Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет
імені Івана Пулюя

Кафедра харчової
біотехнології та хімії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторної роботи на тему:

«Дослідження якісного та кількісного складу біологічно активних жиророзчинних вітамінів в харчових продуктах»

з курсу

«Біологічно активні сполуки в харчових продуктах»

для студентів денної форми навчання

Напряму підготовки: _6.051702 "Технологічна експертиза та безпека харчової продукції"_

Тернопіль 2017 рік

Методичні вказівки до виконання лабораторної роботи на тему: «Дослідження якісного та кількісного складу біологічно активних жиророзчинних вітамінів в харчових продуктах» з курсу «Біологічно активні сполуки в харчових продуктах» для студентів денної форми навчання напряму підготовки _6.051702 "Технологічна експертиза та безпека харчової продукції"- Тернопіль: ТНТУ, 2017 - 11с.

Укладачі: к.пед.н., доц. Назарко І.С.
ст. викл. Джур Я.Б.

Рецензент: д.б.н., проф. Покотило О.С.

Відповідальний за випуск ст. викладач Джур Я.Б.

Методичні вказівки розглянуті і затверджені на засіданні кафедри харчової біотехнології та хімії

Протокол № 7 від 18.05.2017р.

Схвалені засіданням методичної ради факультету машинобудування і харчових технологій ТНТУ ім. І.Пулюя.

Протокол № 8 від 25.05.2017р.

Лабораторна робота №2

Тема: Дослідження якісного та кількісного складу біологічно активних жиророзчинних вітамінів в харчових продуктах.

Мета: Провести якісне та кількісне визначення жиророзчинних вітамінів

Теоретична частина

Жиророзчинні вітаміни не входять до складу ферментів і впливають на обмін речовин опосередковано, створюючи умови для оптимальної дії ферментів на мембранних структурах. Вони виконують роль модуляторів структури і функцій мембран. У зв'язку з цим, жиророзчинні вітаміни в організмі виконують ще антимутагенну функцію, захищаючи генний апарат від пошкоджень хімічними та фізичними факторами. Це зв'язано із вираженими антиоксидантними властивостями жиророзчинних вітамінів: вони здатні знешкоджувати активні форми кисню та вільні радикали й гальмувати процеси пероксидного окиснення біополімерів (нуклеїнових кислот, білків, ліпопротеїнових комплексів).

Вони також впливають на процеси тканинного дихання (безпосередньо або опосередковано), стабілізують клітинні мембрани, регулюють їх вибіркову проникність для речовин. Для деяких жиророзчинних вітамінів у ядрі клітин виявлені специфічні рецептори, за допомогою яких вони активують експресію генів, що призводить до диференціації клітин. За таким принципом діють вітаміни A, D та E. Останній активує біосинтез гемсинтезуючих ферментів.

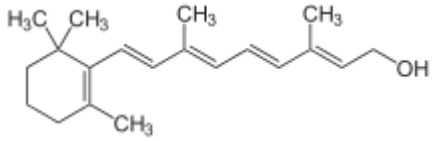
За сучасною тривіальною номенклатурою, назви вітамінів складаються із 3 частин: буквений символ, хімічна та біологічна назви. Остання нерідко містить префікс "анти", що вказує на здатність даного вітаміну попереджувати відповідне захворювання.

Вітаміни, розчинні у жирах

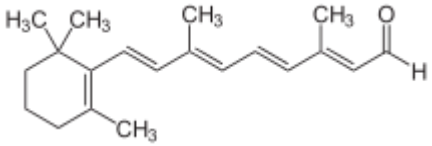
- Вітамін A, ретинол, ретиноєва кислота, антиксерофтальмічний.
- Вітамін D, антирахітний.
- Вітамін E, токофероли, антистерильний, вітамін розмноження, антиоксидант.
- Вітамін K, нафтохінони, антигеморагічний.
- Вітамін F, есенціальні жирні кислоти, антисклеротичний.

Вітамін А

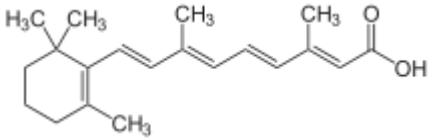
Вітамін А — група близьких за хімічною будовою речовин, яка включає ретиноїди: ретинол (вітамін A_1), дегідроретинол (вітамін A_2), ретиналь (ретинен, альдегід вітаміну A_1), ретиноєву кислоту і кілька провітамінів - каритиноїдів, серед яких найважливішим є β-каротин. Ретиноїди містяться в продуктах тваринного походження, а каротиноїди — у рослинних продуктах. Усі ці речовини добре розчиняються в неполярних органічних розчинниках і погано розчиняються у воді. Депонуються в печінці, здатні накопичуватися в тканинах. У разі передозування вітамін виявляє токсичність.



ретинол



ретиналь



ретиноєва кислота

Вітамін було відкрито в 1913 році. У 1931 року було описано його структуру, а 1937 року його вдалося кристалізувати.

Найбільше вітаміну А міститься в печінці морських риб, в печінці рогатої худоби, нирках і дещо менше у яєчному жовтку, вершковому маслі. Відповідно каротину багато є в червоному перці, моркві, цибулі, салаті, шпинаті, капусті, помідорах, ягодах обліпихи, горобини, абрикосах. Для всмоктування вітаміну А, як і інших жиророзчинних вітамінів, необхідні жовчні кислоти та жири. Каротини в слизовій кишечника і печінці частково

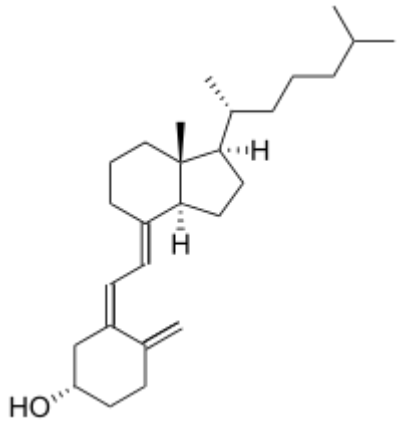
перетворюються у вітамін А. У слизовій кишечника ретинол утворює складні ефіри з жирними кислотами, що мають довгий вуглецевий ланцюг. Ці ефіри транспортуються через лімфатичну систему в кров.

Усі форми вітаміну А (ретинол, ретиналь, ретиноєва кислота та ефірні форми) беруть участь у біохімічних процесах організму. У разі нестачі вітаміну А погіршується зір, розвиваються різні ураження епітелію, порушується змочування рогівки. Також спостерігається зниження імунної функції та уповільнення росту.

Вітамін D

Вітамін D – спільна назва групи речовин рослинного і тваринного походження, що відносяться до стероїдів і проявляють антирахітну дію. Треба мати на увазі, що у здорової людини, яка постійно піддається сонячному опроміненню, вітамін D у шкірі утворюється в достатній кількості. Щодо цього вітамін D не є типовим вітаміном.

Вітамі́н D має кілька форм. Їх називають кальциферолі і представлені вони переважно у вигляді двох речовин: ергокальциферолу (вітаміну D_2), що надходить із дріжджів, та холекальциферолу (вітаміну D_3), який отримано із тканин тварин.



Вітамін D (кальциферол)

Ці вітаміни стійкі до дії високої температури, але руйнуються під впливом мінеральних кислот та окисників. Вагітним та малим дітям рекомендується приймати сонячні ванни або опромінення кварцовими лампами з метою вироблення в шкірі вітаміну D.

В загальному дія вітаміну D спрямована на підвищення вмісту іонів кальцію і фосфору в крові. Нестача вітаміну D в організмі дітей проявляється у вигляді захворювання, яке називається рахітом. В основі цього захворювання лежать зміни обміну фосфору і кальцію, порушення відкладання їх солей у кістковій тканині. Чим молодший вік дитини, тим вища можливість захворювання на рахіт. Це пов'язано з тим, що молодші діти (грудного віку) одержують менше вітаміну D з їжею та меншу дозу ультрафіолетового опромінення.

Добова доза вітаміну D для дітей знаходиться в межах 12-25 мкг (500-1000 МО). Для дорослої людини потреба у вітаміні D в десятки разів менша, ніж для дітей. Джерелом вітаміну D є риб'ячий жир, печінка, вершкове масло, жовток яйця.

Вітамін Е (токоферол, вітамін розмноження)

Назва токоферолу походить від двох грецьких слів "токос" – потомство і "феро" – несу. При дефіциті в кормах вітаміну Е в експериментальних тварин настає втрата здатності до відтворення потомства, переродження скелетних м'язів та міокарда, розлади нервової системи Для людини джерелом токоферолу є рослинні олії (соняшникова, кукурудзяна, оливкова та інші), потім горіхи та насіння. Продукти тваринного походження містять мало вітаміну Е. Добова доза для людини – 20-50 мг Е.

Найкращу вітамінну активність проявляє α-токоферол. Всмоктування токоферолу, як і інших жиророзчинних вітамінів, відбувається у тонкому кишечнику при наявності жирів та жовчних кислот. Прояви гіповітамінозу Е у людини не описані, бо вона отримує цей вітамін у достатній кількості. Правда, є дані, що в деяких тропічних країнах, де люди харчуються переважно рослинною їжею і мало вживають жирів, можуть спостерігатися гіповітамінози Е. Описані випадки ускладнень цирозу печінки, що проявляються зниженням вмісту вітаміну Е в сироватці крові, м'язовою слабкістю, креатинурією та посиленням гемолізу еритроцитів. Зміни ці зв'язані із погіршанням всмоктування жирів у кишках.

Вітамін Е для людини і вищих тварин є потужним і головним жиророзчинним антиоксидантом. Його дія спрямована на посилення тканинного дихання .Токоферол служить "пасткою" для вільних радикалів – утворює з ними неактивні форми, які обривають вільнорадикальний ланцюг. Він також підвищує біологічну активність вітаміну А, -захищаючи його боковий ненасичений ланцюг від окиснення. Гіпервітамінозу Е в людини не виявлено.

У концентрованому вигляді токофероли одержують шляхом високовакуумної перегонки природних рослинних масел. Основними природними джерелами вітаміну Е служать зелене листя рослин, а також бавовняна, арахісова, соєва і пшенична олії. Хорошим джерелом цього вітаміну є також маргарин, приготований з рослинної олії.

Вітамін К (нафтохінони, антигеморагічний,або вітамін коагуляції)

До вітаміну К відносять дві групи хінонів, в яких бічні радикали – ізопренові ланцюги різної довжини. Вітамін $К_1$ (філохінон) має бічний ланцюг із чотирьох ізопренових ланок, знаходиться в рослинах. Вітамін $К_2$ (менахінон), виявлений у тварин, містить у бічному ланцюзі 6 ізопренових ланок. Вітамін $К_1$ (філохінон) вперше був виділений із люцерни. Вітамін К2 (менахінон) вперше був одержаний із гнилої рибної муки, де він синтезується мікрофлорою. Обидві різновидності вітаміну К нестійкі до нагрівання в лужному середовищі та опромінення. Вітамін $К_2$ відрізняється від $К_1$ тільки довжиною бічного ланцюга.

При нестачі вітаміну К виникають геморагії (крововиливи). Вони можуть бути підшкірні, внутрішньом'язові, внутрішньоорганні. Навіть незначні пошкодження судин можуть викликати великі кровотечі. У грудних дітей нерідко бувають значні підшкірні крововоливи і кровотечі. Схильність до геморагій у дітей найчастіше спостерігається в перші 5 днів від народження. Проте через 7-10 днів прояви гіповітамінозу минають, що пов'язано із заселенням кишечника мікро-флорою і синтезом нею вітаміну К. У дорослих людей гіповітаміноз К буває рідко: він частково синтезується мікрофлорою

товстої кишки, змішана рослинна їжа також містить в достатній кількості вітамін К.

Спільним для всіх жиророзчинних вітамінів є те, що вони можуть накопичуватись в організмі у великих кількостях. Тому їх відсутність у харчовому раціоні може не проявлятися на фізіологічному рівні протягом багатьох місяців. Гіповітаміноз К може виникати при порушеннях процесів всмоктування жирів у кишечнику або при тривалому вживанні антибіотиків, що мають здатність викликати дисбактеріоз у кишечнику. Порушення всмоктування жирів найчастіше буває за умов недостатнього синтезу або секреції жовчних кислот. При цьому погіршується всмоктування і жиророзчинних вітамінів, що може призводити до гіповітамінозу К.

Вітамін К, подібно до інших жиророзчинних вітамінів, утворюється в біологічних системах шляхом з'єднання залишків п'ятивуглецевого ізо-прену (2-метилбутадієну), які відіграють роль будівельних блоків для побудови різних жиророзчинних речовин. Роль вітаміну К у згортанні крові зумовлена його участю в утворенні протромбіну, який є неактивним попередником ферменту тромбіну, що перетворює білок плазми крові фібриноген у фібрин. Фібрин – нерозчинний волокнистий білок, що сприяє утворенню кров'яного згустка. Для того, щоб протромбін зміг активуватися і перетворитися в тромбін, він спершу повинен зв'язати іони кальцію. Нормальна молекула протромбіну містить декілька залишків особливої амінокислоти – гамма-карбоксиглутамінової кислоти, яка і зв'язує іони Ca2+. При нестачі вітаміну К місце залишків гамма-карбоксиглутамінової кислоти займають залишки звичайної глутамінової кислоти. Вітамін К є стимулятором біосинтезу ще декількох білків-ферментів, необхідних для нормального згортання крові: проконвертину (фактор VII), фактора Крістмаса (IX) і фактора Стюарта-Прауера (X).

Крім участі у згортанні крові, вітамін К має відношення до процесів тканинного дихання, стимулює транспорт електронів по дихальному ланцюзі, пригнічує вільнорадикальне перекисне окиснення. Вітаміни К, як і токоферол

та убіхінон, є ефективними "пастками" для супероксидного аніона-радикала (O2•) в клітинах:

Джерелом вітаміну К для людини служать рослинні (капуста, шпинат, ягоди горобини, калини, фрукти) і тваринні (печінка) продукти. Добова потреба в ньому для дорослої людини складає в середньому 2 мг. У практичній медицині вітамін К і його синтетичний аналог вікасол застосовують при кровотечах і кровоточивості, а також з метою попередження кровотеч після операції на печінці. Вагітним жінкам за шість-вісім днів перед пологами дають вітамін К з метою запобігання геморагіям у новонароджених. Дуже високі дози вітаміну К – токсичні.

Антивітаміном К є природна речовина дикумарол (дикумарин). Дикумарол викликає різке зниження вмісту протромбіну та інших факторів згортання крові, що призводить до кровотеч. Його застосовують у випадках підвищеного згортання крові (тромбози, тромбофлебіти) з метою його запобігання.

Експериментальна частина

Дослід №1. Якісна реакція на вітамін А

Хід роботи

У пробірку наливають 1мл вітаміну А і 1мл хлороформу. Перемішують і додають 1мл концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігають появу синього забарвлення

Дослід №2. Виділення каротиноїдів із зелених частин рослин

Принцип методу Каротиноїди виявляють в зелених частинах рослин шляхом відділення їх від хлорофілу, який маскує оранжеве забарвлення провітаміну А. з цією метою використовують метод паперової хроматографії.

Хід досліду. Готують наважку (3-5г) зеленої цибулі або іншого джерела каротиноїдів, яку поміщають у фарфорову ступку. Реально розтирають з 2г натрій сульфату, який зневоднює суміш. Додають 5мл етанолу, перемішують та фільтрують. У фільтрат занурюють низ хроматографічного паперу і залишають

на деякий час. Після того як фронт розчинника підніметься на 10 -12см, смужку паперу просушують на повітрі. Фіксують забарвлення окремих ділянок паперу.

Дослід №3. Якісна реакція на вітамін D

Вітамін D при взаємодії з аніліновим реактивом при нагріванні забарвлюється в червоний колір

Реактиви:

Хлороформ, анілін, хлоридна кислота концентрована, розчин брому у хлороформі

Хід роботи

А) реакція з хлоридною кислотою. В суху пробірку вносять 3-5 крапель риб'ячого жиру і 5 крапель хлороформу (або розчин вітаміну в олії), перемішують і додають 1мл суміші аніліну та концентрованої соляної кислоти (15:1). При нагріванні жовта емульсія набуває червоного забарвлення. Через 1-2 хв. Емульсія розділяється на два шари, нижній із яких забарвлений в інтенсивний червоний колір.

Б) реакція з бромом. В суху пробірку вносять5 крапель рибячого жиру або розчину вітаміну D в олії, додають 5 крапель розчину брому в хлороформі і перемішують. Суміш в пробірці поступово забарвлюється в зелено – голубий колір

Дослід №4. Якісна реакція на вітамін Е

Спиртовий розчин α – токоферолу окиснюється хлоридом феруму (III) у токоферилхінон і розчин забарвлюється у червоний колір

Реактиви:

0,1% спиртовий розчин токоферолу, 1% -ий р-н $FeCl_3$, нітратна кислота концентрована, сахароза

Хід роботи

А) В суху пробірку вносять 4-5 крапель 0,1% спиртового розчину токоферолу, потім додають 0,5мл 1% розчину хлориду феруму (III).

Отриманий розчин ретельно перемішують. Вміст пробірки набуває червоного кольору.

Б) До розчину вітаміну Е додають декілька крупинок сахарози і 10 крапель концентрованої нітратної кислоти. При перемішуванні спостерігається червоне забарвлення

Рекомендована література

1. Голубев В.Н., Чичева – Филатова Л.В., Шленская Т.В. Пищевые и биологически активные добавки. - М.: Издательский центр «Академия», 2003, - 208с.
2. Мархх А.Т. Биохимия консервирования плодов и овощей. - М.: «Пищевая промышленность», 1973, - 359с.
3. Смоляр В.І. Харчова експертиза. - К.: Здоров'я, 2005, - 448с.
4. Фан – Юнг А.Ф., Флауменбаум Б.Л., Изотов А.К. и др. Технология консервирования плодов, овощей, мяса и рыбы. - М.: «Пищевая промышленность», 1980, - 336с.
5. Щеглов Н.Г. Технология консервирования плодов и овощей. – М.: Издательство «Палеотип», 2002, - 380с.
6. Флауменбаум Б.Л., Танчев С.С., Гришин М.А. Основы консервирования пищевых продуктов. - М.: Агропромиздат, 1986, - 494с.