

TADEUSZ JERZYKOWSKI

## MODYFIKACJA METODY OZNACZANIA WITAMINY D PRZY POMOCY REAKCJI Z DWUCHLOROHYDRYNĄ

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Śląskiej AM  
Z Pracowni Toksykologicznej Instytutu Medycyny Pracy w Zabrze-Rokitnicy  
Kierownik: prof. dr St. Jóźkiewicz

Opublikowana przez *Sobela, Mayersa* i *Kramera* metoda oznaczania witaminy D znalazła zastosowanie w wielu zagadnieniach analizy steroli, chociaż pod względem czułości ustępuje powszechnie stosowanej metodzie z użyciem chlorku antymonu. Metoda wykorzystuje barwną reakcję pomiędzy witaminą D i alfa-dwuchlorohydryną, uaktywnioną chlorkiem acetylu. *Campbell* zmodyfikował metodę wyżej podanych autorów, zmieniając długość fali analitycznej (z 625 na 410 m $\mu$ ) i proporcje odczynnika do badanego roztworu (z 2 : 3 na 4 : 1), co zwiększyło czułość reakcji w stosunku do oryginalnej metody przeszło dwudziestokrotnie. Autor zmodyfikowanej metody uważa, że metodą w nowym ujęciu nadaje się głównie do oznaczania stężeń witaminy D<sub>3</sub>, przy czym również w stężonych roztworach olejowych.

Badając możliwości zastosowania różnych metod oznaczania witaminy D, przede wszystkim w celu analizy produktów fotochemicznych przemian prowitamin, zająłem się szczególnie zarówno oryginalną metodą *Sobela*, jak i jej modyfikacją w ujęciu *Campbella*. Na temat tej ostatniej metody chciałbym dodać kilka uwag pozwalających na jej szersze zastosowanie.

*Campbell* wykonywał pomiary przy użyciu spektrofotometru *Beckmanna*, sugerując jednakże, że jego metodę można przystosować do absorpcjometrów z filtrami. Próbując przeprowadzać jednak pomiary przy użyciu tego rodzaju aparatów (również spektrofotometrów *Coleman M 14* i *Coleman-junior*), stwierdziłem, że nie zachodzi w tych przypadkach, stwierdzona przez *Campbella*, liniowa zależność między stężeniem witaminy i absorpcją barwnego roztworu. Nasuwał się zatem wniosek, że do uzyskania zgodności z prawem Lamberta-Beera w zakresie analitycznej długości fali potrzebna jest dobra monochromatyczność użytej wiązki

światła. Z tego względu do pomiarów zastosowałem światło lampy rtęciowej z użyciem odpowiedniego filtra, przepuszczającego głównie linię rtęciową o długości fali 405 m $\mu$ . Pomiary w tych warunkach wykazały szereg dodatnich cech i jak to wynika z dalej przedstawionych doświadczeń, prawo liniowej zależności między absorpcją a stężeniem jest zachowane, i dla obu witamin D, i dla kilku innych pochodnych sterolowych, wchodzących w skład produktów fotochemicznej przemiany prowitamin.

#### METODYKA I WYNIKI POMIARÓW

Pomiary przeprowadzałem, używając preparatów czystych witamin D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> (f. Merck-Darmstadt i Duphar-Holandia) i czystych steroli: lumisterolu i ergosterolu (FOCH — Polska), 7-dehydrocholesterolu (L. Light — Anglia) i tachysterolu (Delta Chemical Works, Inc. — New York). Brałem przy tym pod uwagę możliwość oznaczania witaminy D w obecności towarzyszących steroli (ewentualnie w częściowo oczyszczonych preparatach na drodze chromatografii), w oparciu o znajomość współczynników ekstynkcyjnych związków, obecnych w badanej próbce.

Zastosowany w tej pracy przepis analityczny przedstawiał się następująco: do roztworu chloroformowego sterolu w ilości 2 ml dodaje się 8 ml odczynnika: alfa-dwuchlorohydryny z dodatkiem 1% chlorku acetylu\*. Szczelnie zatkaną probówkę z badaną próbką pozostawia się na pół godziny w łaźni wodnej o temperaturze 25°C. Po tym czasie wykonuje się natychmiast odczyt absorpcji (ekstynkcyjnej) przy użyciu fotometru Pulfricha z lampą HQE 40 i filtrem HgCd 405. Grubość kuwety: 2 cm.

Zarówno czas jak i temperaturę reakcji należy ściśle utrzymać dla uzyskania odtwarzalności wyników. Parametry te wynikają z analizy krzywych zależności absorpcji od czasu i temperatury. Przy temperaturze 25° absorpcja próbki z witaminą D<sub>2</sub> osiąga po 30 minutach rozległe maksimum (w ciągu ok. 10 min. utrzymuje się praktycznie ten sam poziom absorpcji), podczas gdy w tym samym czasie podobna krzywa dla ergosterolu wykazuje, po osiągnięciu wcześniejszego maksimum — płaskie minimum. Dla innych temperatur rozkład absorpcji jest mniej korzystny, biorąc pod uwagę ewentualne wykorzystanie metody w celu oznaczania witaminy.

Wyniki jednej serii doświadczeń przedstawione zostały w tabeli 1 ilustrującej liniową zależność absorpcji od stężenia w podanym zakresie stężeń. Z tabeli wynika również dogodny do badania zakres stężeń.

\* Odczynnik podstawowy powinien być przygotowany ze świeżo destylowanych składników (alfa-dwuchlorohydryną w próżni). Wszystkie odczynniki zastosowane w analizie muszą być czyste do analizy.

Tabela 1 — Table 1

Stężenie w $\gamma$ na ml barwnego roztworu 1)	Absorpcja (ekstynkcja) ** 2)					
	witaminy D <sub>3</sub> 3)	witaminy D <sub>2</sub> 3)	ergosterolu 4)	7-dehydro- cholesterolu 5)	tachysterolu 6)	lumisterolu 7)
5	0,254	0,218				
7	0,359	0,308				
10	0,519	0,442				
50			0,120	0,270	0,159	0,059
70			0,178	0,366	0,220	0,081
100			0,246	0,529 *	0,307	0,115

\* Wg Campbella 7-dehydrocholesterol powinien dawać niższą absorbcję od ergosterolu. Wyniki uzyskiwane jednak z preparatem „L. Light — Anglia“ powtarzają się w wielu moich pomiarach. Sprawa ta wymaga dalszego doświadczenia.

\*\* Podane wartości są średnimi z 5—7 oznaczeń przy czym rozrzut wyników pomiarów był w granicach 5% błędu względnego.

\* According to Campbell 7-dehydrocholesterol should give weaker absorption than ergosterol. However, the results obtained with the preparation „L. Light, England“ were reproduced in many of the measurements in this series. The matter requires further experiments.

\*\* The values cited are means of 5—7 estimations, and the distribution of the results of measurements was within the limits of 5% of the relative error.

Concentration in  $\gamma$  per ml. of the colored solution 1); Absorption (extinction) 2); vitamins 3); ergosterol 4); 7-dehydrocholesterol 5); tachysterol 6); lumisterol 7).

Należy jednak zaznaczyć, że podane wartości mogą się zmieniać jako liczby bezwzględne w zależności od aktywności odczynnika i jego przechowywania. Wpływ mogą mieć np.: sposób destylacji, ilość dodanego chlorku acetylu (związek lotny), zawartość wilgoci itp. Z tych względów ewentualne pomiary analityczne należy odnieść do pomiarów z standardowymi roztworami krystalicznej witaminy D (*Jerzykowski*).

#### WNIOSKI

Biorąc pod uwagę 10-krotne rozcieńczenie witamin w badanych próbkach w porównaniu z innymi, użytymi w doświadczeniach sterolami, można przyjąć, że oznaczenie zarówno witaminy D<sub>2</sub>, jak i D<sub>3</sub> da się przeprowadzić wobec wymienionych związków towarzyszących z wystarczającą dla wielu zagadnień dokładnością. Oczywistym warunkiem jest, aby wchodzące w rachubę zanieczyszczenia nie znajdowały się w ilościach przeważających.

*T. Ежиковски*

## МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА D ПУТЕМ РЕАКЦИИ С БИХЛОРИДРИНОМ

*Содержание*

Опираясь на работы Кэмпбелла, автор для получения более чувствительной аналитической реакции определения витамина D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> предлагает метод с α-бихлоргидрином для колориметрических измерений ртутных линий при волне равной 406 т м. Абсорбция растворов многократно больше, чем соответствующие данные оригинального метода при применении света в пределах 625 т м. В работе приведены условия хода анализа, предел подходящих концентраций и величина абсорбции витамина D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> по сравнению с абсорбцией других стеролов, входящих в состав продуктов облучения светом провитаминов: эргостероля, 7-дегидрохолестероля, люмистероля и тахистероля.

*T. Jerzykowski*

## A MODIFICATION OF THE METHOD FOR ESTIMATING VITAMIN D BY MEANS OF THE REACTION WITH DICHLOROHYDRIN

*Summary*

With the purpose of obtaining a more sensitive analytical reaction for estimating vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> by the method employing alpha-dichlorohydrin, and basing on the work of Campbell, the author proposes use of the mercury line at wavelength 406 mμ for colorimetric measurements. Absorption of solutions is more than ten times greater as compared with the corresponding values obtained with the original method employing a light band in the 625 mμ range. Conditions for performing the analysis are described in this paper, as well as the range of convenient concentrations and absorption values of vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> compared with absorption by other sterols entering into the composition of the products of irradiation of provitamins: ergosterol, 7-dehydrocholesterol, lumisterol, and tachysterol.

### PIŚMIENICTWO

1. Campbell J. A.: Analytical Chemistry, 1948, 20, 766.
2. Jerzykowski T.: Acta Physiol. Pol. 1961, XII, 5, 771.
3. Pirlot G., Rouir E.: Bull. Soc. Chim. Belges, 1947, 56, 296, cyt. wg Snell C. T. Snell F. D.: Colorimetric Methods of Analysis, Toronto—New York—London, 1954.
4. Rouir E.: Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, 234.
5. Sobel A., Mayer A., Kramer B.: Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition, 1945, 17, 160.

Otrzymano: 4. 11. 1960.

Adres autora: Zakład Chemii Fizjologicznej Śląskiej Akad. Med. Zabrze-Rokitnica, ul. K. Marksa 19.