

## Módosított eljárás A-vitamin mennyiségi meghatározására

GÉCZY GYÖRGY

Phylaxia Állami Oltóanyagtermelő Intézet, Budapest.

Erkezett: 1961. szeptember 21.

A takarmányoknak különböző vitaminokkal való kiegészítése az utóbbi években egyre nagyobb jelentőségűvé vált. Az A-vitaminnak ilyen takarmány-előkeverékekből való meghatározása nem könnyű feladat, és jóformán alig található a szakirodalomban adat a meghatározásra.

Az A-vitamin és általában a zsíroldó vitaminoknak olajos mintákból való mennyiségi kémiai meghatározását különleges előkészítés előzi meg. Mint tudjuk, ez a klasszikus hagyományok szerint abból áll, hogy a kérdéses mintát alkoholos káliúggal szappanosítjuk el, majd az el nem szappanosodó – magát az A-vitamint tartalmazó – részt az elszappanosítottól, éteres (petroléteres) kivonással választjuk el. Az így kapott kivonatot szárítás után alumíniumoxidon (Brockmann) történő kromatográfiával tisztítjuk. A tulajdonképpeni mérésre csak az így tisztított A-vitamin tartalmú oldat alkalmas.

A mintáknak méréshez való ezen klasszikus előkészítése, a dolog természetéből kifolyólag, hatóanyagvesztéssel jár, akár az elszappanosítás utáni kivonást, akár az alumíniumoxidon történő kromatografálást stb. vizsgáljuk.

Intézetünknek, olyan gyors és amellett pontos módszerre volt szüksége – elsősorban A-vitaminnak takarmánykoncentrátumokból való meghatározására –, melynél a hatóanyag előkészítéssel járó vesztesége csekély. Sikerült is kidolgoznunk egy olyan rutineljárást, mely A-vitamin kémia meghatározására, egyszerűsége, gyorsasága és pontossága következtében, a legkülönbözőbb eredetű anyagok esetén (takarmánykoncentrátum, máj, olaj stb.) kiterjedten alkalmazható.

A módszer kidolgozásánál abból az elvből indultunk ki, hogy – szakítva a hagyományokkal – a munkáigényes, valamint a hatóanyagcsökkentő munkafázisokat teljesen elhagyjuk, és egész egyszerű úton próbálunk a tiszta, mérésre alkalmas hatóanyaghoz jutni. Egyetlen célunk, röviden, tehát az volt, hogy a meghatározandó mintában levő A-vitamin, quantitativ oldatához jussunk, melyből valamely színreakció segítségével, extinkció mérés alapján, a hatóanyag-tartalmat meg tudjuk állapítani.

Eljárásunk elve a következő: A-vitamin tartalmú takarmánykoncentrátum és máj esetén a mintát az A-vitamin kinyerése céljából, 2:8 arányú acetonepetroléter eleggyel, sötétben, 20° C-on, éjjelen át állni hagyjuk. A leszűrt sárgás színű kivonatot, a mérések szerint, az összes A-vitamint tartalmazza. Az így nyert kivonatot csontszénnel ha szükséges derítjük. A kapott színtelen oldatot vákuumban bepároljuk és a maradékot száraz kloroformban 10 ml-re oldjuk.

Az így előkészített minta alkalmas az A-vitaminnak, bármely színes vegyülete által, színintenzitás alapján történő meghatározásra.

Mi, a magunk részéről, bizonyos módosítással A. E. Sobel által ajánlott 1,3-glicerindiklóridint (későbbiekben GDH) választottuk reagensnek, mellyel az A-vitamin mély kékből ibolyába átcsapó színt ad (1).

Az A-vitaminnak 1% acetilkloridot tartalmazó GDH-nel képződő mély kék, majd ibolyába átcsapó színe bizonyos idő múlva elhalványodik, a mérés azonban sokkalta biztonságosabb, mint amikor antimonikloridot alkalmazunk reagensnek. Azt találtuk, hogy míg az utóbbi színreakciónál a D<sub>3</sub>-vitamin jelenléte zavarja a mérést, addig az általunk választott GDH-es reakciónál nem, miután D<sub>3</sub>-vitamin a GDH-nel csak kb. 10 perc múlva kezd reagálni, mély zöld színnel. Ha a D<sub>3</sub>-vitamin esetlegesen zavaró hatását minden kétséget kizáróan kikapjuk küszöbölni, akkor a színreakciót acetilkloridot nem tartalmazó GDH-

nel hajtjuk végre. Azt találtuk ugyanis, hogy a D<sub>3</sub>-vitamin az acetilkloridot nem tartalmazó GDH-nel egyáltalán nem reagál, viszont az A-vitamin igen, jóllehet a képződött szín halványabb, mint acetilklorid jelenlétében. Ez utóbbi esetben természetesen olyan standard görbét használunk összehasonlításként, melyet acetilkloridot nem tartalmazó GDH-nel vettünk fel.

1. táblázat

	Minta megnevezése	Bekevert A-vitamin mennyiség NE/g	Mért A-vitamin mennyiség NE/g
1.	Csibepremix C <sub>1</sub> jelű	460	450 445 451
2.	Csibepremix C <sub>2</sub> jelű	460	446 437 439
3.	Csibepremix C <sub>3</sub> jelű	460	463 460 459
4.	Csibepremix C <sub>4</sub> jelű	460	450 438 453
5.	Tojópremix T <sub>1</sub> jelű	850	835 832 840
6.	Tojópremix T <sub>2</sub> jelű	850	835 835 841
7.	Keményítős granulátum	14 250	14 200 14 000 14 250
8.	Cetáceumos koncentrá- túrám	66 000	65 500 65 700 65,650
9.	„Duphasol A + D <sub>3</sub> ” (vízoldható A + D <sub>3</sub> vit.)	25 000 Garantált men- nyiség NE/g	27 500* 28 100 27 400
10.	Olajos A-vitamin (importált)	1,0 millió Garantált mennyiség NE/g	1,21 millió* 1,18 1,20

A \*-gal megjelölt értékek a garantálnál magasabbak. Ennek oka az, hogy az import anyagok minden esetben magasabb hatóértékűek a feltüntetett-nél.



Eljárásunk reprodukálhatósága, ill. megbízhatósága abból az egyszerű tényből következik, hogy a takarmánykoncentrátumokba (premix) – előzőleg eljárásunkkal mért—meghatározott mennyiségű A-vitamin kerül. Ezt a bevitt és pontosan meghatározott A-vitamin mennyiséget a frissen készült Premixekből eljárásunkkal minden esetben max. 2–3% veszteséggel sikerült is kimutatnunk (l. 1. táblázat 1–8 tétel), ami rutin-eljárásoknál véleményünk szerint maximális pontosságot jelent. A szenes derítéssel kapcsolatban felmerült az a probléma, hogy a szén esetleg az A-vitamin egy részét adszorbeálja és így a mérés nem megbízható. Ezzel kapcsolatban a következőket kell megjegyezni.

Szenes derítésre az esetek nagy részében nincs szükség (olajos, viaszos, vizes mintáknál), miután a minták oldatai teljesen színtelenek. Takarmánykoncentrátumok és más minták vizsgálata folyamán, amennyiben az extraktum sötétebb sárga lenne, úgy azokat derítenünk kell, ha csak halványsárga, úgy nem derítjük, hanem ezt az oldatot és nem kloroformot alkalmazzuk vakpróbának. A szenezéssel kapcsolatos méréseink szerint 150–300 NE A-vitamint tartalmazó vizsgálandó oldatoknál 0,35–0,40 g szén még nem okoz gyakorlatilag veszteséget; 0,5 g már 4–5% veszteséget okoz. Ezt tehát figyelembe kell vennünk a szenezésnél.

A továbbiakban, eljárásunkkal kapcsolatos egyes részletkérdéseket ismergetjük.

A mintákból általában annyit mérünk be meghatározáshoz, hogy az egyes bemérések összes A-vitamin tartalma 200–500 NE legyen. Ez természetesen nem annyit jelent, hogy ennél kevesebbet a módszerrel nem lehet meghatározni. Takarmánykoncentrátumok (Premix) esetén a mintát ötszörös térfogatú 2:8 arányú acetonepetroléter eleggyel, hidegen digeráljuk – ha lehet becsiszolt Erlenmeyer lombikban – úgy, hogy a folyadék-tér feletti levegőt nitrogén gázzal szorítjuk ki. Azután a lombikot sötét helyen, kb. 12 órán át, 20 C° körül, állni hagyjuk. A mintákat azután leszívátjuk, a csapadékot kevés acetonepetroléter eleggyel lemoszuk. A kapott sárgás szűrletet 0,2–0,4 g szénnel derítjük. A szűrlet bepárlása vákuumban, 40°-os vízfürdőn nitrogénáramban, történik. A maradékot kis részletekben, száraz kloroformmal 10 (esetleg 5) ml-es mérőlombikba mossuk és pontosan jelig töltjük. Magát a mérést az így kapott oldatokkal végezzük, mégpedig az alábbi – összehasonlító grafikon felvételével kapcsolatban közölt – eljárás pontos betartásával. (l. 1. ábra.)

A standard grafikont kristályos A-vitaminacetát segítségével vesszük fel a következőképpen.

A standard anyagból 0,02–0,025 g-ot mérünk be és száraz kloroformmal 50 ml-re hígítjuk mérőlombikban. Ebből a törzsoldatból az alábbi hígításokat végezzük el 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,7, 0,5, és 0,3 ml-t hígítunk száraz kloroformmal 10 ml-re. A vizsgálandó oldat 3 ml-jéhez, 3 ml 1% acetilklorid és 99% 1,3-glicerindiklórhidrinből frissen készült (I) reagenst adunk. Mély kék szín jelentkezik, mely 15–20 mp múlva ibolyába csap át. Az extinkciót 2–3 percen belül mérjük.

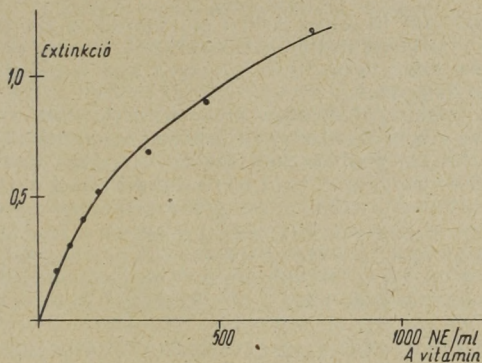
Az A. E. Sobel által ajánlott GDH-nes A-vitamin kimutatási módszert bizonyos vonatkozásokban módosítottuk. Vonatkozik ez a minta és az alkalmazott reagens arányára, valamint a leolvasás idejére. Mi ugyanis a mintához azonos térfogatú GDH reagenst adunk, míg Sobel és munkatársa 4-szeres mennyiségű reagenssel dolgozik. Utóbbi esetben a reagenssel erősen felhígított (1:4 arányú) oldat extinkciója azonos térfogat esetén kb. fele az 1:1 arányú oldaténak.

Azonkívül Sobel szerint a leolvasást 2–10 perc között kell végezni. Ezt túlzottnak tartjuk, miután az általuk ajánlott feltételek mellett, sorozatos méréseink tapasztalata alapján a mérést 1 1/4 percen belül kell végezni; miután ez időn túl már lassan csökken az extinkció. Az általunk módosított GDH reagens alkalmazás esetén az oldat extinkciója kb. 2–3 percig nő és csak azután csökken.

Minta megnevezése	Bemérés	Előkészítés	Extrahálás	Derítés	Oldás	Bepárlás	Hígítás
1. A-vitamin tartalmú takarmánykoncentrátum (Premix)	10 g	-	5 × -ös aceton petroléterrel	+	-	Vákuumban	10 ml kloroformmal
2. Olajos koncentrátumok (1 millió NE/g) Hoffmann la Roche-féle	2-3 mg	-	-	-	Kloroformban 10 ml-re	-	-
3. Vízoldható A-vitamin készítmény „Duphasol A + D <sub>3</sub> ” (Duphar)	0,1-0,2 g	-	-	-	20 ml acetonban	Vákuumban	10 ml kloroformmal
4. Máj	10-50 g	Letisztított szárazra törölt szervetengeri homokkal finom péppé dörzsölve	5 × -ös aceton petroléterrel 1 órán át rázva, majd 12 órán át áll.	+	-	Vákuumban	10 ml kloroformmal
5. Viaszokban (méhviasz, cetáceum stb.) oldott szilárd A-vitamin koncentrátum	50 mg	-	-	-	Kloroformban 10 ml-re	-	-



Mi a méréseket „UVIFOT” fotométerrel, 578 m $\mu$ -nál, 5 ml-es 1 cm-es réteg-vastagságú üvegvastagságban végeztük. Az extinkciókat, mint az A-vitamin tartalom függvényét ábrázolja az 1. ábra grafikonja.



1. ábra

Az A-vitamin meghatározást más eredetű anyagokra is kiterjesztettük, amikor is azok előkészítése elvileg megegyezik a fentiekben ismertetett irányelvekkel, azonban anyagoként, bizonyos módosításokkal történik.

A 2. táblázatban útmutatásul ezeket a típus meghatározásokat foglaltuk össze.

#### IRODALOM

- (1) Sobel, A. E. Werbin H.: J. of. Biol. Chem. 159, 681, 1945.

### ВИДОИЗМЕНЕННЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА „А”

Дь. Геци

Автор разработал метод определения содержания витамина „А” в концентрированных кормах (Премикс), в масляных, вошених, (цетацеум, воск и т. д.) водных растворах и в печени.

Принцип определения следующий:

Для определения содержания витамина „А” из корма или печени готовится вытяжка смесью ацетона-петролейным эфиром 2:8, вытяжка осветляется, выпаривается и остаток растворяется в хлороформе и в случае необходимости осветляется. Образцы растворимые в воде растворяются в хлороформе после выпаривания. Количество витамина „А” определяется в хлороформовых растворах 1,3-глицериндихлоргидрином содержащим 1% ацетилхлорида. Поглощение света фиолетовой окраски полученной от синей окраски измеряется при 578 m $\mu$ .

## MODIFIZIERTES VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON A-VITAMIN

Gy. Géczy

Verfasser beschreibt in seiner Arbeit ein Verfahren zur Bestimmung von A-Vitamin aus Futterkonzentraten (Premix), aus öligen, wächsernen (Cetaceum, Bienenwachs usw.), wässrigen Lösungen bzw. aus Leber. Das Prinzip des Verfahrens ist folgendes:

Aus der A-Vitamin enthaltenden Probe wird im Falle von Futtermittel, bzw. Leber mittels einem Gemisch von Aceton-Petroläther 2:8 ein Extrakt bereitet, derselbe bis zur Farblosigkeit geklärt, eingengt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die öligen, bzw. wächsernen Proben werden nach erfolgreicher Einwaage unmittelbar in Chloroform gelöst und wenn notwendig, geklärt. Die wasserlöslichen Proben werden nach Eintrocknen in Chloroform gelöst. Aus den chloroformischen Lösungen wird das A-Vitamin mittels 1% Acetylchlorid enthaltendem 1,3-Glycerindichlorhydrin bestimmt. Die Extinktion der aus Blau in Lila umschlagenden Farbe wird bei 578 m $\mu$  gemessen.

## MODIFIED METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITAMIN A

Gy. Géczy

A routine method was evolved by the author for the determination of vitamin A in animal feed concentrates (Premixes), oily solutions (e. g. cetaceum), aqueous solutions, and liver. The principle of the method is as follows.

Allow to stand the sample (feed) overnight (in darkness) with a fivefold volume of a 2:8 mixture of acetone and petroleum ether at room temperature. Filter, treat the filtrate with carbon, evaporate the colourless solution in vacuum in a nitrogen atmosphere. Dissolve the residue in 10 ml of dry chloroform. In the case of oily or waxy samples, the weighed samples can directly be dissolved in chloroform, and decolorized if necessary. Water-soluble samples are evaporated, and subsequently dissolved in chloroform.

The chloroformic solutions are diluted with an equal volume of 1,3-glyceroldichlorohydrine containing 1% acetylchloride. The extinction of the developed blue colour turning violet is measured at 578 m $\mu$ .

## PROCÉDÉ MODIFIÉ POUR LE DOSAGE DE LA VITAMINE A

Gy. Géczy

L'auteur décrit un procédé pour le dosage de la vitamine A dans des concentrats fourragers (Premix), dans des solutions aqueuses huileuses et à base de cire (cétacée, cire d'abeilles etc) et dans le foie.

Le principe du procédé est le suivant:

A partir de l'échantillon contenant de la vitamine A on prépare, dans le cas des fourrages et du foie, un extrait avec de l'acétone-éther de pétrole (2:8), que l'on clarifie jusqu'à décoloration et après évaporation on dissout le résidu dans du chloroforme. Dans le cas des échantillons huileux et à base de cire, respectivement, on dissout l'échantillon pesé immédiatement dans du chloroforme et on le clarifie, si cela est nécessaire. Les échantillons solubles à l'eau sont dissous dans la chloroforme après évaporation. Dans les solutions au chloroforme on dose la vitamine A avec 1,3 glycéridichlorohydrine contenant 1% de chlorure d'acétyle. L'on mesure l'extinction de la couleur bleue passant au lila à 578 m $\mu$ .