

Laborator 12

VITAMINE

Vitaminele sunt compuși organici cu structură variată sintetizate în cantități mici în organism fiind, mai ales, de origine exogenă, absolut necesare pentru desfășurarea proceselor fiziologice.

În funcție de solubilitate, vitaminele se clasifică astfel:

- vitamine liposolubile – A, D, E, K (solubile în solvenți organici și în lipide);
- vitamine hidrosolubile – B₁, B₂, B₆, PP, C, acid pantotenic, biotina, B₁₂, acizi folici, acid lipoic.

În lichidele biologice unele dintre ele se găsesc în cantități extrem de mici, de ordinul μg.

Identificarea vitaminelor se face prin reacții bazate pe proprietățile specifice grupelor funcționale conținute în structura acestora.

Pentru dozarea vitaminelor din diverse medii biologice se pot folosi următoarele tipuri de metode: **metode colorimetrice**

metode volumetrice

metode cromatografice prin cromatografie gazoasă sau cromatografie lichidă de înaltă presiune (HPLC).

Reacții de identificare și metode de dozare a vitaminelor liposolubile

Vitaminele A

Reacția cu acidul tricloracetic

Principiu: Vitaminele A dau cu acid tricloracetic o colorație galbenă care virează în albastru.

Reactivi:

1. Soluție uleioasă de vitamină A 0,1 %;
2. Soluție cloroformică de acid tricloracetic 30 %.

Mod de lucru: Se măsoară 0,5 ml de soluție de vitamină A și 1 ml TCA. Apare o colorație galbenă care virează în albastru.

Reacția cu acidul sulfuric

Principiu: Vitaminele A reacționează cu acidul sulfuric concentrat, conducând la compuși colorați în albastru violet.

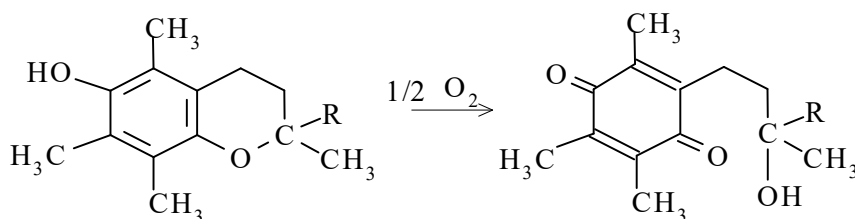
Reactivi:

1. Acid sulfuric concentrat;
2. Soluție de vitamina A în ulei sau soluție de ulei de pește în cloroform;

Mod de lucru: Peste 2-3 picături de soluție uleioasă de vitamină A se adaugă 1 picătură acid sulfuric concentrat. Amestecul de reacție se colorează în albastru violet. Dacă se folosește ulei de pește în cloroform, apare la început o colorație roșu-violet ce trece în roșu-brun.

Vitaminele E

Vitaminele E se pot oxida ușor sub acțiunea unor oxidanți diferiți, formând tocoferilchinone colorate:



Reacția cu clorura ferică

Principiu: Tocoferolii dau o reacție cu clorura ferică datorită grupei hidroxil de tip fenolic din poziția 6, aceasta fiind oxidată la compuși chinonici.

Reactivi:

1. Soluție alcoolică de vitamina E 0,1 mg % în alcool etilic;
2. Soluție clorură ferică 10 %.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se introduc 0,5 ml soluție alcoolică de vitamină E și 2-3 picături FeCl_3 10 %. După agitare trebuie să apară o colorație roșie.

Dozarea vitaminei K_3

Principiu: Iodura de potasiu reduce, în mediu acid, vitamina K_3 și se oxidează la iod molecular care se titrează în prezența amidonului cu tiosulfat de sodiu.

Reactivi:

1. Soluție alcoolică de vitamina K_3 ;
2. Etanol 96%;
3. HCl conc.;
4. Iodură de potasiu 10%;
5. Tiosulfat de sodiu 0,1 N;
6. Amidon 1%.

Mod de lucru: Într-un vas Erlenmayer se măsoară 1 ml soluție de vitamină K_3 . Se tratează 20 ml etanol cu 20 ml HCl concentrat sub curent de apă rece. Se adaugă 20 ml KI 10% și se agită ușor, apoi se transvazează în balonul cu soluție alcoolică de vitamină K_3 . După câteva minute, iodul pus în libertate se titrează cu o soluție de tiosulfat de sodiu 0,1N, în prezența amidonului, până la decolorarea soluției.

Calcul: $\text{mg vit K\%} = n \cdot 8,6 \cdot 100$

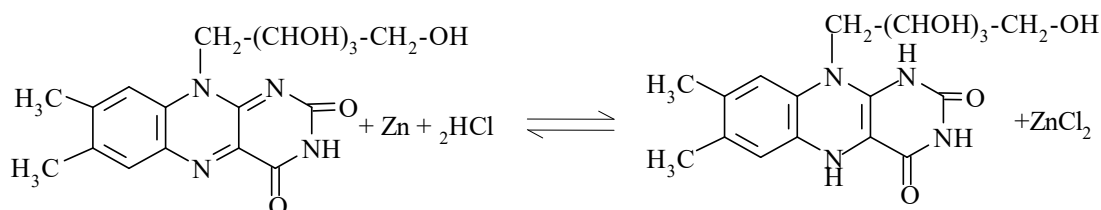
8,6 = mg vitamină K_3 ce corespunde la 1 ml tiosulfat de sodiu 0,1N

n = numărul de ml tiosulfat folosiți la titrare.

Reacții de identificare și metode de dozare a vitaminelor hidrosolubile

Vitamina B_2 (riboflavina)

Principiu: Vitamina B_2 prezintă fluorescență galben-verzuie, la pH 3 – 9, iar sub acțiunea reducătorilor trece în leucoderivat care nu mai prezintă fluorescență. Reacția este reversibilă vitamina recapătându-și fluorescența în prezența oxigenului.



Reactivi:

1. Soluție vitamină B_2 50 mg%;
2. Zn metalic granule;
3. Soluție HCl 10%.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se măsoară 1 ml soluție vitamină B_2 care prezintă fluorescență galben-verzuie. Se adaugă 20-30 mg Zn metalic și 2 ml HCl 10 %. Se agită de câteva ori și se observă dispariția fluorescenței. Se astupă eprubeta cu degetul și se agită. Se observă apariția fluorescenței datorită oxidării vitaminei sub acțiunea oxigenului.

Vitamina B₆

Reacția cu clorura ferică

Principiu: Prin gruparea –OH fenolică, vitamina B₆ reacționează cu clorura ferică asemănător fenolilor dezvoltând o colorație roșie.

Reactivi:

1. Soluție clorură ferică 1 %;
2. Soluție vitamină B₆ 1 % (produs farmaceutic).

Mod de lucru: Se iau într-o eprubetă 0,5 ml soluție de vitamină B₆ și se tratează cu 0,5 ml soluție de clorură ferică, cu agitare. Apare o colorație roșie.

Reacția cu reactivul Folin – Ciocâlțeu

Principiu: Prin tratare cu reactiv Folin-Ciocâlțeu și o soluție de carbonat de sodiu, vitamina B₆ dă o colorație albastră.

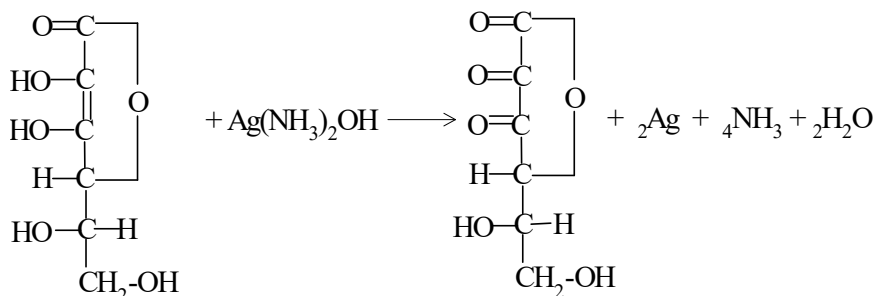
Reactivi:

1. Vitamina B₆ (produs farmaceutic);
2. Reactiv Folin –Ciocâlțeu;
3. Soluția de carbonat de sodiu 20 %.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se pipetează 1 ml soluție vitamină B₆, 1 ml reactiv Folin-Ciocâlțeu și 2 ml soluție de carbonat de sodiu, agitând pentru omogenizare. Apare o colorație albastră.

Identificarea vitaminei C

Principiu: Vitamina C, datorită proprietății de a se oxida ușor, reduce sărurile de argint la argint metalic.



Reactivi:

1. Vitamină C 3%;
2. Azotat de argint 5%;
3. Hidroxid de amoniu 20%.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se măsoară 1 ml azotat de argint și se adaugă hidroxid de amoniu picătură cu picătură până la dizolvarea precipitatului format inițial. Se adaugă 2 ml soluție vitamină C și se încălzește pe baie de apă 5-10 minute. Se va depune Ag metalic pe pereții eprubetei.

Dozarea vitaminei C prin metoda cu 2,6-diclorfenolindofenol

Principiu: Vitamina C (acidul ascorbic) este oxidată cu 2,6-diclorfenolindofenol la acid dehidroascorbic, iar colorantul este redus la leucoderivat.

Reactivi:

1. Acid acetic 10%;
2. Reactiv Tillmans (2,6-diclorfenolindofenol 0,001 N
3. Extract proaspăt de vitamină C.

Mod de lucru:

Într-un mojar se mojarază 2 g țesut vegetal bine fragmentat cu 5 ml acid acetic 10 % și se omogenizează bine. Se completează la 40 ml cu acid acetic 10% și se filtrează. Din filtrat se iau 2 probe de 4 ml fiecare și se titrează cu reactiv Tillmans până la apariția unei culori roz care persistă 30 secunde.

Calcul: $\text{mg vit C \%} = n \cdot T \cdot 10 \cdot 50$

$\text{mg vit C / 100 g material vegetal} = 100 \times (0,088 \times V_r \times T \times 40) / V_1 \times c$, unde:

V_r = volumul de reactiv Tillmans (în ml) consumat la titrare;

T = titrul reactivului Tillmans;

0,088 = cantitatea de acid ascorbic (în mg) dintr-un ml soluție acid ascorbic 0,001N echivalentă la 1 ml reactiv Tillmans 0,001N;

40 = volumul total al extractului de vitamină C;

V_1 = volumul de extract (ml) utilizat pentru titrare;

c = greutatea materialului vegetal (în g).

Testele rapide pentru identificarea vitaminei C în urină se bazează pe această reacție.

Identificarea vitaminei PP**Reacția cu acetatul de cupru**

Principiu: Vitamina PP formează cu acetatul de cupru, la încălzire, un precipitat albastru.

Reactivi:

1. Soluție de vitamină PP 3 % în soluție de acid acetic 10 %;
2. Soluție de acetat de cupru 5 %.

Mod de lucru: Într-o eprubetă se introduc 2 ml soluție de vitamină PP și se încălzesc la fierbere, până devin transparente. La soluția fierbinte se adaugă 2 ml soluție acetat de cupru, agitată în prealabil. Prin încălzirea eprubetei, la fierbere, urmată de răcire în curent de apă, se obține un precipitat albastru.

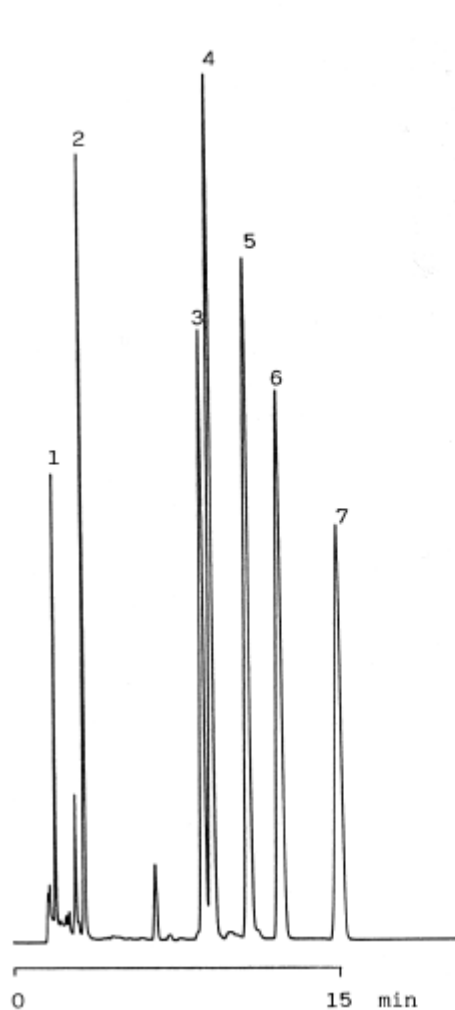
Cromatografia este o metodă analitică, calitativă și cantitativă, de separare a unor componente din amestecuri complexe, utilizând ca suport de fracționare medii cu anumite proprietăți caracteristice.

În funcție de mecanismul procesului de separare și de natura suportului pe care se efectuează analiza, cromatografia este de mai multe tipuri.

Gaz-cromatografia este o metodă cromatografică în care separarea componentelor dintr-un amestec complex se realizează între o fază mobilă gazoasă și o fază staționară lichidă sau solidă. Gaz cromatografia permite atât separarea substanțelor volatile (stabile la temp. de volatilizare), cât și a celor care, în urma unor reacții chimice (derivatizare), pot fi transformate în derivați volatili și stabili.

Cromatografia de lichide la înaltă presiune este o metodă cromatografică ce elimină dezavantajele gaz cromatografiei: condiția volatilizării compușilor sau a transformării lor în derivați volatili și stabili termic. Se folosesc solvenți adecvați structurii compușilor dozați pentru antrenarea acestora din amestec.

Aspectul unei HPLC cromatograme pentru dozarea vitaminelor liposolubile



Column :
Inertsil ODS-2 5 μ m
250 x 4.6 mm I.D.
Cat.No. : 5020-01102
Eluent :
CH₃CN/CH₃OH=75/25
Flow rate : 1.0 mL/min.
Detector : UV 280nm
Col.Temp. : 40°C

1. Vitamin K₃
2. Vitamin A
3. Vitamin D₂
4. Vitamin D₃
5. Vitamin E
6. Vitamin E acetate
7. Vitamin K₁

Aspectul unei HPLC cromatograme de la dozarea vitaminelor hidrosolubile

Column :
Inertsil ODS-2 5 μ m
150 x 4.6 mm I.D.
Cat.No.:5020-01101
Eluent :
A:IPCC-05 + 0.1% H₃PO₄
B:CH₃CN/IPCC-05 + 0.1% H₃PO₄=80/20
A/B 97.5/2.5 $\rightarrow$ (20min) $\rightarrow$ 50/50
IPCC-05:Sodium 1-Pentanesulfonate
Flow rate : 1.0 mL/min.
Detector : UV 254nm
Col.Temp. : 40°C

