

56. Aurelio MARIANI — Alterazioni della vitamina D₂ rilevate con misure spettrofotometriche (*).

Riassunto. — Sono state seguite le deformazioni della curva di assorbimento che la Vit. D₂ pura, in normali condizioni di ambiente, presenta dopo vari periodi.

Si rileva la diminuzione graduale dell'assorbimento unitario al massimo.

E' stata isolata una frazione insolubile in cicloesano, della quale sono state rilevate le caratteristiche chimico-fisiche.

Dai risultati ottenuti si rivela inattuabile l'applicazione di una correzione matematica sul tipo di quelle già usate per la Vit. A nella determinazione del reale contenuto di Vit. D₂ in prodotti farmaceutici.

Résumé. — L'A. a relevé les déformations de la courbe d'absorption de la vitamine D₂ pure qui se produisent après diverses périodes de temps dans des conditions normales du milieu.

Ces déformations causent une diminution graduelle de l'absorption unitaire au maximum.

L'A. a isolé une fraction insoluble dans le cyclohexane et en décrit les caractéristiques chimiques et physiques.

Les résultats obtenus démontrent qu'il n'est pas possible d'appliquer une correction mathématique sur le type déjà employé pour la vitamine A, dans la détermination du contenu réel en vitamine D₂ des produits pharmaceutiques.

Summary. — The deformations of the absorption diagramm, shown by pure Vitamin D₂ in normal environments after various periods of time have been studied.

An absolutely uniform decrease of absorption has been noticed.

A cyclohexan-insoluble fraction was isolated and its physical and chemical features were described.

According to these results a mathematical correction as applied in the determination of vitamin A in pharmaceutical compounds does not appear feasible.

(*) Presentato al VI Congresso Nazionale di Chimica e XXIII Congrès de Chimie Industrielle - Milano, 17-23 settembre 1950.

Zusammenfassung. — Es wurden die Veränderungen der Absorptionskurven von reinem Vitamin D₂ unter normalen Bedingungen nach verschiedenen Perioden aufgezeichnet.

Man beobachtet ein vollkommen gleichmässiges Absinken der Absorption. Es wurde eine cyclohexanunlösliche Fraktion isoliert und ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften bestimmt.

Die Untersuchungen zeigen, dass man bei der Bestimmung des wirklichen Gehaltes von Vitamin D₂ in pharmazeutischen Praeparaten keine solche mathematische Korrektur anwenden kann, wie bei Vitamin A.

I metodi chimico-fisici finora consigliati per la determinazione della vitamina D₂ sono i seguenti:

- 1) Reazione con tricloruro di antimonio in ambiente cloroformico anidro (1).
- 2) Reazione di Halden al cloruro di alluminio e pirogallolo (2).
- 3) Reazione con dicloridrina glicerica (3).
- 4) Misure spettrofotometriche nell'U.V. (4).

Le determinazioni spettrofotometriche eseguite su soluzioni oleose di vitamina D₂, anche se a titolo abbastanza elevato, non possono essere eseguite direttamente a causa della bassa lunghezza d'onda del massimo di assorbimento della vitamina (265 m μ) che giace in una zona in cui anche gli olii pi \ddot{u} puri presentano un forte assorbimento proprio. E' necessario pertanto ricorrere sempre prima ad una saponificazione ed una purificazione lunga e indaginoso (5), che richiede basse temperature e terre speciali per l'assorbimento. Tali procedimenti portano inoltre ad inevitabili perdite che si riscontrano anche nelle semplici operazioni di isolamento della frazione insaponificabile (4). Una volta eliminato l'assorbimento dovuto al solvente oleoso, non è detto però che la sola misura del massimo nell'U.V. rispecchi il reale contenuto di vitamina D₂, in quanto i prodotti di alterazione di questa vitamina hanno ugualmente i massimi nella zona piuttosto larga del massimo della vitamina.

Lo scopo del nostro lavoro è stato appunto di seguire le modificazioni della curva di assorbimento della vitamina D₂ nell'U.V. e cercare la possibilità di apportare alla curva stessa quelle correzioni capaci di eliminare gli assorbimenti dovuti ai prodotti di alterazione.

PARTE SPERIMENTALE

(In collaborazione con M. BOCCACCI)

Siamo partiti da vari campioni cristallini di vitamina D₂ provenienti dalle più accreditate Case produttrici. Sui prodotti di partenza sono stati eseguiti controlli chimico-fisici (punto di fusione, potere rotatorio ecc.) per accertarne la purezza prima di eseguire lo studio spettrofotometrico.

Per seguire l'alterazione abbiamo scelto il prodotto le cui caratteristiche si erano rilevate perfettamente corrispondenti a quelle riportate nella letteratura (*).

Il prodotto puro, sottoposto ad analisi spettrofotometrica, ha mostrato un massimo a 265 m μ in diossano, un valore dell'assorbimento unitario ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) di 470 ed un minimo caratteristico a 230 m μ . La curva di

assorbimento estesa nel campo 220-290 m μ viene riportata in fig. 1. Il campione di vitamina, subito dopo questa prima determinazione, è stato lasciato a temperatura ambiente, protetto dalla polvere, esposto in strato sottile all'azione dell'aria e della luce. Ad intervalli di tempo sono state prelevate porzioni, sulle quali sono state eseguite, sempre in identiche condizioni, misure di assorbimento nel campo 220-290 m μ , protraendo l'esperienza per oltre tre mesi.

Nel grafico della fig. 2 si riportano i valori dell'assorbimento unitario al massimo (265 m μ) rispetto al tempo. Come si rileva, la diminuzione dell'assorbimento unitario comincia soltanto dopo 30 giorni; dopo 115 giorni si è avuta una diminuzione del 36% rispetto al valore iniziale.

Particolare attenzione è stata posta nel seguire le deformazioni subite dalla curva di assorbimento con l'andare del tempo, specie nel tratto 220-265 m μ , dato che il tratto 265-290 m μ anche al termine dell'esperienza non aveva presentato notevoli variazioni.

Nel primo tratto si è riscontrato infatti quale primo sintomo di alterazione l'innalzamento del minimo a 230 m μ che da un valore iniziale di 0,45 rispetto al massimo sale dopo 30 giorni a 0,55 mentre, come risulta dalla fig. 2, dopo questo periodo nessuna variazione si avverte nell'assorbimento unitario al massimo. Al termine dell'esperienza tale valore è diventato di 0,625. Questo innalzamento del minimo ci ha spinto a calcolare la deformazione della curva dalla posizione dei punti di assorbimento inizialmente fissati a 6/7 del massimo ugualmente a quan-

(*) Tutte le misure spettrofotometriche sono state eseguite con apparecchio Beckman D. U. a quarzo e lampada a scarica in idrogeno.

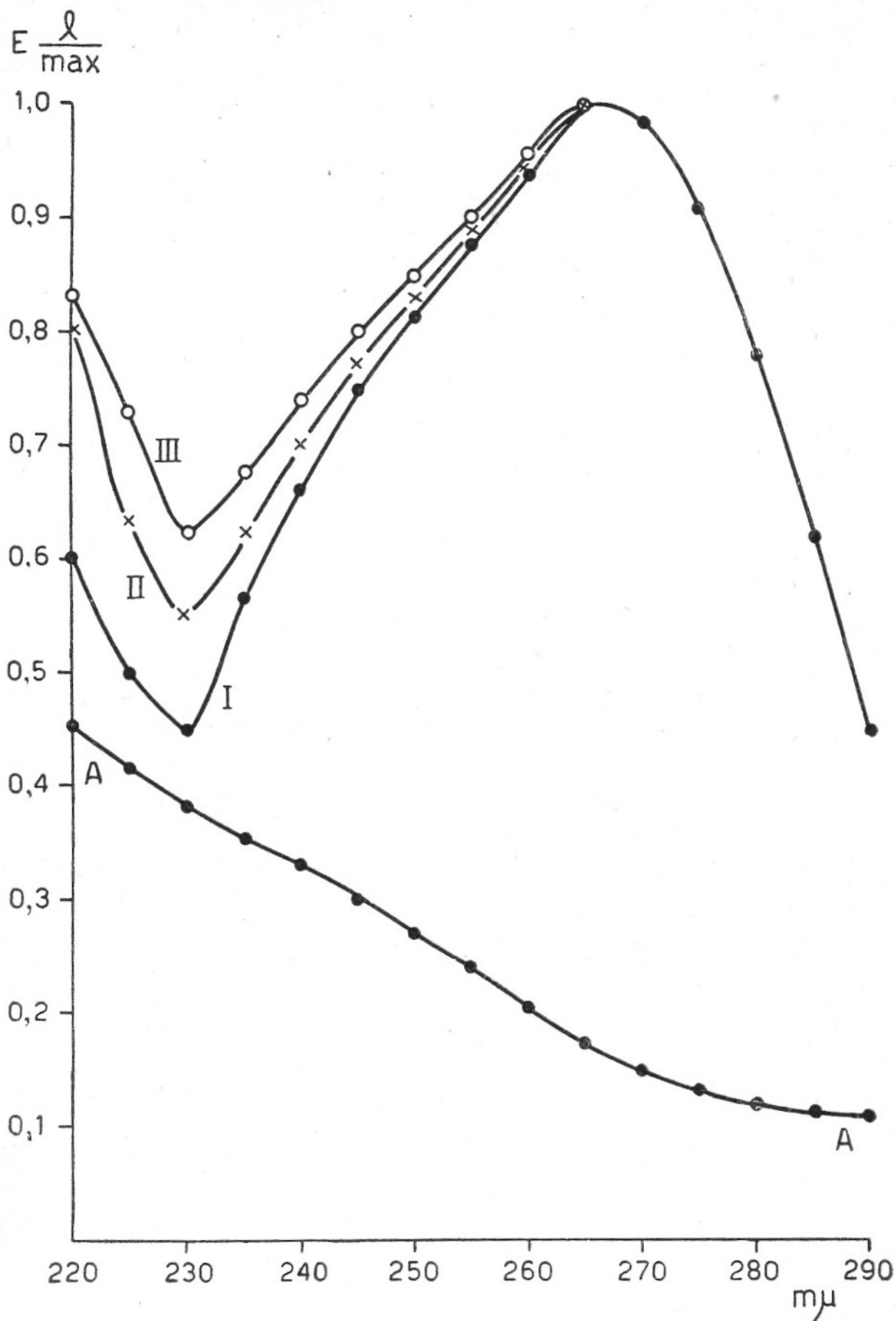


Fig. 1 - I: Curva di assorbimento della Vit. D₂ pura - II: Curva di assorbimento della medesima Vit. D₂ dopo 30 giorni - III: Curva di assorbimento della medesima Vit. D₂ dopo 115 giorni - A: Curva di assorbimento dei prodotti di alterazione (In ordinate valori di E assoluto per C = 0,000308%)

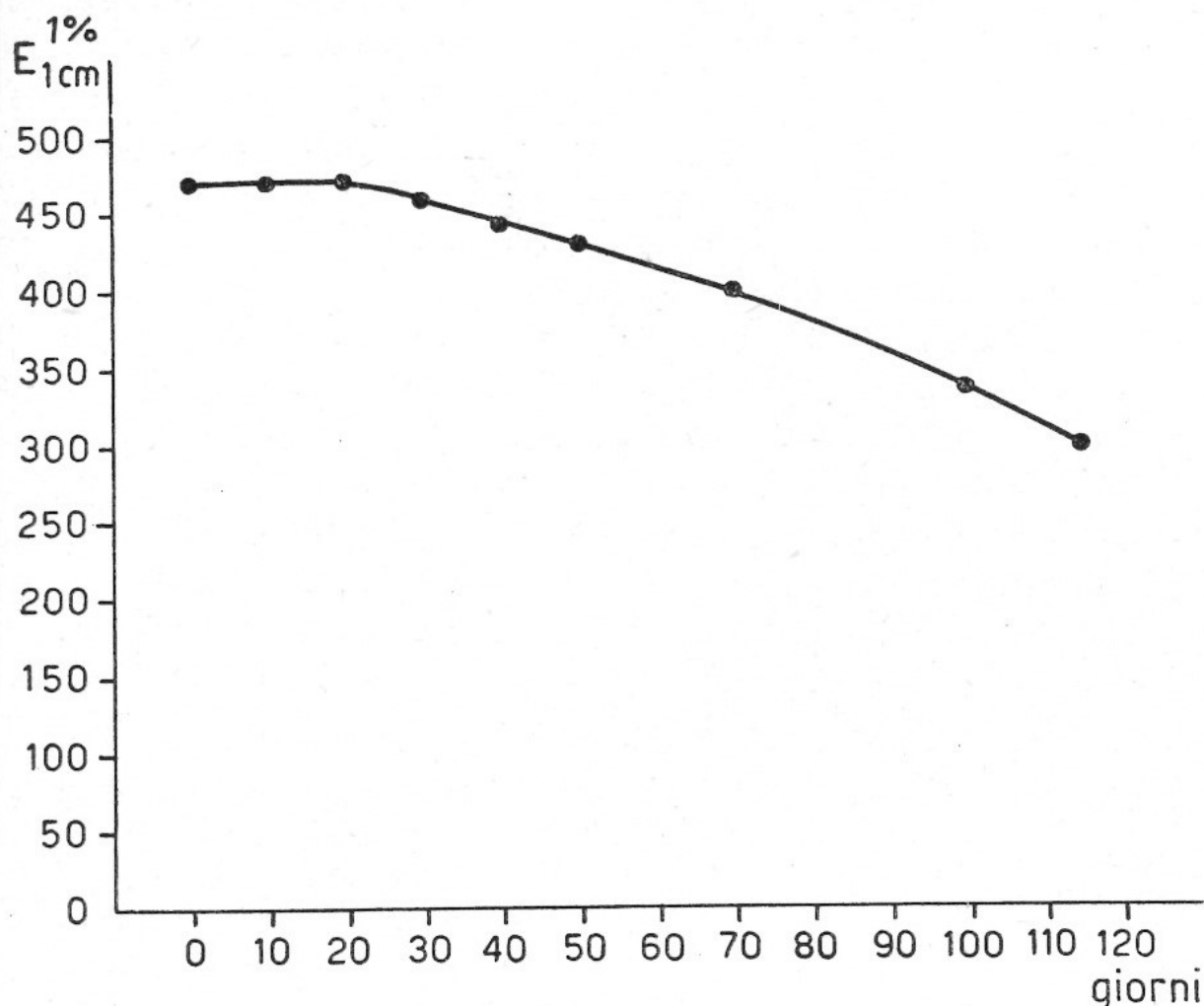


Fig. 2 - Valori dell'assorbimento unitario al massimo rispetto al tempo

to viene consigliato da Morton e Stubbs per la vitamina A ed avere così un criterio circa il grado di alterazione della vitamina D_2 . Questo punto è stato oggetto di particolare studio. Per la vitamina D_2 pura i punti scelti sono risultati quelli corrispondenti alle lunghezze d'onda di 252 e 277,5 $m\mu$. La retta passante per questi punti è risultata infatti, per il prodotto puro, parallela all'asse delle lunghezze d'onda e ad una altezza di $6/7$ rispetto a quella del massimo. Purtroppo le deformazioni che la curva subisce, specie per effetto delle prime alterazioni, sono tali che non permettono una correzione matematica dell'assorbimento massimo per la presenza dei prodotti di alterazione. Ciò evidentemente è dovuto al fatto che questi presentano un assorbimento nel campo 252-277,5 $m\mu$ con andamento tutt'altro che rettilineo.

Per le misure spettrofotometriche sulla vitamina D_2 i solventi consigliati da vari AA. sono l'alcool etilico assoluto o il cicloesano. Nelle prime esperienze da noi condotte abbiamo pertanto impiegato il cicloesano, che sarebbe stato particolarmente adatto per le soluzioni oleose;

abbiamo però osservato in seguito che, con l'alterazione della vitamina D_2 , si formavano dei prodotti insolubili sia in cicloesano che in alcool. Abbiamo perciò preferito usare come solvente il diossano nell'intera durata delle nostre esperienze per il fatto che questo presentava una forte azione solvente sia per la vitamina che per i suoi prodotti di alterazione. Le curve che in questo lavoro vengono riportate sono tutte rilevate usando il diossano come solvente.

L'apparire dei primi prodotti insolubili in cicloesano, riscontrato dopo circa un mese dall'inizio dell'esperienza, ci ha spinto ad isolare tali prodotti per studiarli particolarmente. Tale isolamento è stato eseguito al termine dell'esperienza e cioè dopo circa tre mesi dall'inizio e la porzione insolubile in cicloesano è risultata quantitativamente del 25,4% del prodotto totale alterato. Il prodotto insolubile isolato ha mostrato le seguenti caratteristiche:

— peso molecolare (in canfora) 395;

— curva di assorbimento pressochè lineare e decrescente dai 220 ai 290 $m\mu$ con $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ a 265 $m\mu = 57,5$;

— solubile completamente in diossano; insolubile in alcool e cicloesano;

— potere rotatorio in diossano $[\alpha]_D^{20} = + 10^\circ$;

— reazione negativa con tricloruro di antimonio.

Dalle caratteristiche rilevate si desume che, molto probabilmente tale prodotto di alterazione è costituito dalle due soprasterine I e II, già ottenute per prolungata irradiazione dell'ergosterina dal MÜLLER (6).

Basandosi sulla percentuale di questi prodotti di alterazione presenti al termine dell'esperienza, abbiamo anche calcolato il valore dell'assorbimento unitario al massimo da sottrarre a quello della vitamina alterata ($0,250 \times 57,5 = 14,6$). Togliendo questo valore all'assorbimento

unitario della vitamina alterata si ha:

$$300 - 14,6 = 285,4$$

valore che si avvicina di molto a quello che si ottiene per la correzione del massimo calcolata in base allo spostamento dei due punti di riferimento scelti al principio dell'esperienza, seguendo il metodo di MORTON

e STUBBS per la vitamina A. Infatti per una concentrazione di 0,002248% si sono avute le seguenti letture di assorbimento:

252	m μ	=	0,598
265	»	=	0,674
277,5	»	=	0,568

il che porta alla correzione del massimo da 0,674 a 0,651 quindi:

$$E \begin{array}{l} 1\% \\ \text{corr.} \\ 1 \text{ cm} \end{array} = \frac{0,651}{0,002248} = 289,7$$

Concludendo possiamo affermare:

a) nella determinazione spettrofotometrica della vitamina D₂ non è lecito assumere senz'altro come valore base quello dedotto da lettura diretta a 265 m μ .

b) E' consigliabile usare il diossano, specie nei controlli di vitamina D₂ cristallizzata, per impedire che i prodotti di alterazione stratificati sulla superficie dei cristalli impediscano la completa dissoluzione della vitamina ancora inalterata.

c) Una correzione sul massimo di assorbimento sembra lecita soltanto per la presenza dei prodotti di seconda degradazione insolubili in cicloesano in quanto questi presentano assorbimento pressochè lineare nel campo 252-277,5 m μ , mentre per i prodotti di prima alterazione tale correzione non è applicabile.

d) Come indice qualitativo di alterazione si consiglia di eseguire misure, oltre al massimo, anche al minimo (230 m μ) e ai due punti base 252 e 277,5 m μ . Una buona vitamina deve presentare un rapporto fra il minimo ed il massimo di 0,45: 1 e gli assorbimenti ai due punti base devono avere pressochè lo stesso valore.

A questo primo studio sull'alterazione naturale della Vitamina D₂ farà seguito un programma di ricerche tendenti a rendere possibile l'applicazione dei calcoli matematici per la correzione degli assorbimenti della vitamina dovuti ai prodotti di alterazione.

BIBLIOGRAFIA

(¹) B. BROCKMANN e Y. H. CHEN; *Z. Phys. Chem.* *241*, 129, (1936); C. H. NIELD, C. RUSSEL e A. ZIMMERLI; *J. Biol. Chem.* *136*, 73, (1940); DE WITT e SULLIVAN; *Ind. Eng. Chem.* *18*, 117 (1946).

(²) W. HALDEN e H. TZONI; *Nature* *137*, 909, (1936).

(³) G. PIRLOT e E. V. ROURIR; *Bull. Soc. Chem. Belg.* *56*, 296, (1947); SOBEL, MAYER e KRAMER; *Ind. Eng. Chem., An. Ed.*, *17*, 160, (1945); ROURIR e PIRLOT; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *29*, 1005 (1947); PENAN e HAGEMAN; *Helv. Chim. Acta*, *29*, 1366 (1946).

(⁴) EWING e POWELL, *Ind. Eng. Chem. An. Ed.* *20*, 316 (1948).

(⁵) MILAS, HEGGIE e REYNOLDS; *Ind. Eng. Chem. An. Ed.* *13*, 226 (1941).

(⁶) MÜLLER; *Z. Physiol. Chem.*, *233*, 223 (1935).
