



VITAMINE

HIDROSOLUBILE

LIPOSOLUBILE

VITAMINELE

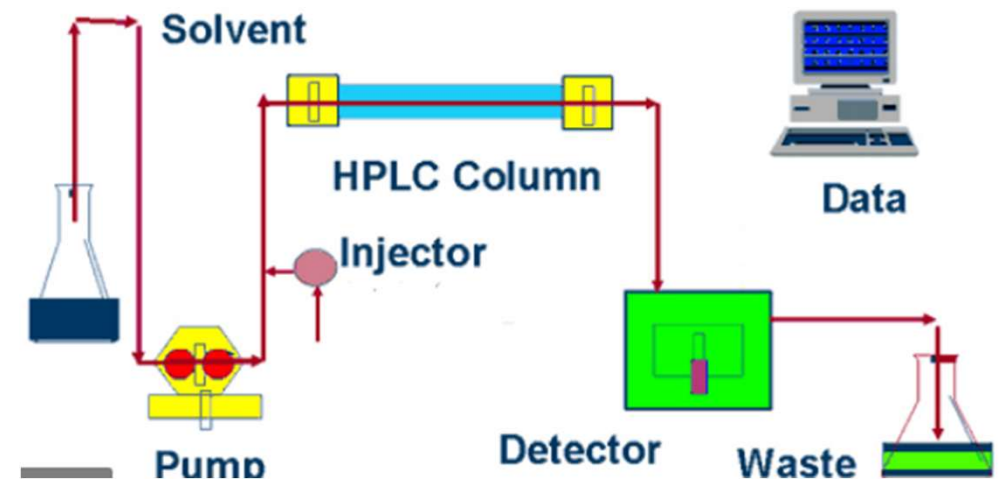
Sunt compuși organici cu structură variată sintetizate în cantități mici în organism fiind, mai ales, de origine exogenă, absolut necesare pentru desfășurarea proceselor fiziologice.

- ▶ 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.

DOZARE

- ▶ 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).

HPLC System



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:

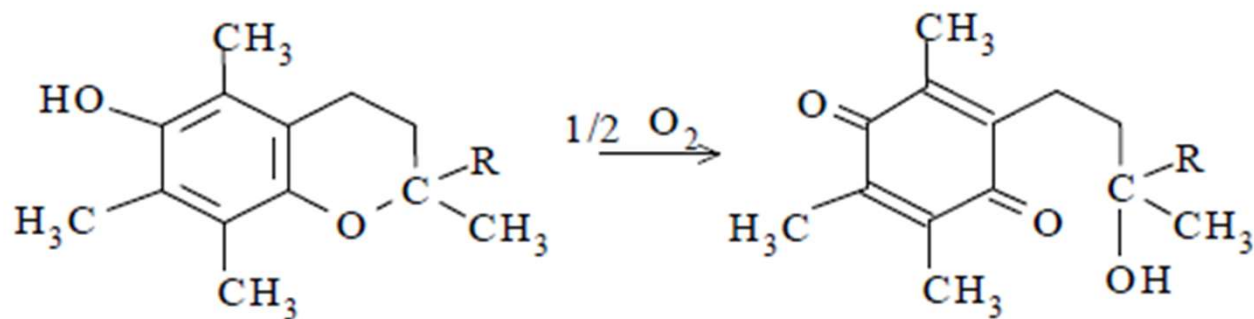
- ▶ 1. Acid sulfuric concentrat;
- ▶ 2. Soluție de vitamina A în ulei sau soluție de ulei de pește în cloroform;
- ▶ Mod de lucru: Peste 2-3 picături de soluție uleioasă de vitamină A se adaugă 1 picătură acid sulfuric concentrat.

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 K3

► Principiu: Iodura de potasiu reduce, în mediu acid, vitamina K3 și se oxidează la iod molecular care se titrează în prezența amidonului cu tiosulfat de sodiu.

► Reactivi:

1. Soluție alcoolică de vitamina K3;
2. Etanol 96%;
3. HCl conc.;
4. Iodură de potasiu 10%;
5. Tiosulfat de sodiu 0,1 N;
6. Amidon 1%.



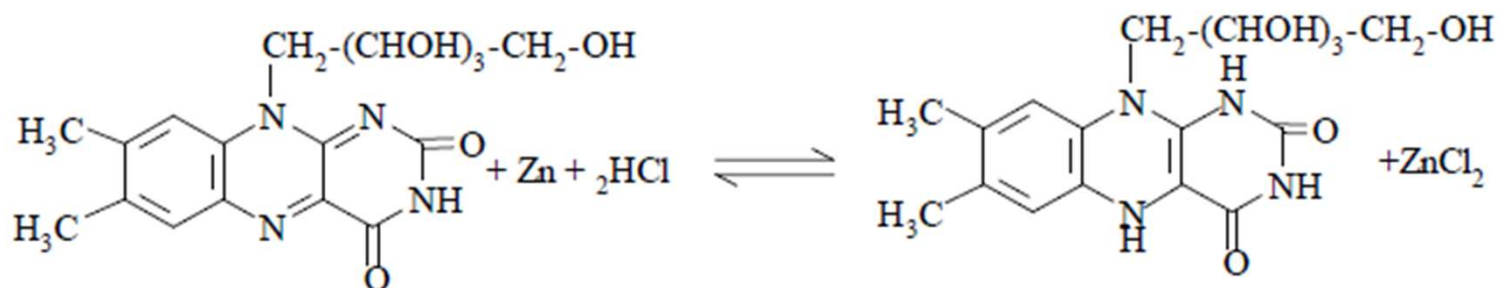
Mod de lucru:

- ▶ Într-un vas Erlenmayer se măsoară 1 ml soluție de vitamină K3. 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 K3.
- ▶ 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 K3 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 B2 (riboflavina)

Principiu: Vitamina B2 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 B2 50 mg%;
 2. Zn metalic granule;
 3. Soluție HCl 10%.
- ▶ **Mod de lucru:** Într-o eprubetă se măsoară 1 ml soluție vitamină B2 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.

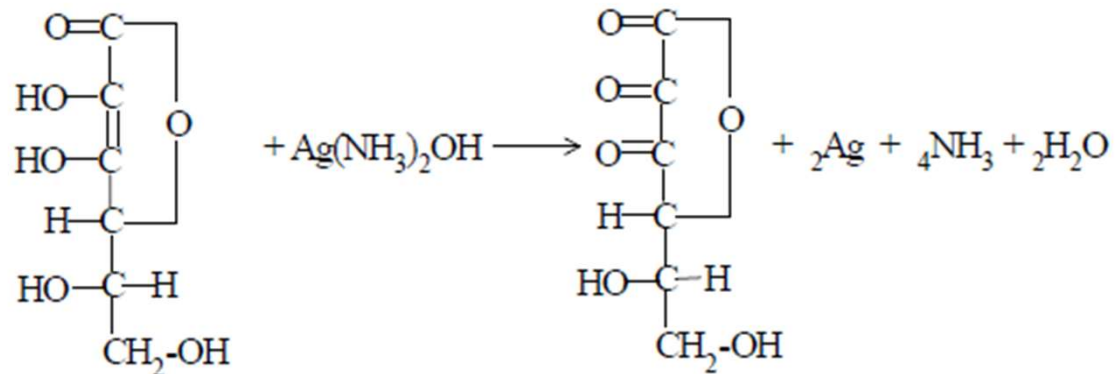
Reacția cu reactivul Folin – Ciocâlțeu

- ▶ **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:

- ▶ 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 mojurează 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

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

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

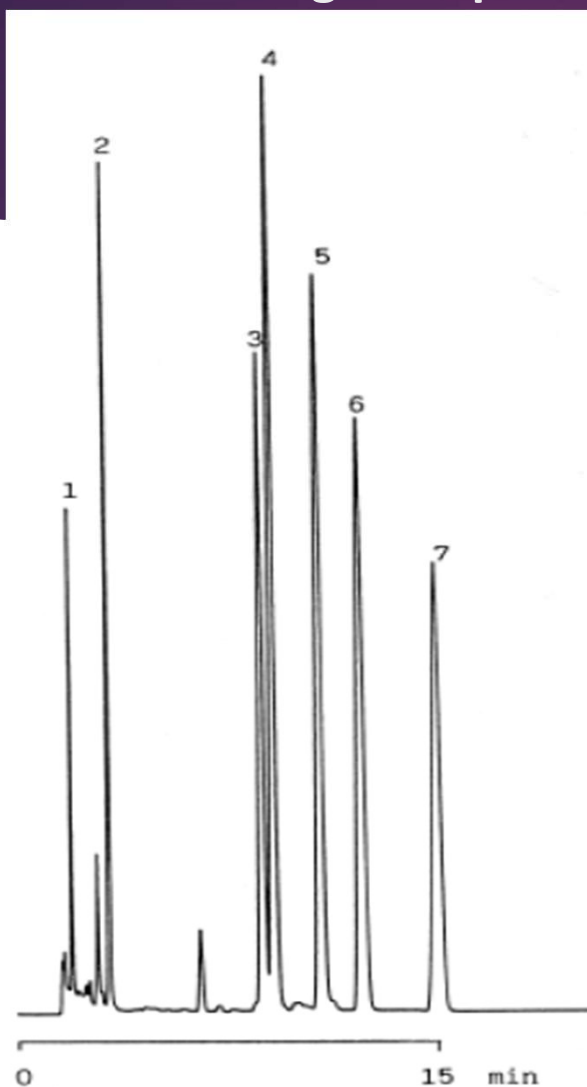
Este o metodă analitică, calitativă și cantitativă, de separare a unor componente din amestecuri complexe, utilizând ca suport de fracționare medii cu anumite proprietăți caracteristice.

- ▶ 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.

HPLC

- ▶ 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→(20min)→50/50
IPCC-05:Sodium 1-Pentanesulfonate
Flow rate : 1.0 mL/min.
Detector : UV 254nm
Col.Temp. : 40°C

