

TADEUSZ JERZYKOWSKI

UWAGI O REAKCJI ANALITYCZNEJ DWUCHLOROHYDRYNY Z WITAMINEM D

Z Pracowni Toksykologicznej Instytutu Medycyny Pracy
i z Zakładu Chemii Fizjologicznej Śląskiej A. M. w Zabrze-Rokitnicy
Kierownik: doc. dr St. Józkiwicz

W roku 1945 *Sobel*, *Mayer* i *Kramer* podali metodę oznaczania witaminów D przy pomocy α -dwuchlorohydryny. Metoda polega na ilościowym oznaczeniu intensywności zielonego zabarwienia, jakie daje odczynnik uaktywniony chlorkiem acetylu z witaminem D₂ i D₃. Odpowiednio dobrane warunki analityczne pozwalają na uzyskanie wysokiej czułości metody i na ograniczenie wpływu kilku innych steroli, dających również zabarwienie z dwuchlorohydryną.

Pomijając tu bliższą krytyczną analizę tej metody, a zwłaszcza porównanie jej z powszechniej stosowaną metodą przy użyciu chlorku antymonu — co wymagałoby obszerniejszej publikacji — należy stwierdzić, że dla pewnych zagadnień biochemii sterydów reakcja z dwuchlorohydryną jest bardziej przydatna. Na podstawie własnych doświadczeń i opierając się na danych *Pirlota* i *Rouira*, uważam, że metoda z dwuchlorohydryną może mieć istotną wartość przy badaniu fotochemicznej przemiany wytwarzania witaminu D.

Przy zachowaniu jednak warunków oryginalnej metody *Sobela* i współpracowników, i również modyfikacji tej metody, dokonanej przez *Rouira*, absorpcja (ekstynkcja, E) barwnych roztworów nie jest proporcjonalna do stężenia (C) witaminu. Wyniki odczytuje się z krzywej $E=f(C)$. Reakcja jest jednak przy tym kapryśna, zależna w dużej mierze od wielu (trudnych do uchwycenia) czynników, co stwarza trudność w posługiwaniu się krzywą zależności absorpcji roztworu od stężenia. Jak wykazałem w swoich doświadczeniach niedogodność tę można usunąć przeprowadzając analizę przy użyciu bardziej rozcieńczonych roztworów witaminu w grubszych warstwach — w porównaniu z wartościami podanymi przez wyżej wymienionych autorów*. Przy zachowaniu pozostałych warunków analitycznych oryginalnej metody, prawo Lamberta-Beera zgadza się dobrze

w zakresie stężeń od 0,02 mg/ml do 0,09 mg/ml ** (grubość warstwy 5 cm). Wobec proporcjonalności między stężeniem i absorpcją można przeprowadzać równoległe pomiary próbki badanej z próbką witaminu o znanym stężeniu, a wynik oznaczenia obliczać z prostej zależności matematycznej. Ten sposób oznaczenia eliminuje w dużej mierze wiele przypadkowych błędów, związanych ze zmianą aktywności podstawowego odczynnika, zmianą czystości pozostałych odczynników itp.

Do pomiarów zastosowano fotometr Pulfricha, gdyż przy użyciu kilku innych dostępnych fotometrów i spektrofotometrów nie można było przeprowadzić pomiarów w warstwach o grubości 5 cm, nie można było zatem uzyskać odpowiedniego rozcieńczenia witaminu. Fotometr Pulfricha z dodatkowym wyposażeniem do pomiarów w tzw. małych kuwetach pozwala również na oznaczenia przy użyciu niewielkiej ilości badanych roztworów, co w badaniach biologicznych ma niemałe znaczenie. Do pomiarów użyto filtra S61, odpowiadającego przepuszczalnością zakresowi ustalonemu przez Sobela i wsp.

Poniżej przytaczam przepis analityczny mało rozpowszechnionej metody z dwuchlorohydryną, uwzględniając proponowane zmiany (rozcieńczenie, grubość warstwy, aparat, pomiar ze standartem).

ZMODYFIKOWANY PRZEPIS ANALITYCZNY

Odczynniki ***:

1. Odczynnik podstawowy: α -dwuchlorohydryna (1,3-dwuchloropropanol-2) z dodatkiem 1% chlorku acetylu. Dwuchlorohydrynę cz. do analizy lub cz. należy przed przyrządzeniem odczynnika przedestylować w próżni (temp. wrzenia 72–76°C przy ciśn. ok. 14 mm Hg). Chlorek acetylu cz. należy również przedestylować przed przyrządzeniem odczynnika.

2. Chloroform cz. do analizy.

3. Roztwór standartowy witaminu D₂ w chloroformie. Roztwór przygotowuje się przed wykonaniem serii pomiarów z krystalicznego witaminu D₂. Stężenie w granicach od 0,03 do 0,05 mg/ml.

Przyrządy:

Fotometr Pulfricha z wyposażeniem do pomiaru w tzw. małych kuwetach. Kuwety o grubości 5 cm. Filtr S 61.

* Jak można wywnioskować tylko z wykresów podanych w pracach wymienionych autorów — Sobel i wsp. przeprowadzali pomiary stężeń witaminu do wartości ok. 0,27 mg/ml, a Rouir do wartości ok. 0,45 mg/ml (grubość warstwy 1,3 i 1,0 cm).

** Odstępstwa od wymienionego prawa w podanym zakresie nie większe od błędu odczytu. Dolna granica podanego zakresu stężeń przy pomiarach w warstwach o grubości 5 cm wynika z optymalnego zakresu mierzonych absorpcji, ale w przypadku zastosowania fotometru Pulfricha, przez odpowiedni sposób odczytu, może być znacznie obniżona (np. zastosowanie szarych filtrów).

*** Autor stosował następujące odczynniki: α -dwuchlorohydrynę f. „Merck”, preparaty dostarczone przez BOO—Gliwice, własne preparaty i inne; chlorek acetylu cz. „FOCh”, własne preparaty; chloroform cz. d. a. i cz. „FOCh”; witamin D₂ kryst. f. „Merck” i f. „Duphar”.

Chloroformowy roztwór witaminu D₂ w ilości 3 ml, o stężeniu witaminu do 0,09 mg/ml, zadaje się 2 ml podstawowego odczynnika. Probówkę z badaną próbką pozostawia się w termostacie w temp. 25°C na dokładnie 25 minut. Po tym czasie wykonuje się natychmiast pomiar w fotometrze, używając jako odnośnika (roztworu kompensacyjnego) mieszaniny 3 ml chloroformu i 2 ml aktywnej dwuchlorohydryny. Równolegle z próbką badaną (z założonym opóźnieniem) wykonuje się pomiar z porównawczym (standartowym) roztworem witaminu, używając tego samego roztworu kompensacyjnego.

Stęż. witaminu w próbce badanej = $\frac{E_b}{E_s} \cdot C_s$, gdzie:

- C_s — stężenie witaminu w próbce standartowej,
 E_b — absorpcja (ekstynkcja) próbki badanej,
 E_s — absorpcja (ekstynkcja) próbki standartowej.

WPLYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW NA WYNIKI POMIARÓW

Posługując się metodą wyżej opisaną należy mieć na uwadze czynniki, jakie mogą wpływać na wyniki pomiarów absorpcji i na wynik ilościowego oznaczenia witaminu. Oczywiście, ze względu na wielkość błędu oznaczenia konieczne będzie ograniczenie każdego niekorzystnego wpływu. Szczególnie istotna będzie znajomość wpływu substancji, które znajdują się najczęściej w badanych preparatach witaminu. W tym przypadku bowiem wpływ o którym mowa dotyczy tylko wartości E_b podanego wyżej wzoru.

Wpływ odczynników: Na wynik pomiarów absorpcji wyraźny wpływ mają wszystkie stosowane odczynniki. Dwuchlorohydryna powinna być całkowicie bezbarwna i w tym celu najlepiej przedestylować ją w próżni przed przyrządzeniem odczynnika. Należy jednak zaznaczyć, że po pewnym czasie (kilka tygodni do kilku miesięcy) odczynnik staje się żółty lub brunatniejszy; konieczna jest wówczas ponowna destylacja w próżni i oczywiście ponowne dodanie chlorku acetylu w celu aktywacji (świeżo destylowana dwuchlorohydryna nie daje reakcji z witaminem).

Aktywność tak przyrządzonego odczynnika może być różna, zależna np. od sposobu destylacji, przechowywania, drobnych zmian w ilości chlorku acetylu itp. Wyniki pomiarów absorpcji w odniesieniu do określonych stężeń witaminu mogą się zatem zmieniać z czasem, znacznie w przypadku przygotowania nowej porcji odczynnika. Należy jednak podkreślić, że tego rodzaju zmiany nie mają praktycznie żadnego wpływu na wyniki oznaczenia witaminu metodą podaną w tej pracy.

Również chloroform użyty jako rozpuszczalnik dla witaminu posiada wyraźny wpływ na pomiary absorpcji. Używanie chloroformu czystego (FOCh) okazało się bardzo niekorzystne. Również chloroform specjalnie

oczyszczony głównie w celu usunięcia alkoholu, przez płukanie wodą, suszenie i destylację, powodował brak powtarzalności pomiarów, prawdopodobnie na skutek szybkiego wytwarzania się w nim fosgeny. Najlepsze rezultaty uzyskano z chloroformem cz. do analizy (FOCh).

Obecność w odczynnikach wody i alkoholu wpływa znacznie na wyniki mierzonych absorpcji. Z tego względu zawartość tych substancji w badanych próbkach jest niedopuszczalna (z wyjątkiem małych ilości alkoholu w chloroformie cz. d. a.).

Wpływ czasu reakcji analitycznej i temperatury. Czas reakcji — od chwili dodania odczynnika do chwili pomiaru — musi być ściśle utrzymany. Wynika on z danych piśmiennictwa i również z własnych doświadczeń. Należy tu podać, że w przepisany czasie reakcja barwna z dwuchlorohydryną osiąga maksimum, przy słabym rozwinięciu lub zaniku ubocznych reakcji z innymi sterolami (oczywiście przy zachowaniu innych, podanych warunków analizy).

Wahania temperatury w granicach temperatur pokojowych nie wywierają wprawdzie znacznego wpływu na przebieg reakcji witaminu z dwuchlorohydryną, wpływ ten jednak uwydatnia się w stosunku do steroli, mogących stanowić domieszkę witaminu. W związku z tym reakcję analityczną należy przeprowadzać w stałej temperaturze.

Wpływ substancji stanowiących najczęściej zanieczyszczenia badanych próbek: Wpływ innych steroli, poza witaminem D₂, na przebieg reakcji z dwuchlorohydryną jest bardzo istotny i wymaga uwzględnienia w przypadku oznaczania nieczystych roztworów witaminu. Ergosterol* świeżo krystalizowany daje w opisanych warunkach przeprowadzania analizy do 50% tej absorpcji, jaką uzyskuje się przy użyciu witaminu o tym samym stężeniu. Również tego samego rzędu wartości daje lumisterol. Te substancje nie przeszkadzają zatem praktycznie oznaczeniu witaminu D₂ — o ile nie znajdują się w ilościach przeważających. Natomiast tachysterol w wyniku reakcji analitycznej daje przeszkadzający silny odczyn z dwuchlorohydryną, jednakże wpływ tego związku może być bardzo znacznie ograniczony — zgodnie z danymi *Pirlota* i *Rouira* — przez kondensację z bezwodnikiem kwasu cytrakonowego. Przebieg analizy będzie w tym przypadku następujący: Do 0,5 ml badanej próbki w benzenie (stężenie witaminu w próbce do 0,6 mg/ml) dodaje się 0,5 ml 1,4% bezwodnika kwasu cytrakonowego w benzenie. Probówkę z badany roztworem zamyka się szczelnie, wypędzając z niej uprzednio tlen przy pomocy dwutlenku węgla, i pozostawia w ciemności na pół godziny. Po tym czasie benzen odparowuje się w próżni do sucha (próbówka zanurzona w ciepłej wodzie),

* Stosowane w badaniach odczynniki: ergosterol („FOCh”, „Merck”), lumisterol („FOCh”), tachysterol („Delta Chemical Corp.” USA), benzen cz. d. a. („FOCh”), bezwodnik kwasu cytrakonowego („Schuchhardt”).

a pozostałość zadaje 3 ml chloroformu i 2 ml podstawowego odczynnika. Dalszy ciąg analizy wg przepisu wyżej podanego. Równolegle z próbką badaną wykonuje się wszystkie podane czynności z standartowym roztworem witaminu (w benzenie).

Na podstawie wstępnych doświadczeń mogę wnioskować, że prekalcyferol i witamin D₂ dają podobne wartości absorpcji po reakcji z dwuchlorohydryną (ogrzewany roztwór witaminu bez dostępu powietrza i światła nie zmienia wartości absorpcji po reakcji z tym odczynnikiem). W tym przypadku może to być dla pewnych badań korzystne, gdyż prekalcyferol pozostaje prawdopodobnie w równowadze z witaminem D₂ i zgodnie z tym poglądem można go uważać za potencjalny witamin.

Suprasterole lub toksysterol reagują prawdopodobnie silniej z dwuchlorohydryną od witaminu D₂. Naświetlany bowiem witamin daje w wyniku reakcji analitycznej wyższe absorpcje, niż to wynikałoby z jego stężenia. Obecność wymienionych zanieczyszczeń w badanych próbkach jest zatem niedopuszczalna.

Cholesterol nie daje reakcji z dwuchlorohydryną. Reagują natomiast silnie z tym odczynnikiem karotenowce.

Oznaczenie witaminu D₂ w obecności związków wpływających na reakcję z dwuchlorohydryną należy poprzedzić oczyszczeniem lub częściowym oczyszczeniem badanych próbek, np. przez zastosowanie chromatografii.

Т. Ежиковски

ЗАМЕЧАНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО АНАЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ДИХЛОРОГИДРИНА С ВИТАМИНОМ D

Содержание

В представленной работе автор приводит простой метод избежания основного источника ошибок при определении витамина D₂ по методу Собеля и соавторов. В работе обсуждено также влияние различных факторов (реактивы, загрязнения исследуемых образцов) на результаты определения по предложенному методу.

Т. Jerzykowski

NOTES ON THE ANALYTICAL REACTION OF DICHLOROHYDRIN WITH VITAMIN D

Summary

A simple procedure is described of how to eliminate the main source of errors in determining Vitamin D by the method of Sobel et al.

The paper also deals with the effects of various factors (reagents, contaminations in the samples) on the determinations made by the method referred to.

PIŚMIENICTWO

1. *Pirlot G., Rouir E.*: Bull. soc. Chim. Belg., 1947, 56, 269; cyt. wg: *Snell F. D., Snell C. T.*: Colorimetric Methods of Analysis, Toronto—New York—London, 1954.
2. *Rouir E.*: Bull. soc. chim. Biol., 1952, 34, 234.
3. *Sobel A., Mayer A., Kramer B.*: Industrial a. Engineering Chemistry, Analytical Edition, 1945, 17, 160.

Otrzymano: 24. 5. 1961.

Adres autora: Zakład Chemii Fizjologii Śląskiej A. M. Zabrze-Rokitnica, ul. K. Marksa 19.