

**Determinazione delle vitamine nei prodotti farmaceutici.
I. Trans-retinolo (vitamina A)**

AURELIO MARIANI e CONCETTA MARIANI-VICARI

Laboratori di Biologia

PREMESSA	1
CARATTERISTICHE E FORME FARMACEUTICHE DELLA VITAMINA A	2
METODI DI DETERMINAZIONE:	
<i>Determinazione spettrofotometrica</i>	4
<i>Determinazione fotometrica con alfa-dicloridrina glicerica</i>	6
<i>Determinazione mediante trasformazione in anidrovitamina</i>	7
<i>Determinazione fotometrica con tricloruro di antimonio</i>	9
METODI DI ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE:	
<i>Estrazione selettiva</i>	11
<i>Saponificazione</i>	12
<i>Cromatografia</i>	13
METODI DI DETERMINAZIONE DI PARTICOLARI FORME:	
<i>Vitamina A in microsfele</i>	15
<i>Miscela di isomeri</i>	16
CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE	18

PREMESSA

Nel 1953 venne pubblicato un volume « Metodi di controllo delle vitamine » a cura di alcuni ricercatori dell'Istituto. Il problema della determinazione delle vitamine nei prodotti farmaceutici è rimasto di attualità, anzi è aumentato di interesse, dato il sempre più diffuso impiego di queste sostanze in terapia e lo sviluppo della tecnica farmaceutica. Si è resa pertanto indispensabile la elaborazione di nuovi metodi e la sperimentazione di procedimenti desunti dalla letteratura, al fine di risolvere i vari problemi analitici resi più complessi dalle molteplici forme di presentazione di una specialità medicinale.

Sono già apparse pregevoli raccolte di metodi di determinazione delle vitamine, tra cui particolarmente accurate ed utili quella di Stroheker ed

Henning (1963), quella a cura della Association of Vitamin Chemists (1966) e la nuova edizione (1967) dell'opera di György e Pearson.

Queste opere ed i lavori originali riportati in bibliografia documentano la larga disponibilità di metodologie che la chimica analitica offre in questo campo e la conseguente complessità dei problemi che si presentano nella scelta e nella applicazione delle diverse tecniche.

Scopo di questa rassegna non è stato quello di elaborare un'opera simile a quelle citate ma di raccogliere quei metodi di determinazione del trans-retinolo che, nella nostra esperienza, si sono dimostrati più adatti nella analisi dei prodotti farmaceutici, completandoli con osservazioni che permettessero di valutarne l'applicabilità. La determinazione delle vitamine nei prodotti farmaceutici, infatti, può essere condotta con procedimenti analitici vari, ma in pratica per giungere ai risultati migliori si deve seguire il procedimento più adatto alla forma sotto cui si presenta il prodotto da analizzare: ogni metodica ha infatti le sue limitazioni che è bene conoscere e tenere presenti prima di applicarla.

CARATTERISTICHE E FORME FARMACEUTICHE DEL TRANS-RETINOLO (VITAMINA A)

Nella tabella che segue vengono raccolte le caratteristiche relative al trans-retinolo e ai suoi derivati, caratteristiche che possono essere di utilità nell'impiego dei procedimenti analitici che vengono in seguito descritti e nella elaborazione dei risultati.

La vitamina A si può trovare come componente unico od associata ad altre vitamine o sostanze medicamentose in: *Soluzioni oleose* (in fiale, in gocce, in perle); *soluzioni idrodisperse* (in fiale, in gocce); *capsule*; *sciroppi*; *supposte*; *pomate*; *liofilizzati*.

Per la preparazione di tali forme farmaceutiche vengono impiegati il trans-retinolo e i suoi esteri acetico o palmitico che in commercio possono trovarsi, come materia prima, nelle seguenti forme:

- 1) Trans-retinolo di sintesi (vitamina A alcool puro);
- 2) Trans-retinil acetato (acetato di vitamina A puro);
- 3) Concentrati di vitamina A esterificata: soluzioni oleose di acetato o palmitato di vitamina A a titolo dichiarato (generalmente 1 milione di U.I./g);
- 4) Soluzioni di esteri di vitamina A allo stato idrodisperso a titolo dichiarato (generalmente 200.000-300.000 U.I./g);
- 5) Vitamina A estere in forma protetta: microsfele gelatinizzate a titolo dichiarato (generalmente 500.000 U.I./g);
- 6) Vitamina A palmitato in polvere idrodispersibile a freddo a titolo dichiarato (generalmente 250.000 U.I./g).

Caratteristiche del trans-retinolo e suoi derivati

Denominazione	Formula bruta	P. M.	Max ass. nm	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	Attività biologica	Osservazioni
Trans-retinolo (axeroftolo)	$C_{20}H_{30}O$	286,44	324-325	1835 (etanolo) 1750 (cicloesano)	$3,33 \cdot 10^6$ U. I./g (1 U. I. = 0,300 μg)	Cristalli gialli p. f. 62-64°C
Trans-retinolo acetato	$C_{22}H_{32}O_2$	328,48	325-328	1550 (etanolo) 1530 (isopropanolo) 1520 (cicloesano)	$2,91 \cdot 10^6$ U. I./g (1 U. I. = 0,344 μg)	Cristalli prismatici giallo pallido p. f. 57-58°C
Trans-retinolo palmitato	$C_{36}H_{60}O_2$	524,84	325-328	975 (etanolo)	$1,82 \cdot 10^6$ U. I./g (1 U. I. = 0,550 μg)	Amorfo o cristalli p. f. 28-29°C
Trans-retinale (retinene, axeroftale)	$C_{20}H_{28}O$	284,42	375 (cicloesano) 381 (etanolo)	1548 1530	$3,03 \cdot 10^6$ U. I./g (1 U. I. = 0,330 μg)	Cristalli giallo arancio p. f. 61-64°C
Deidro-retinolo vitamina A ₂	$C_{20}H_{26}O$	284,42	351 e 387	1460 e 820 (etanolo)	$1,33 \cdot 10^6$ U. I./g (1 U. I. = 0,750 μg)	Olio giallo

METODI DI DETERMINAZIONE

- 1) Determinazione spettrofotometrica
- 2) Determinazione fotometrica con alfa-dicloridrina glicerica
- 3) Determinazione mediante trasformazione in anidrovitamina
- 4) Determinazione fotometrica con tricloruro di antimonio

*Determinazione spettrofotometrica**Principio del metodo.*

La vitamina A (alcol libero o suoi esteri), sciolta in opportuno solvente, mostra una curva di assorbimento caratteristica il cui massimo varia da 325 a 328 nm a seconda della forma chimica e del solvente. L'assorbimento corrispondente al massimo è direttamente proporzionale alla concentrazione di vitamina A; si può perciò calcolare il contenuto in vitamina, espresso in U.I. dalla formula:

$$\frac{E}{c \cdot d} \cdot F = \text{U.I./g}$$

in cui:

E = valore dell'assorbimento misurato al massimo,

c = g di materiale in 100 ml di soluzione,

d = spessore della vaschetta in cm,

F = fattore di conversione in U.I.

Il quoziente $\frac{E}{c \cdot d}$ corrisponde all'assorbimento specifico ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$).

Il fattore F varia a seconda che si tratti di vitamina A alcool o vitamina esterificata e, per una medesima forma, a seconda del solvente impiegato. I valori che vengono in pratica usati sono:

vitamina A alcool	1830	alcool isopropilico o etilico
	1900	cicloesano
vitamina A esterificata	1900	alcool isopropilico
	1875	alcool etilico
	1910	cicloesano.

Reattivi.

Solvente per spettrofotometria nell'U.V. (alcool isopropilico, alcool etilico assoluto, cicloesano).

Procedimento.

Si prepara una soluzione della vitamina in uno dei suddetti solventi, ad una concentrazione di 5-10 U.I./ml e se ne determina l'assorbimento al massimo, in vaschette di quarzo da 1 cm di spessore, con un buon spettrofotometro. Dalla formula già riportata si calcola il contenuto in U. I./g.

Osservazioni.

Il metodo spettrofotometrico è semplice e preciso, ma è applicabile solo se la soluzione in esame non contiene altre sostanze che assorbono nello stesso campo di lunghezza d'onda, cioè 300-350 nm. Ciò si verifica solo eccezionalmente ed in genere per prodotti che contengono vitamina A in concentrazione elevata e che non abbiano subito notevole alterazione.

Più frequentemente vengono sottoposti ad analisi prodotti che, insieme alla vitamina A sotto forma esterificata, contengono altre sostanze che assorbono nello stesso campo di lunghezze d'onda. Per stabilire quando sia applicabile il metodo spettrofotometrico è consigliabile procedere come segue.

Si prepara una soluzione del prodotto in cicloesano alla concentrazione di 5-10 U.I./ml di vitamina A. Si leggono con un buon spettrofotometro, la cui scala delle lunghezze d'onda sia stata tarata di recente, i valori degli assorbimenti a 300, 316, 328, 340 e 360 nm e se ne calcolano i rapporti con quello del massimo (328 nm); tali rapporti non devono differire di $\pm 0,02$ dai seguenti valori:

nm	E/E _{max}
300	0,555
316	0,907
328	1,000
340	0,811
360	0,299

Se ciò si verifica, si può procedere alla misura spettrofotometrica diretta e calcolare il contenuto in U. I./g secondo il procedimento sopra riportato.

Se i rapporti calcolati differiscono dai teorici di valori superiori a 0,02, si calcola l'assorbimento corretto a 328 mn applicando l'equazione:

$$E_{328(\text{corr})} = 3,52 \cdot (2E_{328} - E_{316} - E_{340})$$

Se il valore dell'assorbimento così corretto differisce da quello non corretto di $\pm 3\%$, si trascura la correzione e si calcola l'attività dal valore non corretto; se risulta tra -15 e -3% del valore non corretto, si usa quello corretto per il calcolo della attività; se l'assorbimento corretto si discosta di un valore che supera il -15 o il $+3\%$ da quello non corretto

o se la lunghezza d'onda del massimo di assorbimento non si trova tra 326 e 329 nm, il metodo spettrofotometrico non si può applicare direttamente ma è necessario ricorrere ad un metodo fotometrico (v. oltre) od eseguire prima la saponificazione del campione (v. oltre).

Il metodo spettrofotometrico, infatti, può essere applicato anche dopo saponificazione; in questo caso, il residuo insaponificabile viene disciolto in alcool isopropilico e diluito in modo da avere una concentrazione in vitamina A di 5-10 U.I./ml. Si misurano gli assorbimenti della soluzione a 300, 310, 325, 334 nm e alla lunghezza d'onda a cui si ha il valore massimo. Se il massimo si trova tra 323 e 327 nm ed il rapporto E_{300}/E_{325} è inferiore a 0,73, si può calcolare l'assorbimento corretto applicando la formula:

$$E_{325(\text{corr})} = 6,815E_{325} - 2,555E_{310} - 4,260E_{334}$$

e la corrispondente attività in U.I./g dalla espressione

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%}{}_{325(\text{corr})} \cdot 1830$$

Soltanto nel caso che l'assorbimento corretto non differisca del $\pm 3\%$ da quello non corretto si può usare per il calcolo l' $E_{1\text{ cm}}^{1\%}{}_{325}$ non corretto.

Se si riscontra che il massimo di assorbimento si trova fuori dal campo 323-327 nm o se il rapporto E_{300}/E_{325} è superiore a 0,73, il metodo spettrofotometrico diretto non può essere impiegato e si deve ricorrere ad altri metodi di determinazione o sottoporre la soluzione ad ulteriore purificazione per via cromatografica (v. oltre).

Determinazione fotometrica con alfa-dicloridrina glicerica

Principio del metodo.

La vitamina A alcool e i suoi esteri in soluzione cloroformica danno con dicloridrina glicerica attivata una colorazione blu che passa rapidamente ad una colorazione violetta relativamente stabile.

Reattivi.

- a) Cloroformio p. a.
- b) Tricloruro di antimonio p. a.
- c) Alfa-dicloridrina glicerica
- d) Dicloridrina glicerica attivata. Ad 1 litro di alfa-dicloridrina si aggiungono 20 g di tricloruro di antimonio sciolti in 100 ml di cloroformio. Si distilla la miscela sotto vuoto, in apparecchiatura tutta di vetro; si raccoglie la frazione intermedia che a 15 mm di Hg distilla tra 72 e 75°C. Se conservato in bottiglia scura si mantiene per alcune settimane. Il reattivo deve essere incolore.

Procedimento.

Ad 1 ml della soluzione cloroformica in esame, contenente da 20 ad 80 U. I. di vitamina A, si aggiungono 4 ml di dicloridrina glicerica attivata. Si misura l'assorbimento a 555 nm entro 2-10 minuti dall'aggiunta del reattivo rispetto ad un bianco preparato con 1 ml di cloroformio + 4 ml di reattivo.

Da una curva di taratura si rileva la quantità di vitamina A contenuta nel campione in esame.

Curva di taratura

Si prepara una soluzione cloroformica di vitamina A alcool o di un suo estere, il cui titolo sia stato determinato per via spettrofotometrica, contenente circa 1000 U.I./ml. In 4 palloni tarati da 100 ml si pongono rispettivamente 2, 4, 6 ed 8 ml della soluzione madre e si portano a volume con cloroformio. Si preleva 1 ml di ciascuna soluzione diluita, si aggiungono 4 ml del reattivo e si agita; dopo 2 min e non oltre 10 min si misurano gli assorbimenti delle soluzioni a 555 nm rispetto ad un bianco preparato con 1 ml di cloroformio e 4 ml del reattivo. La misura può essere effettuata sia con uno spettrofotometro sia con un buon fotometro. Con i valori ottenuti si traccia la retta di taratura.

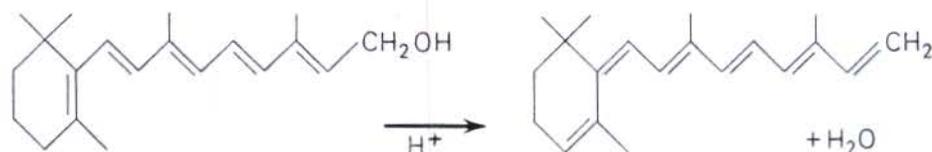
Osservazioni.

Il metodo fotometrico alla dicloridrina glicerica ha applicazioni più estese di quello spettrofotometrico diretto e, fra i metodi colorimetrici, è quello che possiede maggiore specificità; pur non avendo elevata sensibilità, può essere impiegato con successo nella determinazione della vitamina A in molti preparati farmaceutici da cui la vitamina possa essere estratta con adatti solventi. La reazione può essere eseguita direttamente sull'estratto liposolubile o sul residuo insaponificabile; essa viene inibita dalla presenza di cere e di alcune sostanze organiche che si possono trovare con la Vitamina A nei prodotti farmaceutici (p. e. piramidone, antipirina, ecc.).

Determinazione mediante trasformazione in anidrovitamina

Principio del metodo.

La vitamina A, sciolta in solventi anidri, in presenza di tracce di opportuni catalizzatori, si trasforma in anidrovitamina A.



La comparsa della struttura retro con l'aumento del numero di doppi legami ha per conseguenza uno spostamento notevole del massimo di assorbimento verso la regione visibile. Misurando l'aumento dell'assorbimento che la soluzione di vitamina A subisce per effetto della trasformazione, in opportune condizioni sperimentali, è possibile determinare il contenuto di vitamina in estratti insaponificabili provenienti da svariati materiali senza ulteriori purificazioni. Per la determinazione spettrofotometrica con tale procedimento viene scelta la lunghezza d'onda di 397 nm perchè in questa regione la vitamina A non presenta alcun assorbimento mentre l'anidro-vitamina presenta uno dei suoi massimi caratteristici.

Reattivi.

Diclorometano etanolic, 500 ml di diclorometano vengono lavati per quattro volte con 250 ml di acqua; si disidrata con carbonato di potassio, si filtra e si distilla raccogliendo la porzione centrale. 1 ml di alcool etilico anidro si diluisce a 200 ml con il diclorometano lavato e distillato.

Dietilamina p. a.

Reattivo disidratante, 50 mg di acido p-toluensolfonico, mantenuto in essiccatore per almeno 12 ore su P_2O_5 , si sciogliono in diclorometano etanolic portando a 100 ml.

Procedimento.

La vitamina A, dopo saponificazione, viene ripresa in diclorometano etanolic in modo che la soluzione contenga 5-20 U.I. di vitamina A/ml. A 5 ml della soluzione mantenuta a $20^\circ C \pm 1^\circ$ si aggiungono 5 ml del reattivo disidratante, si mescola e, esattamente dopo 2 min e 30 sec, vi si aggiungono 0,05 ml di dietilamina. Parallelamente si allestisce un bianco aggiungendo a 5 ml del reattivo disidratante prima 0,05 ml di dietilamina e poi 5 ml della stessa soluzione da analizzare. Si misura l'assorbimento della prima soluzione rispetto alla seconda a 397 nm in vaschette da 1 cm di spessore con tappo a smeriglio. Il contenuto in vitamina A si calcola moltiplicando il valore dell'assorbimento letto per un fattore F che viene determinato ogni volta che si preparano i reattivi. Infatti questo fattore oscilla di poco intorno al valore di 29,5, ma dipende in modo notevole dalla quantità di alcool contenuto nel diclorometano che viene impiegato sia per la preparazione della soluzione di vitamina A che per il reattivo disidratante.

Determinazione del fattore di conversione « F ».

30-60 mg di retinolo acetato cristallino o 100-200 mg di soluzione oleosa concentrata di vitamina A estere, il cui titolo sia stato determinato per via spettrofotometrica, vengono sottoposti a saponificazione, l'insapo-

nificabile ripreso con diclorometano etanolic e portato a volume : da questa si preparano 3 soluzioni contenenti rispettivamente 5, 10, 15 U. I. di vitamina A per ml. 5 ml di ciascuna soluzione vengono trattati secondo il procedimento sopradescritto in modo da avere tre valori di assorbimento a 397 nm (E_1, E_2, E_3) corrispondenti a tre valori di U.I. per ml (U_1, U_2, U_3). Il rapporto U/E dà il valore del fattore di conversione « F » e poichè si avranno tre dati corrispondenti a :

$$\frac{U_1}{E_1} = F_1 \quad \frac{U_2}{E_2} = F_2 \quad \frac{U_3}{E_3} = F_3$$

la media aritmetica tra i tre valori ottenuti rappresenterà il fattore di conversione da impiegare nel calcolo per una determinazione di vitamina A impiegando lo stesso diclorometano etanolic e lo stesso reattivo disidratante.

Osservazioni.

Il metodo spettrofotometrico con trasformazione in anidrovitamina ha il grande vantaggio, rispetto ad altri metodi, di possedere la più alta specificità e permette perciò di determinare la vera vitamina A anche in presenza di prodotti di alterazione o di altre sostanze, che normalmente accompagnano questa vitamina. Il metodo non può naturalmente essere applicato agli esteri della vitamina A se non dopo saponificazione. Molta cura deve essere posta nella purificazione e disidratazione dei reattivi impiegati, nel controllo della temperatura ($20^\circ \pm 1^\circ\text{C}$) e nel procedimento per il calcolo del fattore di conversione.

Determinazione fotometrica con tricloruro di antimonio

Principio del metodo.

La vitamina A alcool ed i suoi esteri in soluzione cloroformica reagiscono con una soluzione concentrata di tricloruro di antimonio dando una colorazione blu labile. L'assorbimento a 620 nm della soluzione colorata è proporzionale, entro certi limiti, alla concentrazione della vitamina A nella soluzione.

Reattivi.

Cloroformio p. a. (contenente circa 1 % di etanolo).

Carbonato di potassio p. a.

Tricloruro di antimonio p. a.

Cloroformio anidro esente da alcool. Circa 500 ml di cloroformio p. a. vengono agitati in separatore per 3-4 volte con 200 ml di acqua ; si lascia il cloroformio lavato su carbonato di potassio in pallone ben chiuso al riparo

dalla luce per 24 ore. Si separa poi cautamente, se necessario filtrando, dal carbonato di potassio e si distilla su nuovo carbonato di potassio raccogliendo la porzione centrale del distillato.

Soluzione di tricloruro di antimonio. Circa 30 g di tricloruro di antimonio in grossi pezzi vengono pesati rapidamente in un mortaio e lavati per rapida agitazione con circa 20 ml del cloroformio distillato di fresco eliminando il più completamente possibile il liquido di lavaggio. Il tricloruro di antimonio viene subito triturato; circa 20 grammi di esso vengono sciolti in un pallone assolutamente asciutto con il cloroformio distillato di fresco e portati a 100 ml. Si conserva meglio su solfato di sodio anidro.

Procedimento.

Ad 1 ml della soluzione cloroformica in esame, contenente circa 10-15 U. I. di vitamina A, nella vaschetta del fotometro, si aggiungono 3 ml della soluzione di tricloruro di antimonio. Si misura subito l'assorbimento a 620 nm rispetto a cloroformio; la lettura deve essere eseguita entro 8 sec dall'aggiunta del reattivo perchè l'intensità del colore diminuisce subito. Il contenuto in vitamina A viene ricavato da una curva di riferimento.

Curva di riferimento.

Si prepara una soluzione cloroformica di vitamina A acetato cristallizzato o di concentrato oleoso di vitamina A controllato per via spettrofotometrica, contenente circa 2500 U. I. per ml; 10 ml di questa soluzione vengono diluiti a 100 ml con cloroformio; in 4 palloncini da 25 ml si pongono rispettivamente 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 ml di questa soluzione e si porta a volume con cloroformio. Ad 1 ml di ciascuna soluzione, posto nella vaschetta del fotometro, si aggiungono 3 ml di soluzione di tricloruro di antimonio e si misura l'assorbimento a 620 nm rispetto a cloroformio entro 8 sec dalla aggiunta del reattivo. Con i valori ottenuti si traccia la curva di riferimento; se il reattivo viene conservato per lungo tempo è bene controllare la curva di tanto in tanto. Per ogni soluzione di reattivo è indispensabile ripetere la curva di taratura.

Osservazioni.

Il metodo fotometrico al tricloruro di antimonio presenta, in confronto agli altri metodi, il vantaggio della specificità, in quanto il numero dei composti che danno con tricloruro di antimonio una colorazione simile a quella della vitamina A è limitato. Purtroppo però molte delle sostanze che spesso accompagnano la vitamina A (p. es. carotinoidi) reagiscono con il tricloruro di antimonio. Tra gli svantaggi del metodo è la instabilità della colorazione e il fatto che essa viene influenzata da tracce di umidità e di alcool.

Il reattivo, inoltre, è poco pratico per la sua causticità e perchè lascia fastidiosi residui sui recipienti di vetro e soprattutto nelle vaschette del fotometro che devono essere pulite nel più breve tempo possibile con acido cloridrico concentrato.

È consigliabile eseguire la reazione sul residuo insaponificabile perchè gli acidi grassi insaturi, contenuti soprattutto negli olii di fegato di pesce, disturbano la determinazione; la saponificazione può essere evitata, nel caso di soluzioni oleose concentrate di vitamina A acetato o palmitato, premesso che l'olio impiegato non disturbi la reazione; in questo caso si scioglie il preparato direttamente in cloroformio e si esegue la reazione.

Il metodo al tricloruro di antimonio, che è stato il primo impiegato per la determinazione della vitamina A, viene ora usato raramente nel controllo dei preparati farmaceutici; rimane tuttavia insostituibile nel caso si voglia determinare il contenuto di isomeri *cis* in presenza della forma *trans* della vitamina A (v. determinazione della vitamina A nelle miscele di isomeri).

METODI DI ESTRAZIONE E DI PURIFICAZIONE

Estrazione selettiva

I metodi descritti possono essere impiegati per la determinazione della vitamina A solo dopo che essa sia stata portata in soluzione allo stato più o meno puro. Ciò si ottiene con procedimenti diversi, in rapporto alla forma farmaceutica e alla natura delle sostanze che accompagnano la vitamina stessa.

Nei casi più semplici è sufficiente effettuare una estrazione selettiva della vitamina A, fondandosi sulle sue proprietà di solubilità; ciò si verifica soprattutto quando il prodotto in esame è costituito da compresse, supposte, capsule e perle.

I solventi più usati sono il cloroformio e l'etere di petrolio; data la facile alterabilità della vitamina, è indispensabile l'uso di solventi ad alto grado di purezza; le soluzioni ottenute devono essere protette dalla azione diretta della luce e dell'aria e devono essere analizzate nel più breve tempo possibile (è consigliabile l'uso di vetreria anattinica).

Nel caso in cui la vitamina A sia dispersa in soluzioni acquose mediante tensioattivi, l'estrazione viene eseguita con il seguente procedimento.

2 ml della soluzione, contenenti non meno di 1000 U. I. di vitamina A, vengono fatti cadere goccia a goccia su 6 g di « Florisil » contenuti in un tubo a bocca larga con tappo a smeriglio. Si agita bene fino ad ottenere una polvere uniforme che viene trasferita in una colonna cromatografica del diametro di mm 14 con giunti a smeriglio sul cui fondo si è posto un tampone di ovatta; si ricopre la polvere con un altro tampone di ovatta e si percola con adatto

solvente (generalmente benzolo) che viene fatto defluire lentamente facendo attenzione che la colonna sia sempre ricoperta dal solvente.

Fino a 10.000-15.000 U. I. di vitamina A sono sufficienti 100 ml di solvente.

Le soluzioni ottenute con i metodi di estrazione suddetti, o aliquote di esse, devono essere evaporate al fine di portare il residuo in soluzione con il solvente adatto al metodo di analisi che si vuole eseguire. Se il volume di solvente è piccolo esso viene evaporato a bagnomaria (non superare 30°C) in corrente di azoto. In ambedue i casi gli ultimi ml di solvente devono essere evaporati a temperatura ambiente.

Saponificazione

Quando il metodo di determinazione è applicabile solo alla forma vitamina A alcool oppure quando si deve isolare la vitamina da altri prodotti liposolubili che potrebbero interferire nella determinazione (oli, grassi, ecc.), si ricorre a procedimenti di saponificazione e di isolamento dell'insaponificabile. Tra i molti metodi riportati in letteratura sono preferibili quelli descritti qui appresso.

1°) Saponificazione a caldo

Reattivi.

Alcool etilico assoluto p. a.

Butilidrossianisolo p.a.

Sodio solfato anidro p. a.

Soluzione N/2 di idrato di potassio

Soluzione di idrato di potassio 33 % (p/v) preparata di fresco.

Procedimento.

In un pallone da saponificazione con collo a smeriglio, preferibilmente in vetro giallo, si pesa una quantità del materiale da analizzare che contenga non meno di 500 U. I. di vitamina A e non più di 1 g di grasso o di olio. Si aggiungono 30 ml di etanolo, 0,1 g di butilidrossianisolo e 3 ml della soluzione di idrato di potassio. Si scalda a refluxo per 30 min su bagnomaria bollente, si raffredda rapidamente con acqua corrente e si trasporta quindi con 30 ml di acqua in un imbuto separatore.

Si estrae per 4 volte con 40 ml di n-pentano per volta agitando energicamente. Gli estratti riuniti si lavano 2 volte con 100 ml di idrato di potassio N/2 e 2 volte con 100 ml di acqua. Si secca la fase organica su solfato di sodio anidro e si filtra rapidamente attraverso ovatta in un pal-

lone da distillazione lavando due volte con 10 ml di n-pentano. Si evapora secondo le modalità sopra descritte e si scioglie il residuo nel solvente adatto al metodo di analisi che si vuole eseguire.

2°) Saponificazione a freddo

Reattivi.

Alcool isopropilico p. a.

Idrochinone p. a.

Soluzione di idrato di potassio 10 % in isopropanolo (p/v) preparata di fresco

Soluzione di idrato di potassio 5 % in acqua

Soluzione satura di solfato di calcio

Solfato di sodio anidro

Etere di petrolio (p. e. 30°-50°C) p. a.

Procedimento.

In una beuta con tappo a smeriglio si pesa esattamente una quantità del materiale in esame contenente non più di 1 g di grasso od olio. Si aggiungono 10 ml di potassa isopropanolica al 10 % e 100 mg di idrochinone; dopo aver mescolato si lascia il recipiente chiuso a temperatura ambiente al riparo dalla luce per almeno 8 ore. Con l'aiuto di 30 ml di acqua si trasporta tutto in imbuto separatore e si estrae 3 volte con 40 ml di etere di petrolio per volta. Gli estratti petroleteri, riuniti in un separatore da 250 ml, vengono lavati due volte con 120 ml di idrato di potassio al 5 %, una volta con 120 ml di soluzione di solfato di calcio, una volta con 120 ml di H₂O. All'estratto lavato si aggiungono circa 5 g di solfato di sodio anidro e si agita; dopo 10 minuti si filtra in un pallone tarato da 200 ml, si lavano separatore e filtro tre volte con 10 ml di etere di petrolio e si porta a volume. Una aliquota viene evaporata con le modalità descritte e sottoposta ad analisi.

Osservazioni.

La saponificazione può essere eseguita direttamente sul materiale da analizzare o sul residuo ottenuto dopo estrazione selettiva, se questo procedimento può essere utile al fine di allontanare quelle sostanze che possono intralciare la saponificazione stessa.

Purificazione per via cromatografica

La vitamina A contenuta nei prodotti farmaceutici può andare incontro, per cattive condizioni di preparazione o di conservazione, a fenomeni di degradazione. I prodotti di decomposizione che si formano, privi di attività

vitaminica, possono falsare i risultati delle analisi in quanto interferiscono sia nella determinazione spettrofotometrica che in quelle colorimetriche della vitamina A. È necessario quindi sottoporre la soluzione ottenuta dopo saponificazione ad una successiva purificazione. Ciò si ottiene nel modo migliore effettuando una cromatografia su colonna di ossido di alluminio nel modo seguente.

Materiale.

Colonna per cromatografia con diametro interno di 12 mm munita di raccordi a smeriglio.

Reattivi.

Etere di petrolio p.a. con p.e. inferiore a 40°C.

Etere etilico privo di perossidi.

Ossido di alluminio standardizzato per cromatografia di adsorbimento sec. Brockman.

Ossido di alluminio con 10 % di acqua: l'ossido di alluminio standardizzato sec. Brockman viene attivato in muffola a 600°C per 4 ore, poi si fa raffreddare in essiccatore. In una beuta con tappo a smeriglio se ne pesano 100 g e si sbattono vigorosamente con 10 ml di acqua. Si usa dopo 24 ore; prima dell'uso si agita di nuovo.

Procedimento.

Si riempie la colonna cromatografica con etere di petrolio e vi si versa l'ossido di alluminio al 10 % di acqua; si lascia sedimentare fino ad una altezza di 10 cm; si fa defluire l'etere di petrolio fino a che ne rimanga 1 cm sopra l'adsorbente. Una aliquota della soluzione proveniente dalla saponificazione viene evaporata secondo le modalità descritte, si riprende il residuo con pochi ml di etere di petrolio e si porta quantitativamente sulla colonna preparata. Non appena tutta la soluzione è penetrata nella colonna, si lava questa prima con porzioni da 1 ml, poi con porzioni da 5 ml di etere di petrolio per complessivi 50-70 ml. La vitamina A forma una zona visibile in luce U. V. (365 nm) fluorescente in giallo-verde alla sommità della colonna. Si eluisce ora la colonna con etere di petrolio contenente il 10 % di etere etilico e si scarta l'eluato fino a che la banda fluorescente della vitamina A sia giunta ad 1 cm dalla base della colonna; da questo momento si continua l'eluizione con lo stesso solvente raccogliendo però l'eluato contenente la vitamina fino a che la colonna, osservata in luce U.V. non mostra più alcuna fluorescenza giallo-verde. La soluzione viene evaporata secondo le modalità descritte, il residuo ripreso in adatto solvente ed in esso la vitamina A determinata con uno dei procedimenti riportati.

METODI DI DETERMINAZIONE DI PARTICOLARI FORME

Vitamina A in microsferi

Si presenta come prodotto solido costituito da microsferi. Si ottiene dalla solidificazione, in condizioni opportune, di una emulsione in gelatina atomizzata di vitamina A estere che viene, in questo modo, protetta dall'ossidazione. Viene impiegata nella fabbricazione di compresse, capsule, granulati e supposte.

Solubilità.

Insolubili nei comuni solventi organici, in acqua le microsferi si rigonfiano e, se si porta la temperatura a 65-70°C, si dissolvono dando una dispersione lattescente. La dispersione dei granuli viene facilitata da tracce di alcali.

Metodo di analisi A

Reattivi

Etere etilico p. a.

Etanolo p. a.

Ammoniaca 10 %

Alcool isopropilico p. a.

Procedimento.

I granuli, isolati dal materiale in esame, vengono trasferiti quantitativamente in una piccola beuta con l'aiuto di 2-3 ml di acqua e di 0,5 ml di ammoniaca 10 %. Si immerge la beuta in un bagnomaria regolato a 65°C e, sotto corrente di azoto, si agita per 10 min. La sospensione lattescente formatasi viene portata quantitativamente in un pallone tarato da 100 ml con 20 ml di alcool etilico assoluto aggiunto a piccole porzioni. Al pallone si aggiungono 70 ml di etere etilico, si agita bene e si porta a volume con altro etere etilico. Si mescola bene e si lascia in riposo per far separare al fondo i fiocchi di gelatina. Una aliquota corrispondente a circa 500 U. I. presunte di vitamina A viene evaporata in corrente di azoto in un pallone da 50 ml. Il residuo viene sciolto in alcool isopropilico e portato a volume. Si misura, in vaschetta da 1 cm, l'assorbimento (A) a 328 nm rispetto al solvente e si calcolano la U.I. di vitamina dalla espressione :

$$\frac{A}{C \%} \cdot 1900$$

in cui A è il valore dell'assorbimento letto e C % la concentrazione in 100 ml del materiale di partenza.

Metodo di analisi B

Reattivi.

Soluzione acquosa di idrato di potassio: 50 g di idrato di potassio sciolti in acqua e portati a 320 ml.

Alcool etilico assoluto p.a.

Procedimento.

I granuli, separati dal materiale in esame, vengono portati quantitativamente in un pallone da 100 ml con l'aiuto di 7 ml di soluzione acquosa di idrato di potassio e si pone il pallone in un bagnomaria regolato a 85-95°C, agitando per 1-2 min (fino a completa dispersione). Si aggiungono quindi 25 ml di alcool assoluto e si continua a riscaldare per un tempo totale di mezz'ora. Si toglie il pallone dal bagno, si raffredda in acqua corrente, si aggiungono 20 ml di acqua e si porta a volume con alcool. Si filtra rapidamente, se la soluzione è torbida, e si effettua una seconda diluizione con alcool in modo da avere una concentrazione presunta di circa 10-15 U. I. di vitamina A per ml.

Si misura l'assorbimento a 325 nm rispetto ad un bianco che contenga idrato di potassio e solventi nelle stesse proporzioni della prova. Si calcola il contenuto di vitamina A in U.I. dalla formula:

$$\frac{A}{C\%} \cdot 1830$$

dove A è il valore dell'assorbimento misurato e C% la concentrazione in 100 ml del materiale di partenza.

Osservazioni.

I due metodi sopra descritti permettono di determinare la vitamina A nei prodotti dai quali è possibile isolare i granuli per mezzo di solventi; ciò è attuabile quando le sostanze che accompagnano la vitamina sono solubili in solventi organici (cloroformio) o quando in tali solventi si separano per gravità (i granuli si ritrovano alla superficie del cloroformio). In questi casi i granuli possono essere portati quantitativamente in un crogiuolo a setto filtrante e lavati con piccole porzioni di cloroformio. Si procederà poi su questi con uno dei metodi descritti.

Qualora la separazione dei granuli non sia possibile si deve procedere ad una saponificazione diretta sul prodotto *in toto* e determinare la vitamina nel residuo insaponificabile.

Determinazione della vitamina A nelle miscele di isomeri

Tra le materie prime in commercio si trovano soluzioni oleose contenenti insieme al *trans*-retinolo i suoi tre principali isomeri geometrici: 13-*cis*,

9-*cis* e 9,13 di-*cis*; tali miscele sono particolarmente adatte per la preparazione di idrodispersioni a mezzo di tensioattivi. Poichè gli isomeri *cis* possiedono attività biologica inferiore a quella del *trans*-retinolo, per valutare l'attività di questi preparati si impiega un metodo particolare fondato sulla reazione con anidride maleica.

Principio del metodo.

L'anidride maleica si addiziona con il *trans*- e il 9-*cis*-retinolo impedendo la reazione di queste forme con il tricloruro di antimonio, mentre non reagisce con le forme 13-*cis* e 9,13 di-*cis*. Trattando quindi in maniera opportuna con tricloruro di antimonio la soluzione contenente i vari isomeri prima e dopo trattamento con anidride maleica si determina il contenuto percentuale di isomeri 13-*cis*; da questo, per mezzo di relazioni matematiche, si può calcolare il cosiddetto « valore maleico » e l'attività biologica del preparato in esame.

Materiale.

3 palloncini tarati da 10 ml ed 1 da 50 ml in vetro scuro.

Tutto quello che è stato riportato per la saponificazione, l'estrazione e la determinazione colorimetrica con il reattivo al tricloruro di antimonio.

Reattivi.

Benzene p. a.

Soluzione di anidride maleica: 10 g di anidride maleica p. a. sciolti in 100 ml di benzene. La soluzione si mantiene per una settimana.

Procedimento.

Si esegue la saponificazione del materiale in esame e si scioglie il residuo insaponificabile in etere etilico; si determina il contenuto in vitamina A di questa soluzione per mezzo della reazione colorimetrica con tricloruro di antimonio. Una aliquota della soluzione eterea viene evaporata in corrente di azoto ed il residuo ripreso con benzene in modo che 5 ml contengano circa 1250 U. I. di vitamina. Si pipettano 5 ml esatti di questa soluzione in ciascuno di due palloncini tarati da 10 ml. Il primo si porta a volume con benzene, il secondo con la soluzione di anidride maleica; si mescola il contenuto e si lascia in riposo per 16 ore a 25°C. Passato questo tempo si determina la vitamina A nelle due soluzioni; 2 ml della prima si diluiscono a 25 ml con cloroformio e se ne preleva 1 ml per la determinazione colorimetrica, la seconda soluzione viene diluita opportunamente in modo che si possa eseguire la reazione colorimetrica su 1 ml della soluzione finale. La diluizione infatti dipende dalla maggiore o minore quantità di isomeri *cis* nella miscela. Per mezzo di una curva di taratura si calcolano le U. I. per ml nelle due soluzioni.

Calcolo.

- 1) Percentuale di isomeri
- cis*
- nella miscela (R):

$$\frac{\text{U. I. nella seconda soluzione}}{\text{U. I. nella prima soluzione}} \cdot 100 = R$$

- 2) Valore maleico (VM):

$$\frac{R - 1,10}{88,4} \cdot 100 = VM$$

- 3) Attività biologica relativa (AR):

$$99,5 - 0,2 (VM) - 0,051 (VM)^2 + 0,000768 (VM)^3 = AR$$

(Esistono tabelle che riportano le attività biologiche relative corrispondenti ai diversi « valori maleici »)

- 4) Attività biologica reale della miscela (AB):

$$\frac{\text{U. I./g} \cdot AR}{100} = AB$$

Osservazioni.

Il metodo all'anidride maleica non consente la determinazione dei singoli isomeri ma è di grande utilità per il calcolo dell'attività biologica totale di una miscela di essi; la presenza ed il riconoscimento degli isomeri in un prodotto è rilevabile per mezzo di cromatografia su strato sottile.

CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

È di grande utilità per svelare la presenza della vitamina A, dei suoi esteri ed isomeri e dei loro prodotti di decomposizione.

Come adsorbente si usa generalmente uno strato di gel di silice HF₂₅₄ di 250 micron di spessore. Si varia la composizione del solvente in rapporto alla natura dei composti; quando si voglia separare la vitamina A alcool dai suoi esteri o si voglia riscontrare la presenza di prodotti di alterazioni, si impiega un eluente formato da cicloesano: etere etilico (4:1) o cicloesano: acetato di etile (9:1); con questi sistemi gli R_f sono, in ordine crescente per vitamina A alcool, vitamina A acetato, vitamina A palmitato. Se vi è presenza di anidrovitamina A, che si è potuta formare in seguito ad alterazione, questa si ritroverà avanti alla vitamina A palmitato.

Quando si vogliono ricercare i vari isomeri della vitamina A in presenza della forma *trans*, si effettuano due cromatografie: la prima sulle forme esterificate e la seconda dopo saponificazione. Nel primo caso, impiegando una miscela esano: etere etilico (95:5), l'isomero 13-*cis* insieme al 9,13 di-*cis* migrerà in testa, la forma *trans* in coda ed in posizione intermedia si osser-

verà la forma 9-*cis*. Per le forme alcoliche, l'eluizione con una miscela di Skellysolve F : metileptenone (11 : 3) sposterà di più il 13-*cis*, un po' meno il 9,13 di-*cis* e in fine la forma *trans* insieme al 9-*cis*. Combinando quindi le due cromatografie è possibile rivelare la presenza di tutti e quattro gli isomeri più comuni della vitamina A.

Osservazioni.

In tutti i casi la cromatografia deve essere condotta con la massima cura per evitare la alterazione dei prodotti durante la deposizione e la cromatografia stessa. È indispensabile deporre i campioni sulla lastra mantenuta in corrente di azoto e procedere nel più breve tempo possibile alla migrazione in vasche riempite di azoto e protette dalla luce.

Anche prendendo tutte le precauzioni possibili, si possono verificare delle lievi alterazioni ed è per questa ragione che la cromatografia su strato sottile non è adatta per una determinazione quantitativa dei composti che vengono separati, ma è impiegabile soltanto per svelarne la presenza.

5 marzo 1969.

BIBLIOGRAFIA

Maggiori particolari sulla descrizione dei metodi analitici riportati si possono desumere dalla consultazione, oltre che dai volumi citati nella « Premessa », anche dai lavori originali appresso elencati.

- AMES, S. R. & R. W. LEHMAN. Estimation of the biological potency of vitamin A sources from their maleic values. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **43**, 21 (1960).
- AMES, S. R., W. J. SWANSON & R. W. LEHMAN. Estimation of the biological potency of isomerized vitamin A palmitate in aqueous multivitamin dispersions from maleic values. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **49**, 366 (1960).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMISTS. *Official methods of analysis*. Washington, 1960, p. 652 e seg.
- BRUGGEMANN, J., W. KRAUSS & J. TIEWS. Zur Methodik der Bestimmung der Vitamine A und D sowie des beta-Carotins mit Metalhalogeniden. II. *Z. Anal. Chem.*, **137**, 421 (1953).
- BUDOWSKI, P. & P. BONDI. Determination of vitamin A by conversion to anhydrovitamin A. *Analyst*, **82**, 751 (1957).
- CAMA, H. R., F. D. COLLINS & R. A. MORTON. Spectroscopic properties of all-*trans* vitamin A and vitamin A acetate. Analysis of liver oils. *Biochem. J.*, **50**, 48 (1951).
- CARR, F. H. & E. A. PRICE. Color reaction attributed to vitamina A. *Biochem. J.*, **31**, 497 (1926).
- CAVINA, G. Comportamento colorimetrico della vitamina A con soluzioni diluite di tricloruro di antimonio. Una nuova reazione della vitamina A. *Ann. Chim.*, **46**, 43 (1956).
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *The assay of vitamin A in oils*. Butterworth, London and Washington, 1959.
- MARIANI, A. & A. GAUDIANO. Sulla determinazione spettrofotometrica della vitamina A. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **13**, 632 (1950).
- MORTON, R. A. & A. L. STUBBS. Photoelectric spectrophotometry applied to the analysis of mixtures, and vitamin A oils. *Analyst*, **71**, 348 (1946).

- MORTON, R. A. & A. L. STUBBS. Spectrophotometric determination of vitamin A in liver oils. Correction for irrelevant absorption. *Biochem. J.*, **42**, 195 (1948).
- OSER, B. L., D. MELNICK & M. PADER. Estimation of vitamin A in food products. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **15**, 724 (1943).
- PREUSS, P. & A. KNECHT. Zur Bestimmung von Vitamin A in öligen Lösungen. *Deut. Apotheker Ztg.*, **102**, 386 (1962).
- SHANTZ, E. M., J. D. CAWLEY & N. D. EMBREE. Anhydro (- Cyclized -) Vitamin A. *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 901 (1943).
- SOBEL, A. E. & S. D. SNOW. The estimation of serum vitamin A with activated glycerol dichloridrin. *J. Biol. Chem.*, **171**, 617 (1947).
- SOBEL, A. E. & H. WERBIN. Determination of vitamin A in fish liver oils with activated glycerol dichloridrin; comparison with spectrophotometric and antimony trichloride methode. *Anal. Chem.*, **19**, 107 (1947).
- STAHL, E. *Dünnschicht Chromatographie*. Sprinige Verlag 1962, p. 228 e seg.
- THIES, H. & M. STEINIGEN. Eine spezifische Methode zur Bestimmung von Vitamin A. *Inter. Z. Vitaminforsch.*, **37**, 73 (1967).