

JANINA PIEKARSKA, JERZY KOWALSKI

OZNACZANIE WITAMINY D W ROZTWORACH OLEJOWYCH

Z Zakładu Higieny Żywnienia Akademii Medycznej w Warszawie

Stosowane metody chemicznego oznaczania witaminy D obejmują zasadniczo następujące etapy: 1) zmydlanie, 2) ekstrakcję niezmydlonej pozostałości zawierającej witaminę D, 3) oczyszczanie niezmydlonej pozostałości, mające na celu usunięcie związków towarzyszących witaminie D, a przeszkadzających w jej oznaczeniu, 4) właściwe oznaczanie witaminy D (kolorymetryczne albo spektrofotometryczne).

Ostatnie dwie fazy postępowania analitycznego następują najczęściej z trudnością. Stosowane metody oznaczania witaminy D różnią się między sobą zasadniczo sposobem rozwiązywania tych dwu zagadnień tj. w oczyszczaniu witaminy D i we właściwym oznaczeniu.

Witamina D występuje prawie zawsze wraz z różnymi związkami przeszkadzającymi w jej oznaczeniu. Wiele z nich daje reakcje z odczynnikami stosowanymi do oznaczania witaminy D albo ma podobne maksima absorpcji w analizie spektrofotometrycznej. Toteż wysiłki analityków koncentrowały się głównie na wynalezieniu specyficznej reakcji barwnej, a wobec braku takowej na metodach jak najlepszego oczyszczania witaminy D przed oznaczeniem kolorymetrycznym czy spektrofotometrycznym.

Opisano wiele reakcji barwnych witaminy D z różnymi odczynnikami, ale tylko kilka z nich znalazło szersze zastosowanie. Powszechnie stosowana jest reakcja z chlorkiem antymonawym, opisana po raz pierwszy przez *Brockmanna* i *Chena* (1). W oparciu o tę pracę *Niedl* i wsp. (2) zmodyfikowali odczynnik, stosując ok. 20% chloroformowy roztwór $SbCl_3$ z dodatkiem ok. 2% chlorku acetylu. Na tej samej reakcji oparli *De Witt* i *Sullivan* (3) rozpuszczali jednak chlorek antymonawy z chlorku etylenu. Oba te odczynniki, a zwłaszcza odczynnik *Nielda* i wsp., są w dość powszechnym użyciu; stosują go *Green* (4), *Shaw*, *Jefferies* i *Holt* (5), *Stross* i *Brealey* (6) i inni. *Garkina* i *Bukin* (7) posługują się zasadniczo podobnym odczynnikiem, z tym jednak że chlorek acetylu dodają kroplami bezpośrednio do kiuwety przy oznaczaniu kolorymetrycznym.

Odczynniki z $SbCl_3$ dają z witaminą D pomarańczowe zabarwienie, którego natężenie jest proporcjonalne do ilości witaminy D. Jednak reakcja ta nie jest specyficzna. Związki pokrewne witaminie D dają podobne lub identyczne zabarwienie o różnym nasileniu. Może to wpływać na wyniki oznaczeń np. witamina A tworzy z omawianym odczynnikiem bardzo intensywne ciemnoniebieskie zabarwienie całkowicie maskujące reakcję witaminy D.

Tschapke i *Plessing* (8) opracowali metodę kolorymetrycznego oznaczania witaminy D przy zastosowaniu 1% roztworu chlorku cynawego w chlorku acetylu. W wyniku reakcji powstaje żółte zabarwienie, którego natężenie mierzy się na fotokolorymetrze Pulfricha.

Sobel i wsp. (9) do oznaczania witaminy D używali dwuchlorhydrinę glicerolu w obecności chlorku acetylu jako związku aktywującego odczynnik który daje żółte zabarwienie zmieniające się na zielone po kilku minutach. Istnieje opinia, że wadą odczynnika jest mała czułość nawet w modyfikacji Campella (10), który tę czułość zwiększył dwudziestokrotnie.

Ponieważ żadna z reakcji barwnych nie jest specyficzna dla witaminy D, konieczne jest jej oczyszczanie. Przede wszystkim należy usunąć witaminę A, o ile jest obecna. Poza tym należy pozbyć się towarzyszących witaminie D steroli jak ergosterol, 7-dehydrocholesterol, lumisterol, suprasterole i innych, oraz tachysterolu. Wymienione sterole poza tachysterolem dają reakcję barwną z $SbCl_3$, jednak intensywność zabarwienia jest sto razy mniejsza niż witaminy D (5). Natomiast tachysterol daje reakcję pod każdym względem podobną jak witamina D. Wg Shaw i wsp. w produktach naświetlania ergosterolu może znajdować się go od 5 — 15%. Dlatego też usuwanie tachysterolu przy oznaczaniu witaminy D w produktach naświetlania ergosterolu jest bardzo ważnym etapem analizy. Najczęściej osiąga się to przez kondensację z bezwodnikiem maleinowym albo cytrakonowym (4 7). Stosowane są również w tym celu metody chromatograficzne (3, 5, 12).

Usuwanie ergosterolu i 7-dehydrocholesterolu przeprowadza się na ogół przez wytrącanie digitoniną.

Pozostałe produkty naświetlania nie mają większego wpływu na wynik analizy (4, 11).

Jak widać z tego krótkiego przeglądu oznaczanie chemiczne witaminy D jest ciągle otwarte.

Celem naszej pracy była adaptacja lub modyfikacja którejs z metod chemicznego oznaczania witaminy D. W pierwszej części pracy zajęliśmy się oznaczaniem witaminy D w olejowych roztworach stosowanych w lecznictwie.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

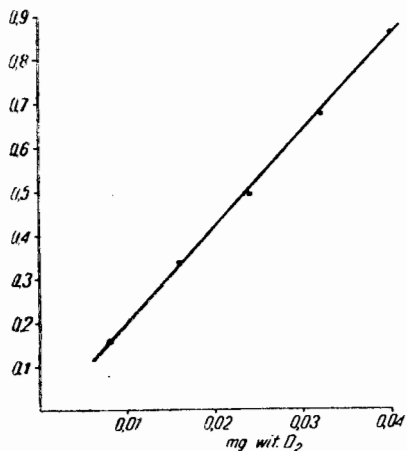
Reakcja barwna. Pierwszym etapem pracy był wybór reakcji barwnej. Postanowiliśmy wypróbować przydatność metody Tschapke i Plessinga (8) oraz metody Niolda (2) przy użyciu fotokolorymetru Pulfricha.

Po wyborze reakcji barwnych sporządziliśmy krzywe standartowe, używając do tego celu czystej krystalicznej witaminy D rozpuszczonej w chloroformie. Oznaczenia kolorymetryczne wykonywaliśmy na fotokolorymetrze Pulfricha przy użyciu 1 cm kiuwet i filtru S 50. Odczytów dokonywaliśmy w czwartej minucie od chwili dodania odczynnika do roztworu witaminy D w przypadku odczynnika z $SbCl_3$, a w trzeciej minucie przy odczynniku z $SnCl_2$. Każdy punkt na krzywej wyznaczaliśmy po sporządzeniu średniej z trzech odczytów ekstynkcji dla każdego rozcieńczenia. Poniżej przytaczamy dwie krzywe uzyskane przy pomocy obu odczynników.

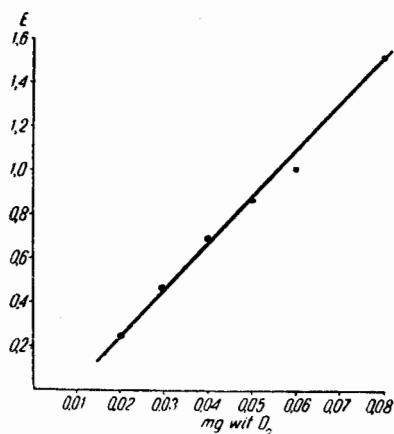
Z wielu prac w piśmiennictwie wynika, że odczynnik Niolda i wsp. jest trwałe i odtwarzalny. W naszych badaniach sporządziliśmy wiele krzywych przy użyciu kilkakrotnie przygotowanych odczynników i przy użyciu odczynników po różnym okresie przechowywania (nawet trzy miesiące). Wprawdzie wystąpiły nieznaczne różnice w nachyleniu krzywych, jednak analiza statystyczna wykazała, że są one nieznaczne.

Wkrótce po rozpoczęciu pracy przekonaliśmy się, że odczynnik zawierający chlorek cynawy w chlorku acetylu działa silnie drażniąco na drogi oddechowe i powoduje znaczną korozję aparatury.

Natomiast odczynnik Nielda, w porównaniu z poprzednim, wykazuje te cechy w nieznacznym tylko stopniu.



Ryc. 1. Krzywa standartowa otrzymana przy użyciu odczynnika z $SbCl_3$



Ryc. 2. Krzywa standartowa otrzymana przy użyciu odczynnika z $SnCl_2$

Chromatograficzne oddzielenie związków towarzyszących witaminie D. W następnym etapie pracy zajęliśmy się oczyszczaniem witaminy D od tych związków towarzyszących, które przeszkadzają w reakcji barwnej.

Oddzielanie przeprowadzaliśmy chromatograficznie przy pomocy aktywowanego talku według metody Tschapke i Plessinga (15). Próbowaliśmy zastosować również inne niż talk adsorbenty, jak bentonit, aktywowany według Garkinej i Bukina (7) oraz kaolin zalecany przez Tschapke i Plessinga (14). Jak się jednak okazało, adsorbowały one znaczne ilości witaminy D i, przy stosowanych sposobach aktywacji, nie nadawały się do jej oznaczania. Być może wyniki takie spowodowane były różnicami w adsorbentach pochodzących z różnych źródeł.

Przeprowadzaliśmy również badania nad przydatnością talku do chromatograficznego oczyszczania witaminy D.

Po pierwsze sprawdziliśmy, stosując roztwory chloroformowe czystego kalcyferolu, że talk zupełnie nie adsorbuje witaminy D.

Oddzielanie produktów rozkładu witaminy D. Poddawaliśmy analizie chromatograficznej i kolorymetrycznej różne próbki krystalicznej witaminy D przechowywanej przez dłuższy czas w warunkach sprzyjających jej rozkładowi. Wyniki przedstawia tabela I.

Jak widać z powyższych danych część produktów rozkładu nie daje wcale reakcji barwnej z $SbCl_3$. Przynajmniej znaczna część produktów rozkładu witaminy D, dająca reakcję barwną jest adsorbowana przez talk. Według *Strossa* i wsp. (6) odczynnik Nielda, praktycznie biorąc, nie daje reakcji z produktami rozkładu witaminy D, podczas gdy *Evers* i *Smith* twierdzą, że ta reakcja powstaje. Jak widać zdania na ten temat są roz-

Tabela I
Adsorpcja produktów rozkładu witaminy D na aktywowanym talku

Nr próbki	Naważka częściowo rozłożonej witaminy D użytej do analizy mg	Wynik oznaczenia przed chromatografią mg	Wynik oznaczenia po chromatografii mg	Odsetek zaadsorbowanych produktów rozkładu dających reakcję barwną
1	1,5	1,22	1,10	11,0
2	2,0	1,35	1,20	11,0
3	2,0	1,60	1,45	9,4
4	2,0	1,80	1,62	9,1

bieżne. Z naszych analiz wynika, że znaczna część produktów rozkładu daje reakcję barwną z $SbCl_3$ i jest adsorbowana przez talk.

Oddzielanie fitosteroli i innych związków frakcji niezmydlającej się olejów. W preparatach olejowych o niezbyt dużej koncentracji witaminy D drugim czynnikiem obok produktów rozkładu witaminy D, mogącym wpływać na wynik analizy, jest obecność fitosteroli i innych związków frakcji niezmydlającej się olejów dających reakcję barwną z $SbCl_3$. Aby oznaczyć czy i w jakim stopniu frakcja niezmydlająca się oleju przeszkadza w oznaczeniach, przeprowadziliśmy następujące doświadczenie. Pod uwagę wzięliśmy trzy rodzaje olejów, często stosowanych jako rozpuszczalniki do olejowych roztworów witaminy D. Były to: olej sojowy, arachidowy i oliwa. Do frakcji niezmydlającej się oleju, ilościowo odpowiadającej 2 g oleju, dodawaliśmy odmierzoną ilość witaminy D i robiliśmy oznaczenia przed i po chromatografii. Wyniki przedstawiamy w tabeli II.

Tabela II
Adsorpcja fitosteroli na aktywowanym talku

Rodzaj oleju	Ilość dodanej witaminy D		Wynik oznaczenia przed chromatografią		Wynik oznaczenia po chromatografii	
	mg	%	mg	%	mg	%
Sojowy	1,225	100	1,310	107	1,235	101
Arachidowy	0,825	100	0,975	118	0,835	103
Oliwa	1,135	100	1,335	117	1,160	102

Jak wynika z powyższych danych, zastosowanie chromatografii na talku prawie zupełnie usuwa wpływ fitosteroli i innych związków frakcji niezmydlającej się na wynik analizy.

Do usuwania produktów rozkładu witaminy D i fitosteroli bywa stosowana chromatografia na tlenku glinu. Zalecają ten adsorbent *Stross* i *Brealey* (6) oraz *Shaw* i *Jefferies* (5). Chromatografię na mieszaninie tlenku magnezu i ziemi okrzemkowej poleca *De Witt* i *Sullivan* (3). Powyższe metody, bardzo szczegółowo opracowane pozwalają na dobre oddzielenie witaminy D od produktów naświetlania ergosterolu lub 7-dehydrocholesterolu oraz od produktów rozkładu witaminy D i fitosteroli, są jednak skomplikowane i raczej nie nadają się do rutynowych oznaczeń witaminy D. Natomiast niezwykle prosta i szybka chromatografia na

aktywowanym talku, dająca dobre wyniki, może być z powodzeniem używana do tego celu.

Na podstawie przytoczonych powyżej danych uważamy za słuszne wprowadzenie chromatografii na talku do metody oznaczania witaminy D.

Wyniki oznaczania witaminy D w roztworach olejowych kalacyferolu. Po opracowaniu najtrudniejszych etapów oznaczania witaminy D, przystąpiliśmy do analizy preparatów olejowych. Były to dwie serie Devitolu produkowanego przez Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne i preparat f-my Philips-Roxane, znajdujące się u nas na rynku. Deklarowana zawartość witaminy D wynosiła w obu preparatach 15 000 jednostek międzynarodowych w 1 ml.

Przeanalizowaliśmy kilkakrotnie tę samą próbkę Devitolu i preparatu f-my Philips-Roxane. Oznaczenia przeprowadziliśmy przy pomocy odczynnika Nielda. Ilość witaminy D obliczaliśmy z krzywej standartowej sporządzonej dla czystego roztworu witaminy D. Otrzymaliśmy następujące wyniki.

Tabela III
Zawartość witaminy D w mg/g preparatu
(deklarowana zawartość 0,375 mg/ml)

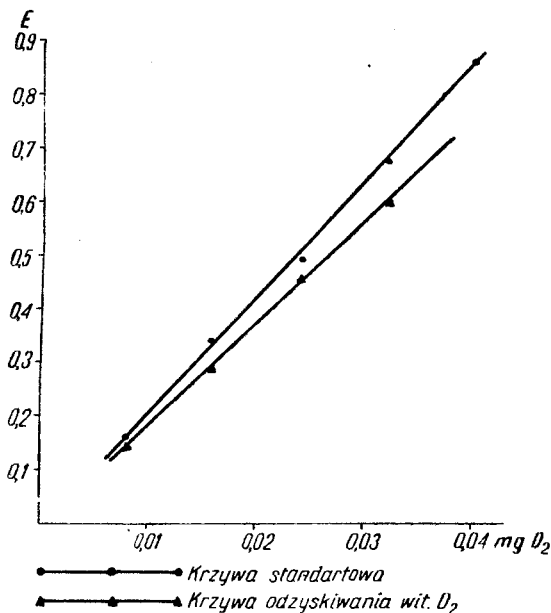
Preparat f-my Philips-Roxane	Devitol Nr serii 50158	Devitol Nr serii 30258
0,42	0,37	0,54
0,39	0,34	0,54
0,42	0,38	
0,41	0,39	
0,42	0,34	
0,42	0,34	
0,42		
0,42		
śr. 0,415 = = 0,38 mg/ml	śr. 0,36 = = 0,33 mg/ml	śr. 0,54 = = 0,49 mg/ml

Jak widać z tabeli, odczynnik Nielda daje dobrą odtwarzalność wyników.

Następnie staraliśmy się określić wielkość strat witaminy D w czasie analizy. W tym celu do stałej ilości preparatu f-my Philips-Roxane dodaliśmy wzrastające ilości witaminy D i następnie oznaczaliśmy jej odzyskiwanie. Odzyskiwanie witaminy D przedstawiamy w formie krzywej. Każdy punkt krzywej wyznaczony jest na podstawie trzech oznaczeń.

Na podstawie wykonanych oznaczeń odzyskuje się średnio 89% dodanej witaminy D. Znaczy to, że 11% witaminy D ginie w czasie analizy. Należałoby zatem wszystkie wyniki analizy, obliczone na podstawie krzywej standartowej zwiększyć o 11%. Można by również odczytywać zawartość witaminy D z krzywej odzyskiwania przedstawionej na ryc. 3, a nie z krzywej standartowej wykreślonej na podstawie roztworów czystego kalacyferolu, poddanych tylko analizie kolorymetrycznej. Po zwiększeniu naszych wyników o 11% oznaczone ilości witaminy D w badanych pre-

paratach wynoszą: w preparacie f-my Philips-Roxane — 0,42 mg/ml, w Devitolu Nr serii 50158 — 0,37 mg/ml, w Devitolu Nr serii 30258 — 0,54 mg/ml, wobec deklarowanej dla każdego z preparatów ilości 0,375 mg/ml.



Ryc. 3. Krzywa odzyskiwania witaminy D_2 .

PROPONOWANA METODA OZNACZANIA WITAMINY D W ROZTWORACH OLEJOWYCH

Odczynniki.

Chloroform. Chloroform, dla usunięcia dodanego dla utrwalenia alkoholu, przemywa się kilkakrotnie wodą, potem suszy nad bezwodnym chlorkiem wapnia i destyluje, odrzucając pierwsze i ostatnie 10%. Chloroform należy przygotowywać przed każdym oznaczeniem. **Eter.** Eter wolny od nadtlenu, świeżo destylowany. **2n alkoholowy roztwór KOH.** 11,2 g KOH rozpuścić w 10 ml wody, dopełnić 96% alkoholem do 100 ml. Przyrządzać codziennie świeży. **5% wodny roztwór KOH.** Odczynnik z $SbCl_3$. Jest to chloroformowy 20% roztwór $SbCl_3$ z dodatkiem 2% chlorku acetylu. Dla usunięcia wilgoci $SbCl_3$ uciera się z bezwodnym chlorkiem wapnia w stosunku 2 : 1. Następnie $SbCl_3$ rozpuszcza się przez wytrząsanie w chloroformie, po rozpuszczeniu szybko przesącza się i dodaje 2% chlorku acetylu. **2% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny.** **Aktywowany talk.** Do 100 g talku dodaje się 500 ml 2n HCl i ogrzewa utrzymując w stanie wrzenia przez 20 min. Następnie przemywa się gorącą wodą do obojętnego odczynu popłuczyn. Potem suszy się w 100° przez kilkanaście godz. Po wysuszeniu należy talk dokładnie sproszkować.

Wykonanie oznaczenia. Do około 2 g badanego preparatu dodać 50 ml alkoholowego roztworu KOH. Zmydlać przez 15 min. na wrzącej łaźni wodnej. Po zmydleniu natychmiast ochłodzić i przelać do rozdzielacza. Popłukać kolbę po zmydleniu trzykrotnie wodą i popłuczyny zlać do rozdzielacza. Ekstrahować trzy razy 40 ml eteru. Ekstrakty eterowe zlać do rozdzielacza i przemyć 40 ml 5% wodnego roztworu KOH. Następnie przemywać ekstrakt 50 ml porcjami wody, aż do reakcji obojętnej wobec fenoloftaleiny i suszyć pod bezwodnym siarczanem sodu. Odparować eter w próżni. Pozostałość po odparowaniu rozpuścić w 20 ml chloroformu. Dodać aktywowanego talku, aż zawartość przybierze wygląd gęstawej masy. Kilkakrotnie wstrząsnąć i pozostawić na 2 minuty. Następnie przesączyć przez szklany sączek 3G3 przemyć kilkakrotnie chloroformem. Dopełnić chloroformem do pożądanej objętości.

Oznaczenia kolorymetryczne przeprowadzać na kolorymetrze Pulfricha używając filtru S 50 i 1 cm kiuwet. Odczytów dokonywać w czwartej minucie. Stosunek objętości badanego roztworu do objętości odczynnika z SbCl_3 1 : 6. Obliczyć z krzywej standartowej ilość witaminy D.

WNIOSKI

1. Opisana przez nas metoda pozwala oznaczać zawartość witaminy D w olejowych roztworach kalcyferolu. Metoda jest prosta, szybka i łatwa w użyciu, nie wymaga trudno dostępnej aparatury i odczynników.

2. Stwierdziliśmy, że znaczna część produktów rozkładu witaminy D daje reakcję barwną z SbCl_3 , ale stosowanie aktywowanego talku dużą część tych produktów adsorbuje.

3. Fitosterole i inne związki frakcji niezmydlającej się olejów sojowego arachidowego i oliwy praktycznie adsorbowane są przez aktywowany talk.

Я. Пискарска. Е. Ковальски

ОБОЗНАЧЕНИЕ ВИТАМИНА Д В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ

Содержание

Для обозначения витамина Д в растительных маслах применялись следующие реакции: омыление, экстракция эфиром, хроматография на активированном тальке и колориметрическое обозначение при помощи аппарата Пульфриха. Для обозначения применили реактив с хлористой сурьмой по Niellu, Russelu и Zimmerli употребляя фильтр S_{50} . Велись исследования при применении активированного талька. Констатируется, что большой процент продуктов распада кальциферола, а также не омыленные фракции арахидового, соевого и прованского масла дают цветную реакцию с хлористой сурьмой. Активированный тальк почти совершенно удаляет мешающее влияние несомыслящейся фракции и адсорбирует большую часть продуктов распада кальциферола, дающих тоже цветную реакцию.

Представленный метод — простой и скорый. Позволяет, по мнению авторов, на рутинные обозначения кальциферола в растительных маслах.

J. P i e k a r s k a, J. K o w a l s k i

VITAMIN D ESTIMATION IN OIL SOLUTIONS

Summary

For the estimation of vitamin D in oil solutions the following procedure was employed: saponification, extraction by ether, chromatography on activated talc and colorimetric determination in Pulfrich's apparatus. Reagent with $SbCl_3$ after Nield, Russel and Zimmerli along with filter S 50 was employed for the estimation.

Investigations were carried out on the employing of activated talc for the estimation of vitamin D. It was found that a considerable percent of products of decomposition of calciferol and the non-saponifying fraction of arachid oil, soya oil and olive oil brings about a colour reaction with $SbCl_3$. The activated talc almost completely does away with the interfering effect of non-saponifying fraction and adsorbs a very marked part of the products of decomposition of calciferol giving a colour reaction.

The method presented is simple and quick. The authors are of the opinion that the said method allows routine determination of calciferol in oil solutions.

PIŚMIENICTWO

1. Brockmann H., Chen Y. H.: Z. physiol. chem., 241, 129, 1936. — 2. Nield C. H., Russel W. C., Zimmerli A.: J. biol. chem., 136, 73, 1940. — 3. De Witt J., Sullivan M. X.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18, 117, 1946. — 4. Green J.: Biochem J., 49, 223, 1951. — 5. Shaw W. H. C., Jefferies J. P., Holt F. E.: Analyst, 82, 2, 1957. — 6. Stross P. S., Brealey L.: The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7, 739, 1955. — 7. Garkina I. N., Bukin W. N.: Witaminnyje resursy i ich ispolzowanie, Moskwa 1955. — 8. Tschapke H., Plessing H.: Naturwissenschaften, 42, 14, 1955. — 9. Sobel A. E., Mayer A. M., Kramer B.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 17, 160, 1945. — 10. Campbell J. A.: Anal. Chem., 20, 766, 1948.
11. Shaw W. H. C., Jefferies J. P.: Analyst, 82, 8, 1957. — 12. Green J.: Biochem. J., 49, 45, 1951. — 13. Ewing D. T., Powell M. J., Brown A. A., Emmett A. D.: Anal. Chem., 20, 317, 1948. — 14. Tschapke H., Plessing H.: Die Pharmazie, 12, 262, 1957. — 15. Tschapke H., Plessing H.: Internat. Ztschr. Vitaminforschung, 28, 398, 1958.

Emery J. EPIDEMIOLOGIA „NAGŁYCH, NIEOCZEKIWANYCH, LUB SZYBKICH” ZGONÓW (Epidemiology of „sudden, unexpected or rapid” deaths in children). Brit. Med. J. London 1959 str. 5157; 925—928.

Pomiędzy 1949 a 1956 r. zmarło w Londynie po chorobie trwającej około 48 godzin 249 dzieci w wieku powyżej 7 dni. Liczba zgonów tego typu powtarzająca się z roku na rok wzrastała zwykle w okresie zimowym, najczęściej spotykany wiek zmarłych wahał się w granicach od 1-go do 6-ciu miesięcy. 120 dzieci zmarło w domu, 13 w drodze do szpitala, 116 w szpitalu. Na sekcji stwierdzono: przyczyną zgonów były w 83 przypadkach wady rozwojowe wrodzone (istnienie których u 37 dzieci było stwierdzone za życia); w 145 występowały inne objawy patologiczne, w 21 przypadkach zgonu nie można było w ogóle ustalić.

S. Adamowiczowa