

D vitamin és ergoszterin meghatározása takarmányélesztőben

II. A D vitamin és ergoszterin elkülönítése és meghatározása

SPANYÁR PÁL, BLAZOVICH MÁRTA, GÁBOR ISTVÁNNÉ

A kísérletekben részt vett: Polyák Ottóné

Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet, Budapest

Érkezett: 1967. január 5.

Azokban a biológiai anyagokban, melyek ergoszterint, ill. *D* vitamint tartalmaznak, rendszerint igen sok olyan vegyület található, melyek a meghatározást zavarják. Ezek egyrésze tulajdonságaiban távol áll a meghatározandó anyagoktól, jelenlétük tehát az identifikáló kémiai reakció véghezvitelét lehetetlenné teszi. Mások közeli rokonai a vizsgálandó vegyületeknek, a vizsgálatra alkalmazott reakciókat több-kevésbé maguk is adják, vagy azokat erősen zavarják. A tulajdonképpeni meghatározást megelőzi tehát a zavaró anyagok eltávolítása, ill. hatástalanítása. Ezek a műveletek a meghatározást meghosszabbítják, továbbá több-kevesebb anyagvesztéssel járnak. Éppen ezért kívánatos számukat a lehetőség szerint korlátozni és az elméletileg lehetséges összes zavaró anyag helyett, csupán a vizsgálandó anyagban valóban jelen levő, és a vizsgálatot ténylegesen zavaró anyagok elválasztására törekedni.

Az ergoszterin és *D* vitamin zsíróldó oldószerekben jól oldódik, míg a vizsgálatra kerülő biológiai anyagok alkotórészeinek zöme azokban oldhatatlan. Ezért az első lépés, rendszerint olyan *extrakciós művelet* szokott lenni, mely a zsíróldószerben oldható és oldhatatlan anyagokat egymástól elválasztja. Így módon megkapjuk az összes lipideket tartalmazó kivonatot, melyből a lipoid frakció – a zsírsav-gliceridek *elzappanosítása* után – kinyerhető. Ezután következik a vizsgálatok szempontjából aktív anyagok: az *A* vitamin, a zavaró szterinek elválasztása, sőt ha szükséges, az ergoszterin és a *D* vitamin szétválasztása. E műveletek ma már ritkán történnek kémiai úton. – Rendszeren e célra – egy vagy több műveletben – papír-, oszlop-, vagy rétegekromatográfiás eljárásokat használnak.

A takarmányélesztők ergoszterin- és *D*-vitamin tartalmának meghatározására a fentiek ismeretében határoztuk meg az előkészítés legkedvezőbb feltételeit. Megállapítottuk a hazai takarmányélesztők és az egyes féltérmekek fizikai tulajdonságait és kémiai összetételét. Ennek figyelembevételével az elkülönítés műveleteit úgy választottuk meg, hogy a zavaró anyagokat lehetőleg teljesen kikapcsoljuk. Az így nyert kedvező eredmények alapján az előkészítő műveleteket tovább igyekeztünk egyszerűsíteni oly módon, hogy a mérés megbízhatóságát a mérések pontosságát és reprodukálhatóságát lehetőleg ne érintsük.

A következőkben ismertetendő kísérletekben hazai takarmányélesztőket használtunk. A kísérletek kisebb részében szabadegyházi szárított élesztőt alkalmaztunk. A vizsgálatok zömét a Győri Szeszgyárban készült torula élesztővel végeztük, szeparált, sűrített élesztőtej, ill. szárított végtermék alakjában. A készítmények összetételét az 1. táblázatban adjuk. E készítmények – mint a takarmányélesztők általában – *A* vitamint nem tartalmaztak. Az eddig vizsgált mintákban *D* vitamint sem találtunk. Vizsgálatok céljára hozzáadtuk a *D* vitamint.

A vizsgálathoz használt takarmányélesztő készítmények összetétele

Minta	Szárz- anyag- tartalom	Zsirtarta- lom	Nitrogén	Fehérje	Hamu
1. Győri torula szárított ta- karmányélesztő	96,4 %	1,95 %	7,82 %	48,87 %	10,0 %
2. Szabadegyházi kevert szá- rított takarmányélesztő . .	91,8 %	3,11 %	7,64 %	47,75 %	10,3 %
3. Győri élesztőtej, sűrített .	14,2 %	—	1,57 %	9,81 %	1,5 %
4. Győri élesztőtej, szeparált	9,9 %	—	1,12 %	7,00 %	1,1 %

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az üzemben átmenetileg keletkező élesztőtej, (amely *D* vitamin besugárzás útján való előállítására alkalmas lehet) és a szárított végtermék ergoszterin és *D* vitamin vizsgálatra azonos módon nem készíthető elő. Ezért e két termékre külön-külön eljárást dolgoztunk ki a következő módon.

1. Szárított élesztő előkészítése *D* vitamin és ergoszterin meghatározására

20 g szárított jól homogenizált takarmányélesztőt porcelántálba bemérünk, 20 g vízmentes nátriumsulfáttal jól elkeverjük. A homogén anyagot Soxhlet extraháló készülékben etiléterrel 4 órán át extraháljuk. Az etiléteres kivonatból az oldószer nagy részét eltávolítjuk, az utolsó nyomokat légszivattyúval leszívátjuk, majd az olajos maradékot 25 ml 96% alkoholban felvesszük.

Az alkoholos kivonatból 12,5 ml-t 500 ml-es háromnyakú lombikba bepipetázunk, 25 ml normál alkoholos-káliúgot és 0,1 g aszkorbinsavat adunk hozzá, majd az elegyet nitrogén áramban – visszacsepegő hűtő feltétellel – 30 percen át vízfürdőn forraljuk.

Az elszappanosítás után az oldatot – a nitrogénáram megszakítása nélkül – lehűtjük, majd 40 ml desztillált vízzel választótölcsérbe mossuk. Az így nyert oldatot háromszor – egyenként 50 ml etiléterrel 10 perc alatt – kirázzuk. Az éteres kivonatokat egyesítjük és háromszor – egyenként 50 ml, 1 g konyhasót tartalmazó, desztillált vízzel – mossuk. Az éteres oldatot egy éjen át vízmentes nátriumsulfáttal szárítjuk, majd megsűrjük. A víztiszta oldatból az éter nagyrészét vízfürdőn óvatosan lepároljuk, az utolsó nyomokat légszivattyúval elszívátjuk, majd a maradékot – a meghatározásra használt módszernek megfelelően – 50 ml 96%-os alkoholban, vagy kloroformban felvesszük.

Az élesztőtej előkészítése *D* vitamin és ergoszterin vizsgálatára

10 g élesztőtejet 500 ml-es háromnyakú lombikba bemérünk, 25 ml normál alkoholos káliúgot és 0,1 g aszkorbinsavat adunk hozzá, majd az elegyet nitrogén áramban – visszacsepegő hűtő feltétellel – 20 percen át vízfürdőn forraljuk.

Az elszappanosítás után az elegyet – a nitrogén áram megszüntetése nélkül – lehűtjük, és 50 ml desztillált vízzel rázó-tölcsérbe átmoszuk. Az így nyert oldatot konyhasóval telítjük, majd háromszor – egyenként 50 ml etiléterrel 10 perc alatt – kirázzuk. Az éteres kivonatokat egyesítjük, mossuk, szárítjuk, sűrjük, az oldószert eltávolítjuk, a maradékot megfelelő, új oldószerral felvesszük azonos módon, mint az előző eljárásnál.

A korábbi, *D* vitamin és ergoszterin meghatározására vonatkozó modell kísérletek (1), továbbá az előzőkben közölt takarmányélesztő előkészítési eljárásaink felhasználásával vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy a takarmányélesztők *D* vitamin és ergoszterin tartalmának meghatározása mi módon végezhető a legcélszerűbben, ill. hogyan nyerhetünk a valósághoz legközelebb álló eredményeket.

Első feladat volt a három, ergoszterin meghatározásra modell oldatban alkalmasnak mutatkozott, módszer összehasonlítása. E célból azonos szárított élesztő és élesztőtej készítményeket párhuzamosan megvizsgáltunk, s az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

A táblázatból kiderül, hogy valamennyi mintában – az ergoszterin mennyiségétől függetlenül – a *Liebermann – Burchardt*-féle eljárással lényegesen (42 – 73%-kal) magasabb ergoszterin értékeket találtunk, mint a digitoninos, ill. rétegekromatográfias – antimontrikloridos eljárással. A két utóbbi módszer eredményei viszont csaknem azonosak. Megfigyelhető az is, hogy a *Liebermann – Burchardt* módszer értékei és a másik két módszer értékei közötti különbségek a különböző élesztőkészítményekben sem számszerűen, sem százalékosan nem azonosak. Ebből nyilvánvaló, hogy elválasztási eljárásaink után a kivonát még olyan zavaró anyagokat tartalmaznak, melyek a *Liebermann – Burchardt* reakciót zavarják, viszont a digitoninos, ill. antimontrikloridos meghatározásokat nem befolyásolják. Az utóbbi használhatóságához természetesen hozzájárul, hogy azt rétegekromatográfias elválasztás után használtuk, ami a zavaró anyagok további elválasztását tette lehetővé. Megnyugtató viszont a digitoninos eljárás szempontjából, hogy az újabb tisztítás nélkül is mutatkozott olyan specifikusnak, mint a rétegekromatográfias-antimontrikloridos eljárás.

A fentiek alapján megállapítható, hogy a *Liebermann – Burchardt* féle eljárás a takarmányélesztők ergoszterin tartalmának meghatározására az általunk javasolt, aránylag egyszerű előkészítés után nem használható. E módszer pontossága egyébként modell kísérletekben is és itt is a legkisebb volt. Az élesztőkészítményekben a középhibát $\pm 10,7\%$ -nak találtuk (lásd 2. táblázat).

2. táblázat

Különböző élesztőminták ergoszterin tartalmának átlagértéke különböző módszerekkel

A minta eredete	Vizsgálatok száma	Ergoszterin tartalom mg%		
		Liebermann Burchardt reakcióval	Digitoninal	Rétegekromatográfias eljárással
Szabadegyházi szárított takarmányélesztő. 1966. I. 15.	13	116,2	71,6	76,7
Győri szárított takarmányélesztő 1966. X. 21.	5	48,3	30,8	33,1
Győri szárított takarmányélesztő 1966. X. 26.	6	42,7	30,1	29,3
Győri élesztőtej, sűrítő előtt 1966. X. 26.	2	55,5	37,0	37,6
Győri élesztőtej, sűrítő előtt 1966. XI. 10.	3	53,2	30,7	37,8
Győri élesztőtej, sűrítő előtt 1966. XII. ...	2	62,0	50,6	50,5
Győri élesztőtej, sűrítő után 1966. XII. ...	2	68,7	64,0	64,0
	Középhiba	10,7	8,7	8,3

A digitoninos módszer pontosságát jellemző középhibát $\pm 8,7\%$ -nak találtuk. Ez a modellkísérletek értékéhez képest megnőtt. Az irodalmi adatokhoz viszonyítva azonban ez az érték megfelelőnek mondható. Az eljárás tehát mindkét típusú élesztőkészítményben használható az ergoszterin meghatározására, feltéve, hogy *D* vitamin nincsen jelen.

Az antimotrikloridos-rétegekromatográfiai módszer középhibája $\pm 8,3\%$. A három módszer között ez bizonyult a legpontosabbnak.

A második feladatnál, a *D* vitamin meghatározásánál, különböző vizsgálati módszerek összehasonlítására az élesztőnél nem volt szükség. A takarmányélesztőben ugyanis ergoszterin jelenlétére mindig számítani lehet, különösen akkor, ha *D* vitamin jelen van. Így az élesztő vizsgálatánál csak azok az eljárások jönnek számításba, ahol a *D* vitamin az ergoszterin mellett is jól mérhető, vagy a kettő egymástól elválasztást nyer. Előző vizsgálataink szerint (1) a feltételeket e vizsgált eljárások közül csak a rétegekromatográfiai antimotrikloridos módszer elégíti ki. Élesztőkészítményekben tehát a (jelen esetben hozzáadott) *D* vitamin vizsgálatát csak ezzel a módszerrel végeztük el.

A 3. táblázat VI. oszlopában levő adatokból kiderül, hogy ezzel – az általunk kidolgozott – módszerrel nyert eredmények középhibája $\pm 8,3\%$. Ez eléggé meglepő, mert ugyanazt az értéket modelloldatokban alig valamivel kisebbnek $\pm 8,2\%$ -nak találtuk. Feltehető tehát, hogy az elválasztás várt kedvezőtlen hatását az élesztő kivonatban maradt anyagok stabilizáló hatása kiegyensúlyozza.

3. táblázat

Élesztőhöz hozzáadott ergoszterin és *D* vitamin mennyiségek alakulása a különböző kivonási műveletek során

Minta	Ergoszterin			D vitamin		
	Hozzáadott mennyiség mg	Visszaka-pott mennyiség mg	Visszaka-pott mennyiség %	Hozzá-adott mennyiség mg	Visszaka-pott mennyiség mg	Visszaka-pott mennyiség %
Szárított takarmányélesztő (Győr)	5	4,1	82	5	3,8	76
	5	4,3	86	5	3,9	78
	5	3,8	76	5	3,8	76
	5	4,1	82	5	3,7	74
	5	4,0	80	5	3,6	72
	10	7,5	75	10	7,9	79
	10	8,2	82	10	7,6	76
	10	8,7	87	10	7,0	70
	10	8,0	80	10	8,0	80
	10	8,0	80	10	7,8	78
Középhiba: $\pm 4,4\%$ átl.: 81,0%			Középhiba: $\pm 4,1\%$, átl.: 75,9%			
Élesztőtej sűrítés előtt (Győr)	5	4,7	94	5	3,5	70
	5	4,0	80	5	3,8	76
	5	3,9	78	5	4,0	80
	5	3,8	76	5	3,4	68
	5	3,6	72	5	3,4	68
	10	7,5	75	10	6,7	67
	10	7,8	78	10	7,2	72
	10	7,2	72	10	8,6	86
	10	7,5	75	10	7,1	71
	10	8,1	81	10	7,7	77
Középhiba: $\pm 8,1\%$, átl.: 78,1%			Középhiba: $\pm 8,3\%$, átl.: 73,5%			

A következő kérdés az volt, hogy a viszonylag sok műveletből álló előkészítés nem módosítja-e az élesztőben levő ergoszterin és *D* vitamin mennyiségét. Feltehető ugyanis, hogy a vizsgált alkotórészek kivonása nem történik meg tökéletesen. Nem lehet kizárni annak lehetőségét sem, hogy fény-, oxidációs hatások, főzés, lúghatás stb. veszteségeket okoznak. Ezért megvizsgáltuk mindkét előkészítési eljárásnál mindkét vizsgálandó anyag esetleges veszteségét.

Ergoszterin vizsgálatánál úgy jártunk el, hogy megvizsgáltuk a takarmány-élesztő ergoszterin tartalmát ismert mennyiségű ergoszterin hozzáadása után és előtt, és a két érték közötti különbséget tekintettük a hozzáadott mennyiségű ergoszterinnek megfelelő „talált” értékeknek. E vizsgálatokat a digitoninos és a rétegekromatográfiás-antimontrikloridos módszerrel egyaránt elvégeztük. A *D* vitamin vizsgálatánál az eljárás egyszerűbb volt. Minthogy az élesztőben nem volt *D* vitamin, a „talált” értékeket egyenesen viszonyíthattuk a „hozzáadott” értékekhez.

Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze. A vizsgálatokból kiderül, hogy ilyen veszteséggel valóban számolni kell. A veszteség azonban a meghatározást nem zavarja, ha ismerjük annak nagyságát és annak ingadozása a vizsgálati módszer ingadozásával együtt még az eltérhető határok között mozog. – A táblázatból megállapítható, hogy a veszteség átlagos nagysága az első kivonási mód esetén

ergoszterinnél	19,0%	± 4,4%	középhebíával
<i>D</i> vitaminnál	24,1%	± 4,1%	középhebíával

a második kivonási mód esetén

ergoszterinnél	21,9%	± 8,1%	középhebíával
<i>D</i> vitaminnál	26,5%	± 8,3%	középhebíával

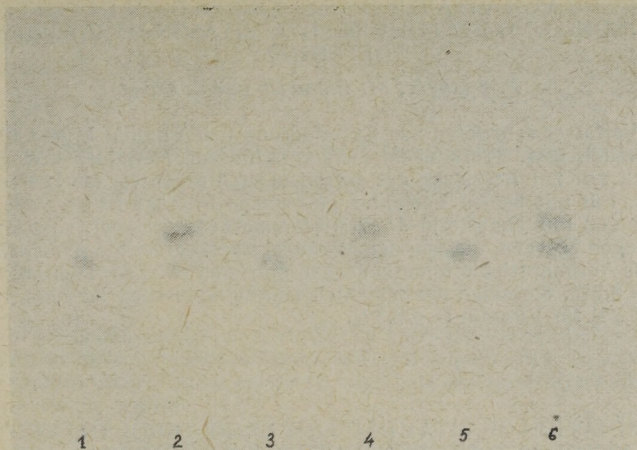
A veszteség ingadozásának középhebíájában már a módszer középhebíája is benne foglaltatik. – A veszteség (tökéletlen kivonás, ill. bomlás) ingadozása okozza jórészt azt, hogy a talált értékek középhebíája általában nagyobb élesztőkben, mint modelloldatokban.

A veszteség ismeretében tehát az eredmények kiszámításánál faktorokat kell alkalmazni, melyek a digitoninos módszernél az extinkciós koefficiensbe beolvaszthatók, a rétegekromatográfiás módszernél önállóan alkalmazandók.

E faktorok értéke:

Ergoszterinnél	
az első kivonási módszer esetén	1,23
a második kivonási módszer esetén	1,28
<i>D</i> vitaminnál	
az első kivonási módszer esetén	1,32
a második kivonási módszer esetén	1,36

Felmerül még az a kérdés, hogy a rétegekromatográfiás-antimontrikloridos módszer takarmányélesztőkből nyert kivonatok vizsgálatánál ergoszterin és *D* vitamin meghatározásra ad-e olyan megfelelő alakú, a mennyiségnek megfelelő nagyságú és intenzitású foltokat, mely a kiértékelést mindenki számára egyértelműen lehetővé teszi. E kérdésre a kísérleteink szerint igennel lehet válaszolni. A módszer használhatóságát az 1. ábránkon mutatjuk. Az ezen látható kromatogram élesztőkivonatokból nyert különböző ergoszterin és *D* vitamin foltokat tartalmaz.



1. ábra

Az ergoszterin és *D* vitamin meghatározása egymás mellett takarmányélesztőből. A réteg anyaga Kieselgel G, futtatószer: ciklohexán: etiléter = 1:1, futtatási idő kb. 40', $t = 20\text{ C}^\circ$. Kém-szer: antimontriklorid-ecetsavanhidrid kloroformban. Ergoszterin rf.: 0,3, *D* vitamin rf.: 0,4. Az ergoszterin foltok közül az 1., 3. és 5. modell ergoszterin és 4, 8 és 12 μg ergoszterinnek felel meg, a 2, 4 és 6 számú folt élesztő extraktban levő ergoszterin. A *D* vitamin foltok minden esetben 8 μg *D* vitaminnak felelnek meg.

I R O D A L O M

Spanyár P., Blazovich M., Gábor I-né: ÉVIKE. 13. 77. 1967.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА „Д” И ЭРГОСТЕРИНА В КОРМОВЫХ ДРОЖЖАХ. II. ОСАЖДЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА „Д” И ЭРГОСТЕРИНА

П. Шпаняр, М. Блазович и Н. Габор

Авторы разработали два разных способа получения витамина „Д” и эргостерина из дрожжевого молока и сушеных дрожжей. Первый способ подходящий только для подготовки сушеного продукта и второй способ только для подготовки молока. Если в экстракте полученного двумя способами присутствует только эргостерин то соответствующим методом выявления является дигитониновый метод, а если совместно присутствуют оба вещества то применять авторами разработанную треххлористую сурьмянистую слоистую хроматографию. Средняя погрешность дигитонинового метода $\pm 8,7\%$, а слоистой хроматографии при эргостерине $\pm 8,3\%$, при получении витамина „Д” $\pm 8,3\%$.

BESTIMMUNG VON VITAMIN D UND ERGOSTERIN IN FUTTERHEFE II. TRENNUNG UND BESTIMMUNG DES VITAMINS D UND DES ERGOSTERINS

P. Spanyol, M. Blazovich und I. Gábor

Die Verfasser arbeiteten zur Extrahierung von Vitamin D und Ergosterin aus Hefemilch bzw. Trockenhefe zwei verschiedene Methoden aus. Die erste eignet sich nur zur Bereitung des getrockneten Produktes, die zweite nur für die Milch. Für mit beiden Verfahren gewonnene Auszüge ist im Falle der Anwesenheit von nur Ergosterin die Digitoninmethode geeignet, sind aber beide Verbindungen zugegen, die von den Verfassern ausgearbeitete schichtchromatographische Antimontrichloridmethode. Der mittlere Fehler der Digitoninmethode beträgt $\pm 8,7\%$, derjenige der schichtchromatographischen Methode für Ergosterin $\pm 8,3\%$ für Vitamin D $\pm 8,3\%$.

DETERMINATION OF VITAMIN D AND ERGOSTEROL IN FEED YEAST. II. ISOLATION AND DETERMINATION OF VITAMIN D AND ERGOSTEROL

P. Spanyol, M. Blazovich and I. Gábor

Two different procedures were evolved by the authors for the extraction of vitamin D and of ergosterol from yeast juice and from dried yeast, respectively. One of the methods is suitable for the preparation of dried yeasts for analysis while the other only for that of yeast juice. The extracts obtained by any of the suggested methods are subsequently treated according to the digitonine method when only ergosterol is present, while in the case of the simultaneous presence of both substances the layer-chromatographic method based on antimon trichloride evolved by the authors proved to be suitable. The mean error of the digitonine method ranged $\pm 8.7\%$, that of the layer-chromatographic method, in turn, $\pm 8.3\%$ in the case of ergosterol and $\pm 8.3\%$ in that of vitamin D.

DOSAGE DE LA VITAMINE D ET DE L'ERGOSTÉRINE DANS LA LEVURE À FOURRAGE II. SÉPARATION ET DOSAGE DE LA VITAMINE D ET DE L'ERGOSTÉRINE

P. Spanyol, M. Blazovich et I. Gábor

Les auteurs ont élaboré deux méthodes différentes pour l'extraction de la vitamine D et de l'ergostérine à partir du lait de levure et respectivement, de la levure séchée. La première ne peut servir qu'à la préparation préalable du produit sec et la deuxième au lait de levure. En présence d'ergostérine seule c'est le procédé à la digitonine qui convient, en présence des deux matières simultanée c'est le procédé de chromatographie de couche au trichlorure d'antimoine, qu'ils ont élaboré, que l'on peut employer. L'erreur moyenne de la méthode à la digitonine est $\pm 8,7\%$, celle de la méthode chromatographique $\pm 8,3$ avec la l'ergostérine et $\pm 8,3\%$ avec la vitamine D.