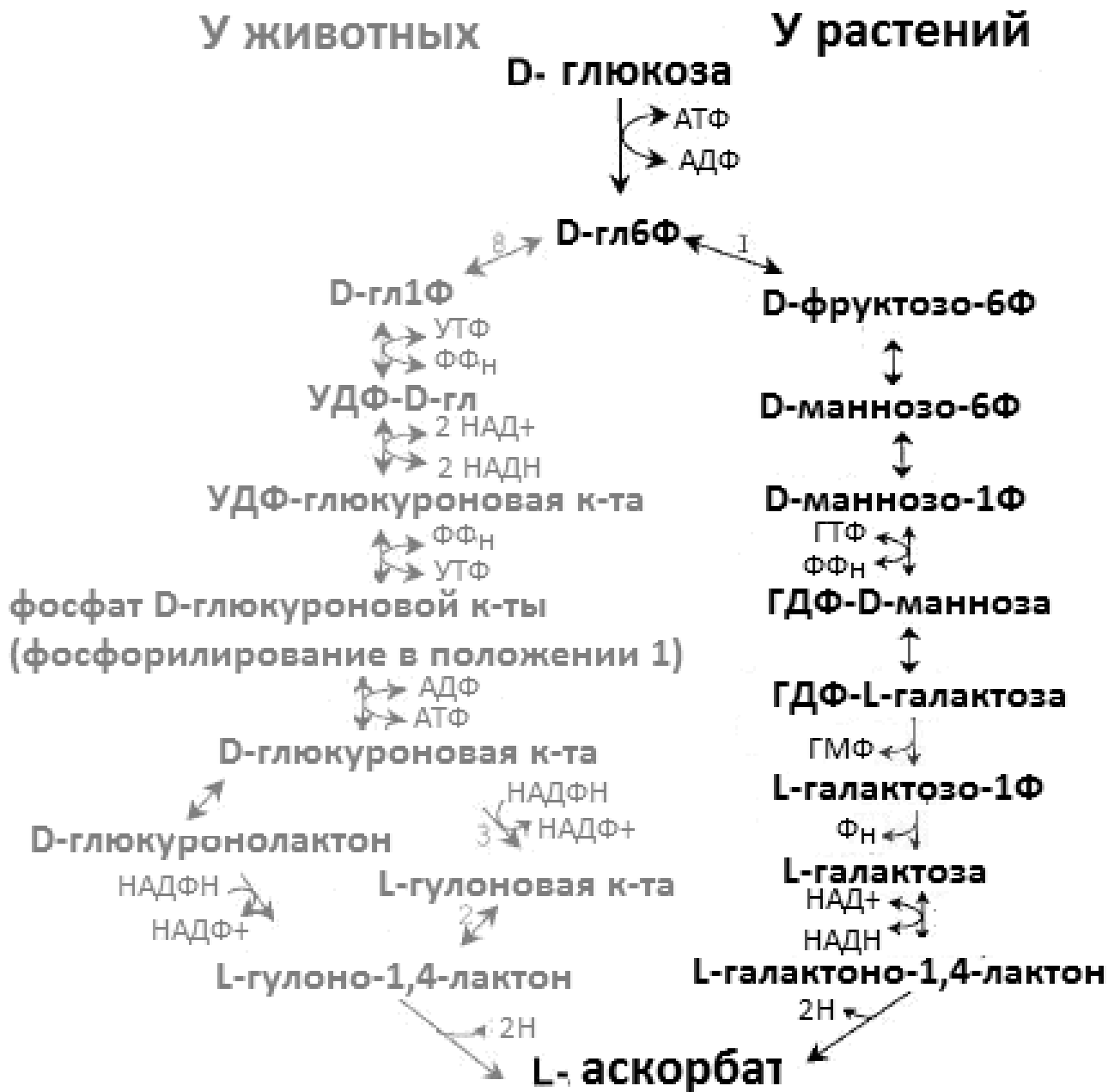


Рис. 5 Пути синтеза L-аскорбата у растений и животных

Синтез витамина С в растениях реализуется через цепь последовательных изомеризаций углеводов: D-глюкоза→D-фруктоза→D-манноза→L-галактоза при непосредственном участии фосфатов и нуклеотиддифосфатсахаров (ГДФ-углеводов). Дальнейшее двухэтапное окисление L-галактозы завершается образованием L-аскорбата. В последней реакции участвует фермент L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа, использующий в качестве акцептора электронов цитохром С (цит С). Подробная схема реакций “растительного” пути синтеза витамина С приведена на рис. 6.

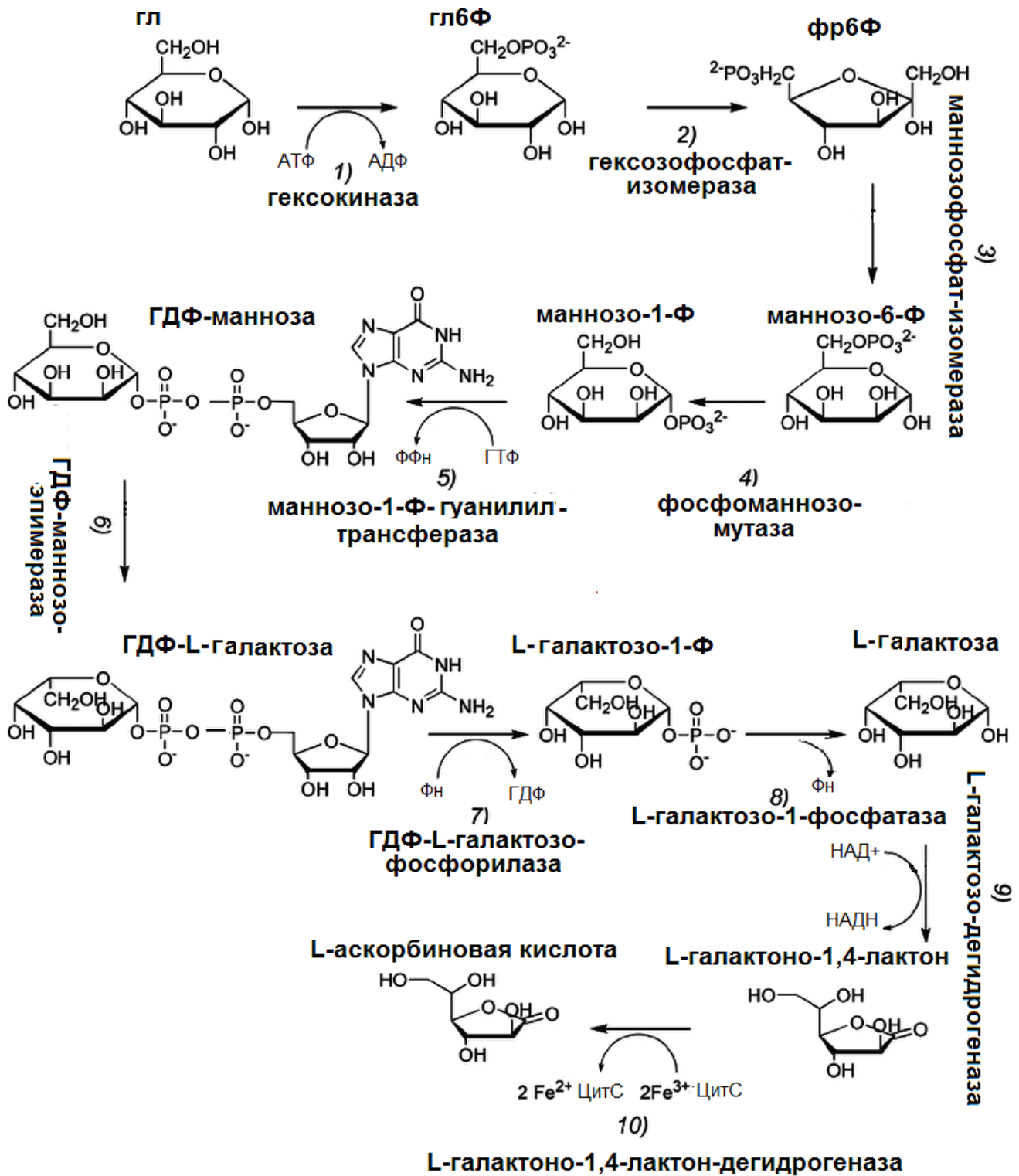


Рис. 6 Реакции синтеза витамина С в клетках растений

В пути синтеза витамина С у животных *глюкоза не изомеризуется, а проходит ряд окислений до гулонолактона* (рис. 7). Кроме того, в качестве нуклеозиддифосфатсахара выступает УДФ-глюкоза.

Человек, высшие приматы, морские свинки и фруктоядные летучие мыши не синтезируют аскорбат и должны обязательно получать его с пищей. В процессе эволюции они утратили способность к синтезу L-аскорбат из-за мутации в гене, кодирующем фермент финальной стадии синтеза витамина С – L-гулонолактонооксидазы. Мутация не летальна, пока все перечисленные виды животных в достаточном количестве получают витамин С с растительной пищей. У человека

витамин С необходим в качестве кофермента для ферментативного синтеза оксипролина и оксилизина, входящих в состав коллагена – основного компонента соединительных тканей. Кроме того, аскорбат принимает участие в процессах синтеза норадреналина, превращениях кортикостероидов и трансферрина, липидном обмене. При недостатке витамина С наблюдаются общие симптомы повышенной утомляемости, возрастает восприимчивость к инфекциям, снижается аппетит, повышенная ломкость капилляров (возникновение кровоизлияний), болезненность и разрыхленность десен. При длительном недостатке аскорбиновой кислоты развивается *цинга*. Суточную потребность человека в витамине С оценивают в 70-120 мг.

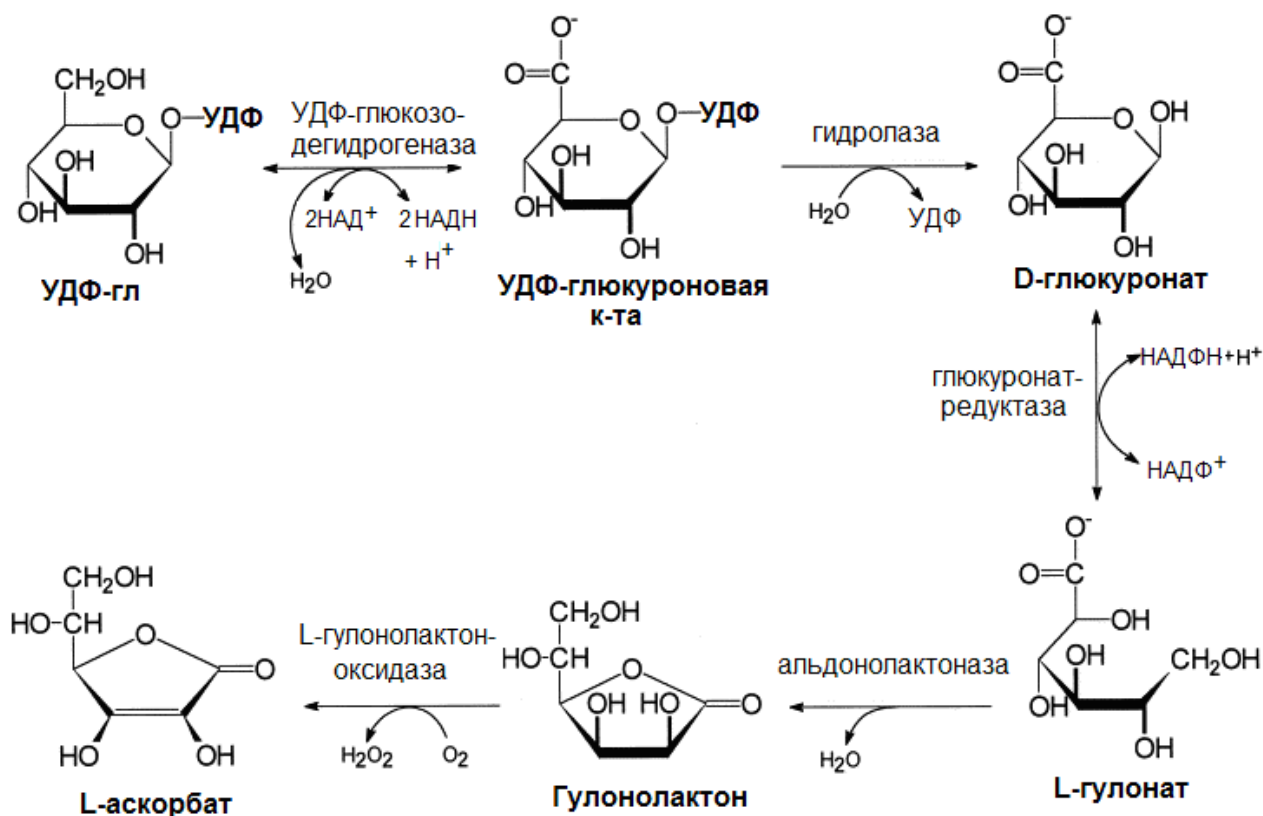


Рис. 7 Реакции синтеза витамина С у животных

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА

Лабораторная работа №1. Качественное определение содержания рибофлавина

Цель работы: определить наличие рибофлавина в растворе.

Теоретическая часть

Наличие рибофлавина можно выявить по реакции с металлическим цинком в кислой среде: исходная желтая окраска раствора будет меняться на красную и затем на бесцветную, а раствор будет бурлить из-за выделяющихся пузырьков водорода (рис.8). Выделяющийся водород восстанавливает желтый рибофлавин через родофлавин (красного цвета) в бесцветный лейкофлавин. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкосоединение вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

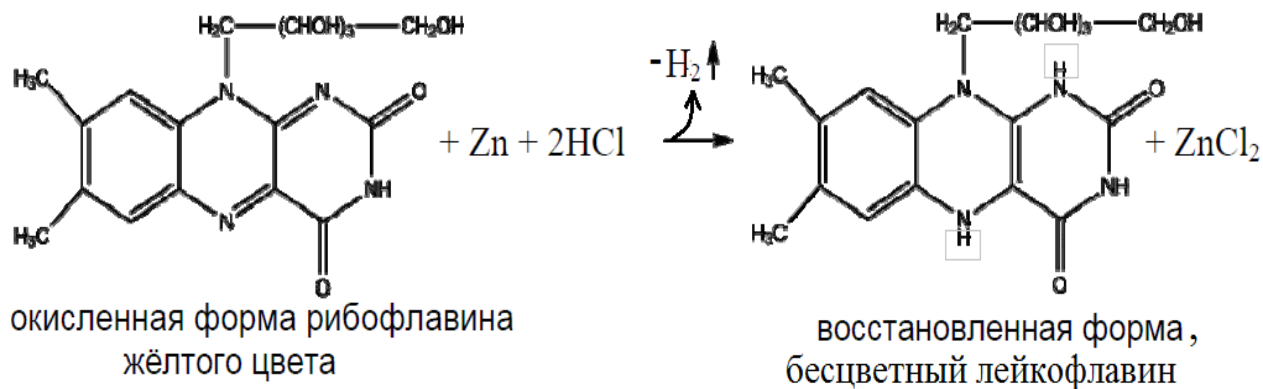


Рис. 8 Реакция восстановления рибофлавина цинком

Реактивы и оборудование

1. Рибофлавин (сухой порошок).
2. Растворы-“задачи”.
3. Коммерческие препараты, содержащие рибофлавин.
4. Металлический цинк (в виде стружки или таблеток).
5. Концентрированная соляная кислота.

Ход работы

1. Подготовительный этап

Для проведения эталонной качественной реакции на рибофлавин готовят его 0,025% раствор из сухого порошка.

Для подготовки пробы коммерческого препарата рассчитывают навеску или объем препарата, необходимые для получения раствора с конечной концентрацией рибофлавина 0,025%. Навеску твердого препарата рибофлавина помещают в фарфоровую ступку и растирают в небольшом количестве воды (5-10 мл) до гомогенного состояния. Гомогенат (или рассчитанный объем жидкого препарата) количественно переносят в мерную колбу, объем доводят дистиллированной водой до метки.

2. Проведение качественной реакции

Для проведения реакции в качестве исследуемых растворов используют: 0,025 % раствор сухого рибофлавина; пробы промышленных

витаминосодержащих препаратов после подготовки; растворы-«задачи», выданные преподавателем.

В пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора, добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. При наличии рибофлавина наблюдают “вскипание” жидкости и постепенный переход окраски раствора сначала в розовую или красную цвет, затем обесцвечивание. Полученный результат фотографируют.

3. Написание отчета

В отчете отражают название, цель, основные стадии выполнения работы и их содержание, приводят все полученные результаты (с подтверждающими фотографиями), делают соответствующие результатам выводы. В отчете должны содержаться краткое описание природы рибофлавина, его биологической роли и путей биосинтеза, принципа проведения качественной реакции. Выводы должны соответствовать цели работы.

Лабораторная работа №2. Флуориметрическое определение содержания рибофлавина

Химическая структура рибофлавина позволяет применять для его количественного определения различные методики химического и физико-химического анализа:

- 1) УФ-спектрофотометрию (рис. 9);
- 2) спектрофотометрию в видимой области;
- 3) флуориметрические методики;
- 4) периодатное окисление (реакция Малапрада);
- 5) метод ацетилирования.

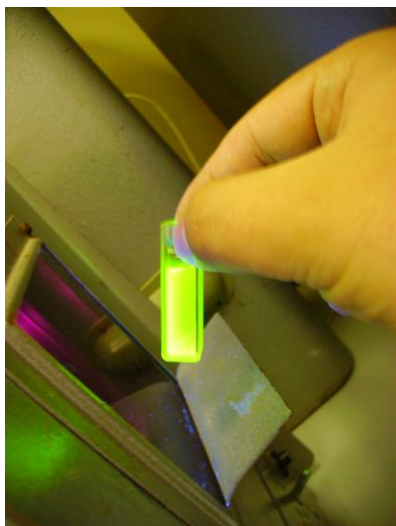


Рис. 9 Яркая флуоресценция рибофлавина при облучении ультрафиолетом

Цель работы: освоить метод флуориметрического определения количества вещества.

Задачи работы: 1) Приготовить растворы рибофлавина заданных концентраций (10^{-4} - 10^{-9} г/мл), на их основе построить калибровочный график, используя метод флуориметрии.

2) Определить содержание рибофлавина в растворе-«задаче».

3) Сравнить содержание рибофлавина в различных фармацевтических препаратах.

Теоретическая часть

Флавин, входящий в молекулу рибофлавина, в окисленной форме является жесткой, плоской и ароматической молекулой с сопряженной π -электронной системой, а в восстановленной форме молекула теряет ароматичность и сгибается по оси между атомами азота в положениях 5 и 10 изоаллоксазинового кольца (в форме бабочки). Неподделенная пара электронов у атома азота ответственна за низкоэнергетический $n \rightarrow \pi^*$ переход. В результате молекула восстановленного рибофлавина не флуоресцирует (рис. 10).

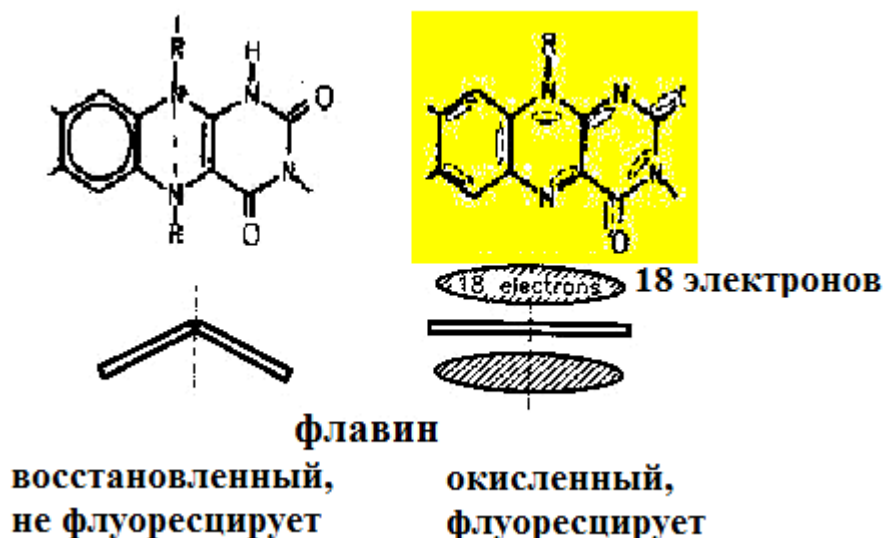


Рис. 10 Пространственная структура окисленного и восстановленного флавина

Теоретические основы флуориметрии изложены в Приложении 1. Их следует изучить перед проведением лабораторной работы.

Спектр флуоресценции рибофлавина находится в желто-зеленой области (515-615 нм) с максимумом около 530 нм. Флуоресценция наиболее интенсивна при рН 6-8. В щелочной среде рибофлавин быстро разрушается (при комнатной температуре в 0,1 н NaOH полное разрушение - за 24 ч). Под действием света, особенно прямого солнечного или ультрафиолетового, разбавленные растворы рибофлавина подвергаются фотолизу с образованием люмифлавина, люмихрома и ряда других изоаллоксазинов с укороченной боковой цепью.

Реактивы и оборудование

1. Рибофлавин (сухой порошок).
2. Растворы-«задачи» с известным преподавателю содержанием рибофлавина.
3. Коммерческие препараты, содержащие рибофлавин.
4. Мерные колбы на 50 мл (6 шт).
5. Фарфоровые ступки с пестиками.
6. Флуориметр.

Ход работы

Работа выполняется в несколько стадий (этапов):

1. Приготовление эталонного раствора рибофлавина (концентрация 10^{-4} г/мл).
2. Получение растворов рибофлавина с концентрациями 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9} г/мл путем кратного разведения эталонного раствора.
3. Построение калибровочной кривой для флуориметрического определения содержания рибофлавина в растворе.
4. Подготовка проб промышленных препаратов рибофлавина для анализа.
5. Флуориметрическое определение содержания рибофлавина в растворе-«задаче» и промышленных препаратах.
6. Оформление отчета по проделанной работе.

Стадия 1. Рассчитывают количество сухого рибофлавина, необходимое для приготовления 50 мл эталонного раствора концентрации 10^{-4} г/мл. Навеску помещают в мерную колбу на 50 мл и растворяют в небольшом количестве воды. Объем реактива доводят водой до риски.

Стадия 2. Нумеруют 5 мерных колб. В колбу №1 помещают 5 мл эталонного раствора рибофлавина, объем доводят до риски водой – получают раствор с концентрацией 10^{-5} г/мл. Из колбы №1 раствор (5мл) переносят в колбу №2, доводят объем и получают раствор с концентрацией рибофлавина 10^{-6} г/мл. Операцию повторяют еще 3 раза.

Стадия 3. Для всех калибровочных растворов определяют величину флуоресценции (возбуждающий свет $\lambda = 360$ нм, максимум флуоресценции при 530 нм). По полученным данным строят калибровочный график зависимости величины флуоресценции от концентрации рибофлавина в растворе.

Стадия 4. Для подготовки пробы промышленного препарата рассчитывают навеску или объем препарата, необходимые для получения раствора с конечной концентрацией рибофлавина в пределах 10^{-6} - 10^{-8} г/мл. Навеску твердого препарата рибофлавина помещают в фарфоровую ступку и растирают в небольшом количестве воды (5-10 мл) до гомогенного состояния. Гомогенат (или рассчитанный объем жидкого препарата) количественно переносят в мерную колбу, объем доводят водой до риски.

Стадия 5. Для всех растворов с неизвестной концентрацией рибофлавина (раствор-«задача» и пробы промышленных препаратов) определяют величину флуоресценции (возбуждающий свет $\lambda = 360$ нм, максимум флуоресценции – 530 нм). По калибровочному графику определяют концентрации рибофлавина.

Стадия 6. В отчете отражают название, цель, задачи, основные стадии выполнения работы и их содержание, а также приводят все расчеты и полученные результаты. В отчете кратко описывают принципы проведения флуориметрических исследований, а также данные для построения графика и сам градуировочный (калибровочный) график для количественного определения рибофлавина в растворе. Вывод должен соответствовать цели и задачам работы.

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБАТА

Лабораторная работа №3. Количественное определение аскорбата в плодах и овощах

Цель работы: Сравнить содержание аскорбата в образцах продуктов.

Теоретическая часть

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты легко окисляться, восстанавливая при этом другие соединения, например, ферроцианат калия или натриевую соль 2,6-дихлорфенолиндофенола. Благодаря хорошо заметному изменению цвета указанных соединений в присутствии аскорбиновой кислоты данная реакция успешно используется для качественного обнаружения витамина С, а также для его количественного определения. Однако, все известные реакции качественного определения витамина С малоспецифичны, поскольку проходят и с другими соединениями, обладающими окислительно-восстановительными свойствами.

Схема реакции аскорбата с натриевой солью 2,6-дихлорфенолиндофенола (краской Тильманса) представлена на рис. 11.

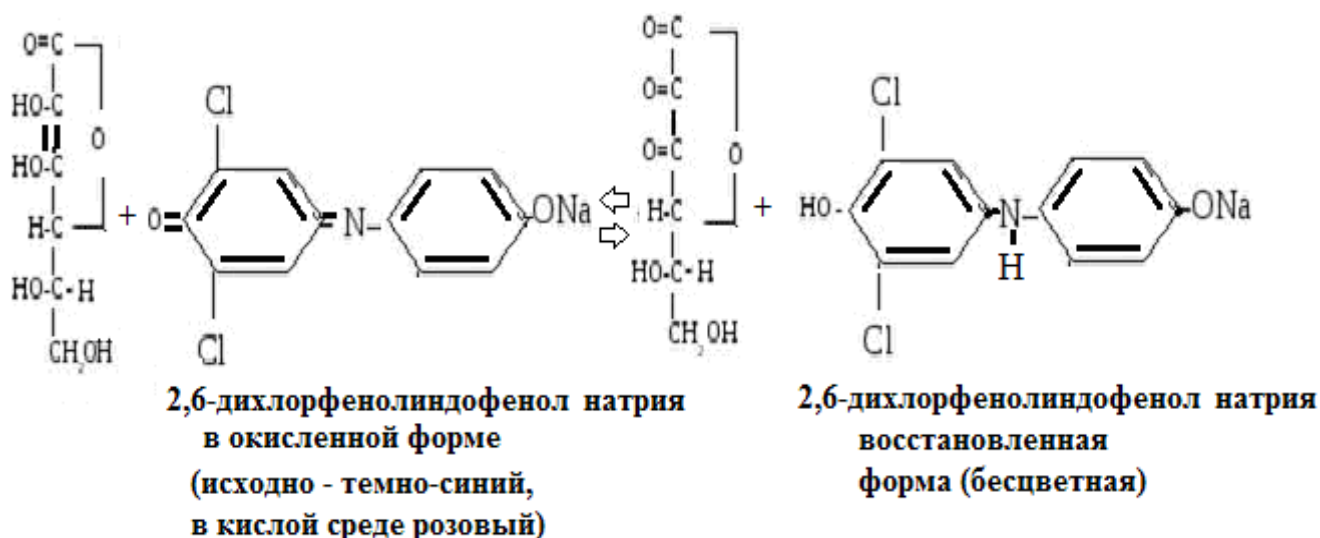


Рис. 11 Реакция аскорбата с краской Тильманса

Реактивы и оборудование

1. 2,6-дихлорфенолиндофенол натрия (краска Тильманса). Раствор 0,001 Н готовится за сутки до использования.

2. Аскорбиновая кислота (следить, чтобы реактив был свежий).

3. H₂SO₄ 0,2%

4. NaOH 0,01 Н

5. КИО₃ (йодат калия) 0,001 Н – можно готовить из фиксанала (стандарт-титра).

6. Щавелевая кислота.

7. Объекты для определения витамина С растительного происхождения.

8. Хлороформ (или толуол, или дихлорэтан) – в случае окрашенных объектов.

Ход работы

1. Подготовительный этап

а) Приготовление краски Тильманса – проводится за сутки до определения витамина С.

В бюксе взвешивают 130 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола, с помощью воронки навеску переносят в мерную колбу на 500 мл. Остатки навески на воронке и в бюксе смывают в колбу дистиллированной водой. В колбу добавляют 10 капель 0,01 Н NaOH и воду до половины объема. Смесь интенсивно перемешивают до растворения 2,6-дихлорфенолиндофенола. Объем раствора в колбе доводят дистиллированной водой до метки. Получившийся раствор перемешивают еще несколько раз и отфильтровывают в сухую склянку из темного стекла. раствор может использоваться в течение трех суток.

б) Определение титра (поправки к титру) краски Тильманса – проводится в день анализа.

Определение титра краски Тильманса проводят, чтобы установить, какому количеству (мг) витамина С соответствует 1 мл приготовленного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Подготавливают необходимые растворы. Для этого:

а) к 2 мл 0,1 % аскорбиновой кислоты приливают 50 мл 2 % H_2SO_4 ;

б) подготавливают 0,001 Н раствор иодата К.

Для определения титра краски Тильманса одновременно проводят два титрования:

1. 5 мл раствора аскорбиновой кислоты в H_2SO_4 титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания. Отмечают объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование.

2. 5 мл раствора аскорбиновой кислоты в H_2SO_4 ОСТОРОЖНО титруют 0,001 Н раствором иодата К (оттитрованным) до появления едва заметного синего окрашивания. Отмечают затраченный объем KIO_3 .

Так как при проведении обоих титрований были использованы одинаковые объемы аскорбиновой кислоты, то количества затраченных KIO_3 и 2,6-дихлорфенолиндофенола эквивалентны друг другу. 1 мл 0,001 Н KIO_3 эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты, поэтому поправку к титру (Т) раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (в мг аскорбиновой кислоты) можно вычислить по формуле:

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

где а – количество миллилитров 0,001 Н KIO_3 , израсходованное на титрование раствора аскорбиновой кислоты;

б – количество мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование.

2. Подготовка пробы

Исследуемый материал измельчают на стекле скальпелем, отбирают навеску 5 г на одну биологическую пробу (рис. 12). Если анализируют сухие плоды шиповника, их берут на анализ в количестве 0,1 г (без семян). Материал растирают в ступке с небольшим количеством щавелевой кислоты (2 – 5 мл) до пастообразного состояния.



Рис. 12 Оборудование для пробоподготовки для определения содержания витамина С

Манипуляции должны производиться максимально быстро, поскольку измельчение приводит к усилению доступа кислорода к тканям и, как следствие, к активации аскорбатоксидазы, разрушающей витамин С.

Растертую навеску из ступки переносят в мерную колбу на 50 мл с помощью щавелевой кислоты, которая предохраняет аскорбат от окисления, и объем доводят до метки. Колбу закрывают пробкой и встряхивают в течение 3 мин, после чего содержимое колбы фильтруют через сухой складчатый фильтр. Фильтрат не должен иметь окраски (рис. 13).



Рис. 13 Получение фильтрата для определения содержания витамина С

3. Проведение количественного анализа содержания аскорбата.

В небольшую колбочку отбирают 10 мл фильтрата для титрования краской Тильманса. 2,6-дихлорфенолиндофенол натрия восстанавливается аскорбиновой кислотой в бесцветное лейкосоединение (см. выше). Когда окислится весь витамин С, то первая же избыточная капля краски окрасит раствор, но не в синий цвет исходного реактива, а в розовый, так как в кислой среде это соединение имеет розовую окраску. Окрашивание не должно исчезать в течение 0,5 – 1 мин. Титрование ведут из микробюретки или пипетки.



Рис. 14 Розовая окраска, свидетельствующая об окончании титрования

Определение проводят в трех химических повторностях. Повторности не должны расходиться между собой более чем на 0,03 – 0,04 мл. Время титрования – не более 2 мин. По окончании титрования записывают показания на бюретке (пипетке) и прибавляют еще 2 контрольные капли краски Тильманса. Только в том случае, если они дадут интенсивное розовое окрашивание, можно считать, что конец титрования определен правильно. Количество краски, пошедшее на титрование, не должно превышать 2 мл и быть не менее 1 мл, так как при меньшем количестве возрастает ошибка анализа, а при большем, чем 2 мл, увеличивается время титрования по сравнению с установленными пределами. Поэтому при низком содержании аскорбиновой кислоты в исследуемом продукте увеличивают навеску, а при высоком – можно развести фильтрат в нужное число раз. Это разведение учитывают при конечном расчете результата анализа.

Параллельно проводят контрольное определение, взяв вместо фильтрата 10 мл 1% раствора щавелевой кислоты.

Содержание аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах ($\text{мг}\% = \text{мг}$ витамина С в 100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A - B) \times T \times 0,088 \times 100}{M}, \quad \text{где}$$

(A – B) – разность между количеством мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного при титровании рабочего и контрольного растворов;

T – поправка к титру краски Тильманса (см. этап 1б);

0,088 – коэффициент пересчета на аскорбиновую кислоту (т.е. 1 мл 0,001 Н р-ра 2,6-дихлорфенолиндофенола эквивалентен 0,088 мг витамина С);

M – масса исследуемого материала, находящегося в титруемой смеси в г, которая в данном случае, с учетом разведения, равна 1 г, т.к

(5 г x 10 мл):50 мл = 1 г.

Рассчитывают содержание витамина С в объекте и сравнивают его с содержанием аскорбата, определенного в других продуктах, применяя правила статистической обработки данных.

В случае окрашенного фильтрата (например, сока апельсина, черники и др.) определение проводят по модифицированной методике (см. ниже).

Если фильтрат, полученный после экстракции, окрашен, то аскорбиновую кислоту в нем титруют раствором краски Тильманса в присутствии хлороформа, дихлорэтана или толуола. Работы проводить под тягой! 5 мл окрашенного фильтрата отбирают в пробирку (диаметр 20-25 мм, длина 150 мм), туда же прибавляют мерным цилиндром 5 мл химически чистого хлороформа. Затем вытяжку титруют раствором краски Тильманса при осторожном перемешивании, наклоняя пробирку и прикрывая пробирку пробкой. При появлении первого розового окрашивания в слое хлороформа титрование считается законченным.

Одновременно проводят титрование контрольной пробы, в которой вместо фильтрата используют раствор щавелевой кислоты.

Расчет ведут по приведенной выше формуле, но значение М необходимо уточнить, так как объем фильтрата, взятого на титрование, составил 5 мл.

4. Написание отчета.

В отчете отражают название, цель, основные стадии выполнения работы и их содержание, а также все полученные результаты и расчеты, формулируют выводы а) о соответствии полученных результатов литературным данным, приведенным в таблице; б) о количественных соотношениях содержания витамина С в разных продуктах. В отчете должны содержаться краткое описание природы витамина С, его биологической роли и путей биосинтеза, принципа проведения количественного определения. Выводы должны соответствовать цели работы.

Таблица 1

Содержание витамина С в растительных объектах по данным литературы, мг% на сырую массу

Продукт	Вит. С, мг% на сырую массу	Продукт	Вит. С, мг% на сырую массу
Шиповник суш	До 1500	Капуста свежая	25 – 40
Облепиха	Около 200	квашеная	Около 20
Смородина черная	100 – 400	Картофель свежий	15 – 20
Хвоя сосны и ели	150 – 250	лежалый	7 – 10
Перец сладкий	125 – 250	Лук зеленый	20 – 27
Хрен	110 – 200	репка	2 – 10
Петрушка зелень	Около 150	Огурцы свежие	8 – 15
Укроп	Около 100	Чеснок	10
Апельсин	35 – 50	Горошек	
Мандарин	25 – 45	консервированный	до 10
Лимон с мякотью	34 – 50	Бананы	1 – 13
Киви	Около 30	Морковь	5 – 8
Яблоки антоновка	20 – 30	Груша	4 – 6
южных сортов	5 – 10	Виноград	0,7 – 2,6
		Молоко	следы

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Физические основы люминесцентной (флуоресцентной) спектроскопии

Уже в XIX веке сложилось представление о том, что атомы и молекулы способны поглощать и испускать свет только определенных длин волн или диапазонов (полос) длин волн. Дальнейшими исследованиями было показано, что спектры атомов не зависят существенно от внешних параметров (температура, растворитель, агрегатное состояние), тогда как спектры молекул сильно зависят от этих факторов. Электроны в атомах и молекулах возбуждаются, если поступает энергия извне. Эмиссия (испускание) света, причиной которой являются возбужденные атомы и молекулы, называется **люминесценцией**. Молекулы и молекулярные системы могут излучать свет в результате поглощения света – этот процесс получил название **фотолюминесценция**. Разновидностями фотолюминесценции являются флуоресценция и фосфоресценция.

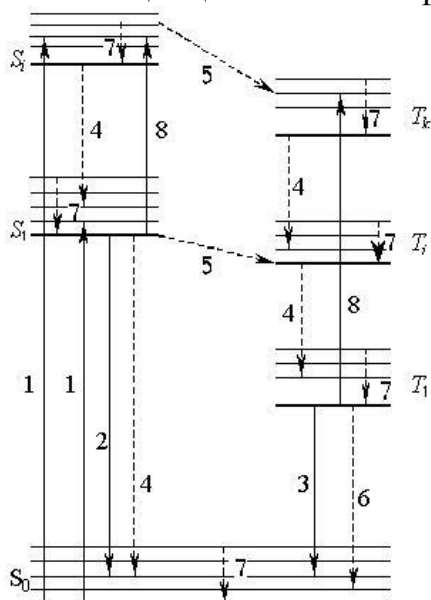


Рис. 15 Энергетическая схема многоатомной молекулы:

1 – поглощение; 2 – флуоресценция; 3 – фосфоресценция; 4 – внутренняя конверсия; 5 – синглет-триплетная конверсия; 6 – $T_1 - S_0$ – конверсия; 7 – колебательная релаксация; 8 – синглет-синглетное и триплет-триплетное перепоглощение

На рисунке 15 показаны основной S_0 и возбужденные (синглетные S_1 и триплетные T_1) электронные уровни молекулы. Синглетному состоянию соответствуют антипараллельные спины электронов, триплетному – параллельные. Переход основного синглетного в возбужденное триплетное состояние запрещен по спину и практически не наблюдается. Поглощение энергии света сопровождается переходом одного из электронов на более высокую орбиту с запасанием поглощенной энергии в виде энергии электронного возбуждения.

В синглетном (S_1 , S_2) возбужденном состоянии спины электронов на основном и возбужденном уровнях остаются антипараллельными, при переходе в триплетное (T_1) состояние происходит поворот спина возбужденного электрона с образованием бирадикальной системы. Одним из путей дезактивации возбужденного состояния и является излучение фотона с переходом системы в основное (S_0) состояние (флуоресценция или фосфоресценция). **Флуоресценция** – излучательный переход между двумя состояниями идентичной мультиплетности (в основном $S_1 \rightarrow S_0$), **фосфоресценция** – излучательный переход между двумя состояниями различной мультиплетности (например, $T_1 \rightarrow S_0$). Другими путями рассеивания энергии возбуждения являются: перенос энергии на другую молекулу (тушение флуоресценции); фотохимические реакции; внутренняя конверсия (превращение энергии возбуждения в тепло). В жесткой молекуле энергия, принесенная фотоном, перераспределяется мгновенно по всей системе, а затем в большей степени излучается снова в виде света. В гибкой молекуле энергия в основном рассеивается через безызлучательные переходы.

Основные законы люминесценции, определяющие принципы люминесцентных исследований.

Закон Стокса: длина волны фотолюминесценции не меньше длины волны возбуждающего света:

$$h\nu_{\text{возб}} \geq h\nu_{\text{изл}},$$

$$\text{т.е. } \nu_{\text{возб}} \geq \nu_{\text{изл}}, \text{ или } \lambda_{\text{изл}} \geq \lambda_{\text{возб}}$$

Правило Стокса означает, что молекула излучает не всю поглощенную энергию, часть поглощенной энергии тратится на внутримолекулярные преобразования (рис. 16).

Однако, возможна антистоксовая люминесценция.

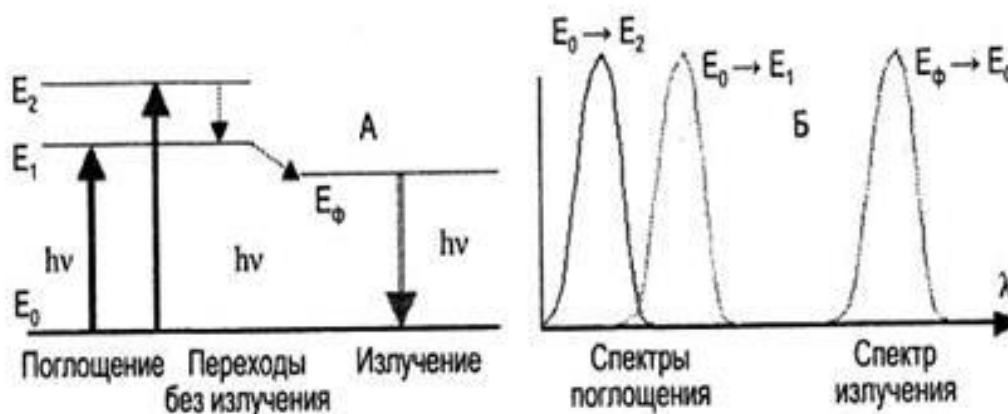


Рис. 16 Энергетические переходы в молекулах при флуоресценции. А — электронные переходы, соответствующие поглощению света, безызлучательным переходам на нижний возбужденный уровень и излучению; Б — спектральные кривые поглощения и флуоресценции в случае двух возбужденных уровней в молекуле

Правило Коши. Спектр люминесценции не зависит от спектра и энергии возбуждения.

Правило Левшина. Спектры флуоресценции и поглощения зеркально симметричны.

Закон Вавилова. Квантовый выход фотолюминесценции не зависит от энергии возбуждающих люминесценцию квантов и определяется только веществом.

Следствие закона Вавилова:

Спектр возбуждения фотолюминесценции совпадает со спектром собственного поглощения люминесцирующего вещества.

Принцип работы и устройство флуориметра

Флуориметрические измерения проводят на флуориметрах (рис. 17) – приборах, позволяющих выделить в падающем (от источника света 1) на кювету световом потоке при помощи светофильтра 2 длину волны ультрафиолетового диапазона, соответствующую максимуму поглощения молекулами или ионами анализируемого вещества. Второй светофильтр 4 выделяет в световом потоке вторичного (флуоресцентного) излучения длину волны, соответствующую максимуму интенсивности излучения, при этом выходная щель из кюветы смонтирована под углом к проходящему свету.

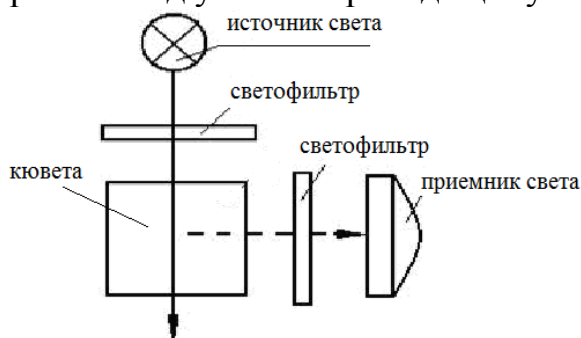


Рис. 17 Принципиальная оптическая схема и внешний вид флуориметра RF-5301 (Shimadzu)

Величина флуоресценции определяется **эффективностью флуоресценции** или **квантовым выходом** (Φ_F). Квантовый выход определяется как отношение количества испускаемых в результате флуоресценции и поглощаемых фотонов:

$$\Phi_F = \frac{\text{число испускаемых фотонов}}{\text{число поглощенных фотонов}} = I_F / I_A$$

Квантовый выход Φ_F всегда больше нуля, но меньше единицы.

Внешние факторы, влияющие на интенсивность флуоресценции

В флуоресцентной спектрометрии обычно измеряют длины волн возбуждения и эмиссии (испускания), и соответствующие спектры зависимости величины флуоресценции от длин волн называются спектрами возбуждения и эмиссии или спектрами флуоресценции. Длина волны и интенсивность эмиссии флуоресценции существенно зависят от внешних факторов – температуры, химических связей, вязкости и полярности растворителя. С увеличением полярности растворителя эмиссия становится слабее, а спектры эмиссии сдвигаются в красную область, как, например, у флавина (рис. 18).

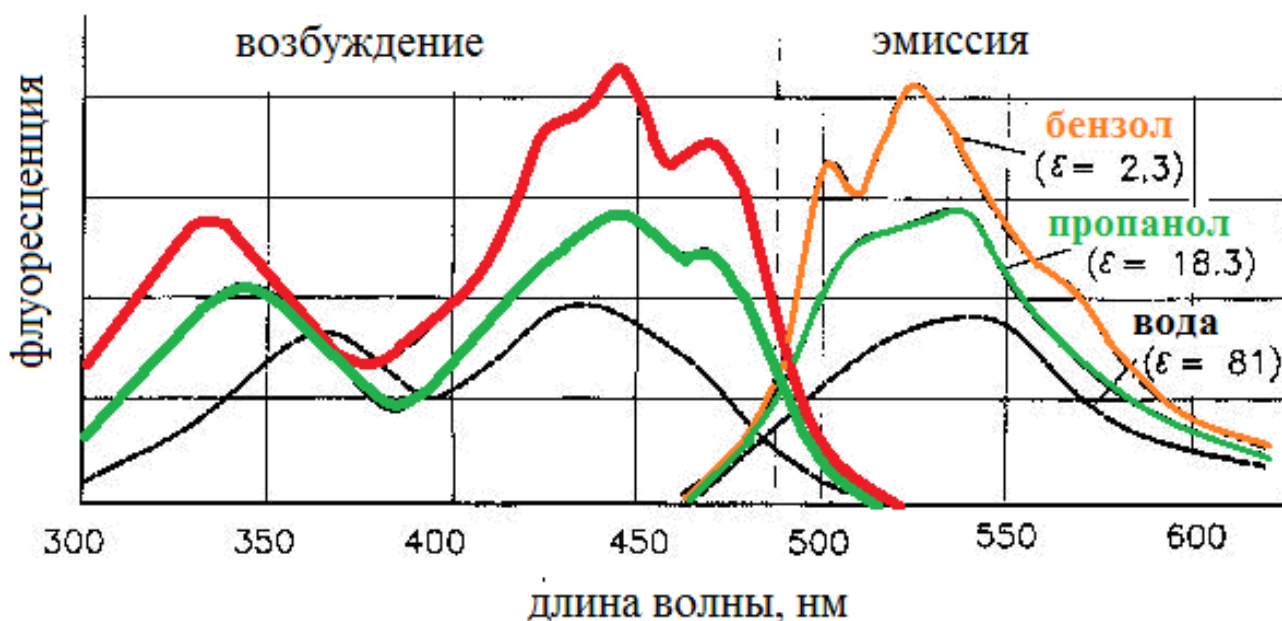


Рис. 18 Спектры поглощения и эмиссии флавина (длина волны возбуждения 380 нм) в растворах различной полярности. Полярность растворов выражена через диэлектрическую постоянную ϵ .

На интенсивность флуоресценции существенное влияние оказывает кислотность раствора. При этом изменяется и форма спектра. Характер зависимости от рН индивидуален для каждого исследуемого вещества, и влияние этого фактора существенное. Поэтому рекомендуется аналитические определения проводить в буферных средах.

Повышение температуры усиливает колебательные переходы в молекулах и резко снижает интенсивность флуоресценции (температурное тушение). Измерения желательно проводить при более низкой температуре, используя термостатирование.

Для флуоресценции многих веществ характерно тушение излучения посторонними веществами. Этот эффект применяется в количественном анализе.

Влияние концентрации исследуемого вещества на интенсивность флуоресценции

Зависимость интенсивности флуоресцентного излучения I от концентрации излучающего вещества C проходит через максимум. Для очень малых значений C (от 0 до 10^{-3} моль/дм³) наблюдается линейная зависимость

$$I = k \cdot C.$$

Соответствующая максимальная концентрация флуорофора (вещества, способного к флуоресценции) определяется по закону Ламберта-Бера:

$$C_{\max} = \frac{0,05}{2,303x\varepsilon(\lambda)}, \text{ где}$$

C_{\max} - максимальная концентрация исследуемого вещества (флуорофора), x - длина оптического пути (толщина кюветы), $\varepsilon(\lambda)$ - коэффициент молярной экстинкции при данной длине волны.

Например, интенсивность флуоресценции хлорофилла, у которого $\varepsilon(670 \text{ нм}) = 85000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$, при длине оптического пути $x = 1 \text{ см}$ увеличивается линейно до концентрации $C_{\max} = 0,05 / (2,303 \cdot 1 \cdot 85000) = 0,255 \text{ мМ}$.

Дальнейшее увеличение C приводит к концентрационному тушению флуоресценции. Типичная зависимость представлена на рис. ... В диапазоне от 0 до 15 мкг/см³ соблюдается линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации фенола. В этом диапазоне обсуждаемым методом успешно осуществляется количественный анализ при высокой чувствительности.

ЛИТЕРАТУРА

Веселов А.П., Александрова И.Ф., Стручкова И.В., Брилкина А.А. Малый практикум по биохимии / Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета, 2005. 68 с.

Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. 314 с.

Чупахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум. Калининград: Калинингр. ун-т, 2000. 59 с.

Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. Москва: Техносфера, 2007.- 368 с.

Fischer M., Bacher A. Biosynthesis of vitamin B2: Structure and mechanism of riboflavin synthase // Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. V. 474. P. 252-265.

Sauer M., Branduardi P., Valli M., Porro D. Production of L-Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* // Applied and Environmental Microbiology, 2004. Vol. 70. No. 10. P. 6086–6091.