

23. Mario BOCCACCI. — **Determinazione della vitamina D in presenza di vitamina A mediante cromatografia su carta a fasi invertite.**

Riassunto. — Viene descritto un metodo cromatografico di separazione della vitamina D dalla vitamina A con acetone acquoso su carta trattata con olio di oliva. Esso consente di dosare la vitamina D anche in presenza di forti quantità di vitamina A, con un errore in meno del 2-10%.

In molti casi è possibile effettuare la determinazione spettrofotometrica della vitamina D.

Quando la vitamina D è presente in forti quantità associata a vitamina A palmitato, è possibile eseguire la cromatografia direttamente su piccole quantità di soluzione oleosa e procedere poi alla determinazione spettrofotometrica della vitamina D.

In un preparato di vitamine A e D idrosolubilizzate con Tween, si è riusciti a dosare, con buona approssimazione, la vitamina D₂ pur in presenza di un peso 700 volte superiore di vitamina A.

Résumé. — On décrit une méthode de chromatographie sur papier traité par l'huile d'olive, pour obtenir la séparation de la vitamine D de la vitamine A, avec acétone aqueux.

On parvient ainsi à doser la vitamine D même en présence de quantités remarquables de vitamine A, avec un erreur en moins de 2-10%.

Dans nombreux cas, il est possible d'effectuer la détermination spectrophotométrique de la vitamine D.

Lorsque la vitamine D est présente en quantités remarquables associée à la vitamine A palmitate, on peut chromatographier directement une petite quantité de solution huileuse et effectuer par la suite la détermination spectrophotométrique de la vitamine D.

Dans une préparation de vitamines A et D hydrosolubilisées avec du Tween on est parvenus à doser- avec une bonne approximation, la vitamine D₂ bien que le poids de la vitamine A fût 700 fois supérieur.

Summary. — A chromatographic method is described for the separation of vitamin D and vitamin A with aqueous acetone on paper treated with olive oil.

This allowed the determination of vitamin D even in the presence of large quantities of vitamin A, with an error of 2-10%.

In many cases it is possible to carry out a spectrophotometric assay of vitamin D. When vitamin D is present in large amounts, associated

with vitamin A palmitate, it is possible to carry out the chromatography directly on a small quantity of the oil solution and then to proceed to the spectrophotometric determination of vitamin D.

In a preparation of vitamins A and D water dispersed with Tween, it was possible to measure with a good approximation, vitamin D₂ in presence of a 700 fold concentration of vitamin A.

Zusammenfassung. — Eine chromatographische Methode zur Trennung des Vitamins D vom Vitamin A mittels wässrigen Azetons auf mit Olivenöl behandeltem Papier wird geschildert. Sie gestattet die Bestimmung des Vitamins D auch in Anwesenheit von beträchtlichen Mengen von Vitamin A mit einem Fehler der unterhalb 2-10%.

In zahlreichen Fällen ist die spektralphotometrische Bestimmung des Vitamins D möglich.

Wenn das Vitamin D in hoher Konzentration in Anwesenheit von Vitamin A Palmitat vorhanden ist, kann die Chromatographie direkt an kleine Mengen ölicher Lösung angewendet werden auf die dann die spektralphotometrische Bestimmung des Vitamins D unmittelbar folgt.

In einem Präparat von Vitamin A und D nach Tween wasserlöslich gemacht, konnte das Vitamin D₂ in Anwesenheit von einer gewichtsmässig 700 mal grösseren Menge von Vitamin A mit einer guten Annäherung bestimmt werden.

Per la determinazione chimica della vitamina D in presenza di vitamina A sono stati proposti vari metodi, tra i quali si ricorda quello di MARIANI e CAVINA ⁽¹⁾, basato sulla distruzione selettiva della vitamina A per mezzo di terre attivate con acidi, al quale si rimanda anche per la bibliografia sull'argomento.

Nella ricerca di un metodo più semplice si è rivolta l'attenzione alla tecnica di cromatografia su carta « trattata »: già nel 1950 ROSSI ⁽²⁾ aveva proposto un metodo di separazione della vitamina D₂ su carta trattata con allumina. Ma con questa tecnica s'incontrano difficoltà per ottenere un trattamento uniforme e riproducibile della carta. Più interessante si è dimostrata la cromatografia a fasi invertite su carta trattata con varie sostanze tra cui olio di vaselina e silicone.

DAVIS e collaboratori ⁽³⁾, ad esempio, separano le vitamine D₂ e D₃ da altri steroli su carta trattata con acido stearico, mentre VOGEL e NEUKAM ⁽⁴⁾ separano dal latte vitaminizzato la vitamina D₃ per cromatografia su carta trattata con olio di vaselina.

Il metodo descritto nella presente Nota è basato sulla separazione, ad opera di acetone acquoso, della vitamina D dalla vitamina A su carta

trattata con olio di oliva e susseguente dosaggio della vitamina D eluita dalla carta.

PARTE SPERIMENTALE

REATTIVI E MATERIALE

Acetone acquoso al 70% preparato con acetone puro per analisi, non ulteriormente purificato.

Soluzione di olio di oliva al 3% v/v in etere di petrolio: si sciolgono 3 cm³ di olio di oliva di prima qualità in etere di petrolio e si porta a 100 cm³; va preparata giornalmente.

Etere di petrolio p.eb. 40-70°C.

Etanolo di 95° privo di aldeidi e di altre sostanze che assorbono nell'U.V.: si fa bollire a ricadere per 1-2 ore l'etanolo di 95° addizionato di 1 g/litro di KOH e si distilla.

Etere etilico privo di perossidi: si lava l'etere con soluzione all'1% di solfato ferroso sino a che questa non si colora più per formazione di ioni ferrici. Si essicca su solfato di sodio anidro e si distilla; va preparato giornalmente.

Soluzione alcolica di soda: 10 cm³ di soluzione acquosa di soda caustica al 30% p/v e 90 cm³ di alcool etilico assoluto; si prepara al momento dell'uso.

Potassa alcolica al 10% p/v: si prepara giornalmente con potassa caustica ed etanolo di 95° purificato.

Ossido di alluminio al 12% di acqua: si attiva l'allumina Merck secondo Brockman per riscaldamento a 500° per 4 ore; si raffredda in essiccatore. Al momento dell'uso se ne pesano g 50 in una beutina con tappo smerigliato e vi si aggiungono 6 cm³ di acqua agitando energicamente sino a scomparsa di grumi.

Soluzione di idrochinone al 10% p/v in alcool di 95°.

Cloruro di etilene purificato: il cloruro di etilene del commercio viene lavato con acido solforico concentrato, con soda al 10% e poi con acqua sino a reazione neutra. Si essicca su cloruro di calcio anidro addizionato di una piccola quantità di anidride fosforica e si distilla.

Reattivo al tricloruro di antimonio: g 10 di cloruro di calcio ben secco e g 20 di tricloruro di antimonio vengono pestati in un mortaio ed estratti in beuta con tappo a smeriglio con circa 100 cm³ di cloruro di etilene purificato. Si filtra su solfato di sodio anidro, portando con lavaggio a 100 cm³: a tale soluzione si aggiungono 2 cm³ di cloruro di acetile distillato di recente.

Carta Munktell 20 lavata per scolamento con etanolo di 95°.

Micropipette da 20 μ l e pipette graduate a stantuffo da 1 cm³ con la punta sfinata e ripiegata.

Cilindri graduati da 1000 cm³ privi del beccuccio di scolamento sul bordo superiore e chiusi con tappi di sughero ricoperti da una guaina di sottile foglio di polietilene o paraffinati.

COMPORTAMENTO DELLE VITAMINE A E D NELLA CROMATOGRAFIA SU CARTA A FASI INVERTITE.

Per studiare il comportamento cromatografico delle vitamine A e D si sono presi in considerazione vari tipi di solvente, di carta e di sostanze con cui trattare la carta. Dopo aver provato anche la Whatman 1 e 4 si è scelta la carta Munktell 20, perchè essendo questa molto spessa permette di operare con quantità notevolmente più elevate di sostanza, pur risultando efficace, per le separazioni, come gli altri due tipi di carta.

Come solventi si sono provati l'isopropanolo acquoso, l'acetonitrile acquoso e l'acetone acquoso. I migliori risultati si sono avuti con l'acetone che dà le maggiori differenze tra l'Rf della vitamina D e quelli della vitamina A e suoi prodotti di decomposizione.

Per il trattamento della carta si sono provati l'olio di vaselina e l'olio di oliva al 3% in etere di petrolio e il silicone D.C. 200/500 della Dow Corning Corporation al 5% in cicloesano. Si sono avute separazioni molto efficaci con tutte e tre le sostanze provate: la scelta dell'olio di oliva è stata motivata dal fatto che solamente nelle prove effettuate su carta trattata con tale sostanza la vitamina D viene recuperata pressochè quantitativamente (93-98%), mentre nelle prove su carta trattata sia con olio di vaselina che con silicone, i recuperi oscillano tra il 70 e l'80%. Tali risultati si possono spiegare ammettendo che le piccole quantità di antiossidanti naturali contenuti nell'olio di oliva preservino la vitamina D dalla ossidazione durante la cromatografia. Naturalmente ci si deve servire di un olio di oliva di prima qualità nel quale i processi di auto-ossidazione non abbiano neanche avuto inizio.

Le prove definitive sono state effettuate con carta M. 20 trattata con olio di oliva al 3% in etere di petrolio, usando come solvente acetone al 70%.

La composizione ottimale del solvente che dà un cammino sufficiente delle sostanze dipende dal tipo di recipiente in cui si fa avvenire la cromatografia. Con acetone al 70% si ottengono ad esempio ottimi risultati se si usano i già accennati cilindri graduati da 1000 cm³, mentre con recipienti più grandi occorre acetone al 75%. Usando la tecnica

discendente con vasche molto grandi si deve usare acetone all'80%. Quando ci si serve dei cilindri da 1000 cm³ è bene rinnovare il solvente dopo ogni cromatografia.

Il comportamento cromatografico della vitamina D₂, della vitamina D₃ e della vitamina A alcool, acetato e palmitato è indicato schematicamente nella figura 1.

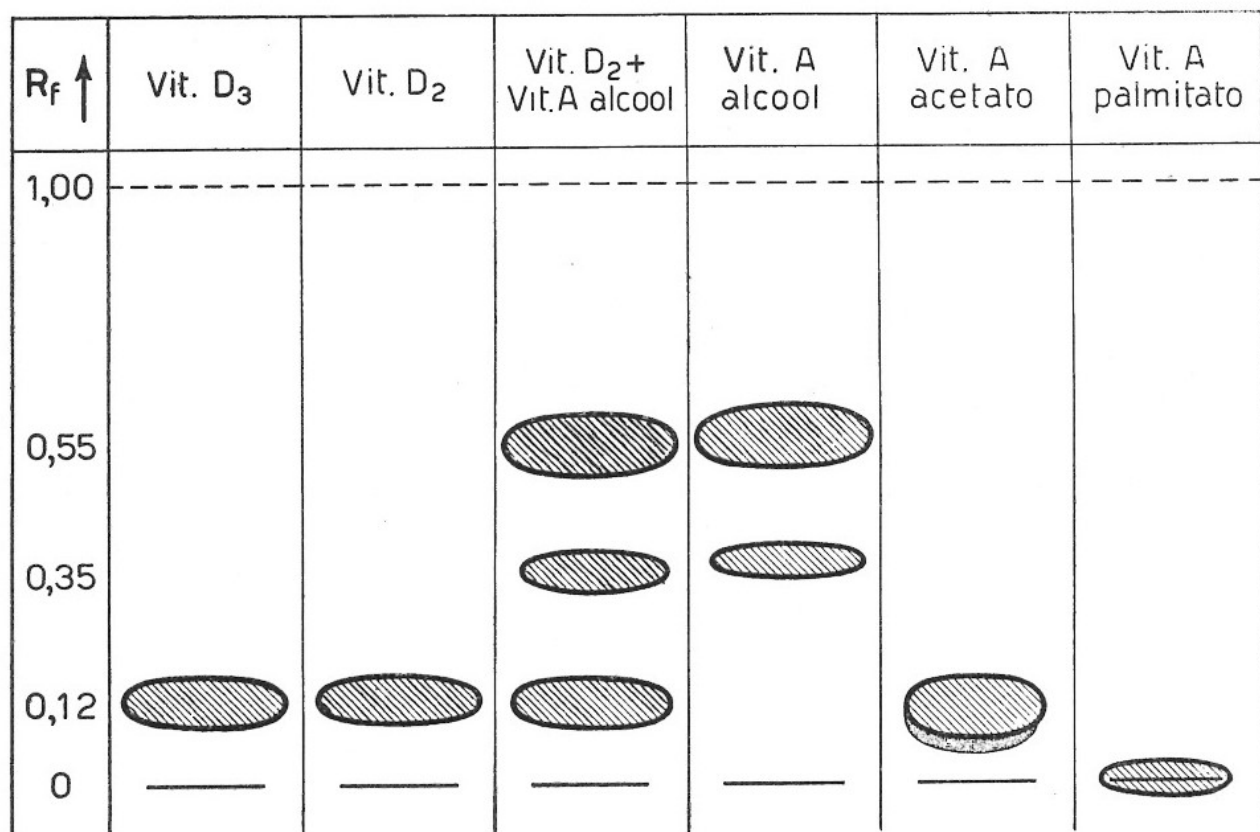


Fig. 1. - Comportamento cromatografico delle vitamine A e D con acetone al 70% su carta Munktell 20 trattata con olio di oliva. Alla luce U.V. le zone della vitamina D₂, D₃ e del componente con R_f = 0,35 dei campioni di vitamina A alcool appaiono scure sul fondo leggermente fluorescente in bleu della carta, mentre le zone della vitamina A alcool, acetato e palmitato, appaiono intensamente fluorescenti in giallo.

Per la localizzazione delle sostanze le strisce vengono osservate alla luce U.V. fornita da una lampada le cui caratteristiche sono descritte in seguito.

Si noti la presenza, nei campioni di vitamina A alcool, di un componente con R_f inferiore.

PROCEDIMENTO DI SAPONIFICAZIONE.

Dei due metodi usati il I° è ripreso dal lavoro di MARIANI e CAVINA (1).

I) Ad 1 g di soluzione oleosa, esattamente pesato, in una capsulina di vetro del diametro di 6-8 cm, si aggiungono 0,5 cm³ della soluzione di

idrochinone al 10% in alcool assoluto e 15 cm³ di soda alcolica. Si pone su bagnomaria bollente e si mescola con una bacchettina di vetro. Dopo circa 10', quando la massa è diventata sciropposa, vi si aggiungono 8 g di allumina al 12% di acqua. Si mescola ancora su bagnomaria fino ad ottenere una polvere omogenea ed eliminare ogni traccia di alcool. Si toglie allora dal bagnomaria e si lascia ben raffreddare; la polvere viene portata quantitativamente in un provettone con tappo smerigliato da 50 cm³ e si estrae l'insaponificabile due volte con 25 cm³ di etere, agitando energicamente e poi centrifugando. Le soluzioni eterree riunite vengono lavate due o tre volte con 10 cm³ di acqua fino a reazione neutra e seccate su solfato di sodio anidro. Evaporando l'etere nel vuoto, in corrente di azoto, si ottiene un residuo costituito dall'insaponificabile esente da tracce di saponi.

II) In una fiala di vetro da 10 cm³ a pareti spesse si pesa con esattezza circa un grammo della soluzione oleosa, si aggiungono 8 cm³ della soluzione di potassa alcolica e 0,5 cm³ di soluzione alcolica di idrochinone (v. sopra), si scaccia l'aria con una leggera corrente di azoto e si chiude alla lampada. La fiala viene quindi avvolta in un panno e immersa in bagnomaria bollente per circa 15'; la si toglie indi dal bagnomaria, la si lascia raffreddare, la si apre e se ne versa il contenuto in un piccolo imbuto separatore. Si lava la fiala con pochi cm³ di etanolo che si aggiungono al contenuto dell'imbuto separatore e si aggiungono poi 25 cm³ di etere etilico privo di perossidi, si mescola e si aggiunge acqua, evitando bruschi rimescolamenti dei liquidi contenuti nel separatore, sino a che lo strato eterreo sia ben separato dallo strato idro-alcolico. Si separano i due strati e si procede ad una nuova estrazione con etere del liquido idroalcolico. Questa seconda estrazione va condotta con cautela, senza sbattere l'imbuto separatore, onde evitare il formarsi di emulsioni che compromettono la netta separazione dei due strati. I liquidi eterrei riuniti vengono lavati con 3 porzioni di 20 cm³ di acqua, la prima volta agitando con cautela ed in seguito sbattendo energicamente. L'etere viene quindi essiccato su solfato di sodio anidro e distillato.

ALLESTIMENTO DELLE CROMATOGRAFIE.

Benchè la tecnica usata per l'allestimento delle cromatografie sia quella solita ormai ben conosciuta, si ritiene opportuno descriverla per esteso poichè alcuni dettagli sono stati curati in modo da semplificare il più possibile l'operazione e renderla attuabile con un minimo di attrezzatura cromatografica.

Dai fogli di carta Munktell 20 lavata con etanolo, si tagliano tante strisce di 10×50 cm, alle quali si dà la forma indicata nella figura 2a. Le strisce così preparate si passano rapidamente nella soluzione di olio di oliva in etere di petrolio avendo cura che il trattamento risulti il più uniforme possibile, si sospendono ad un sostegno sino ad evaporazione

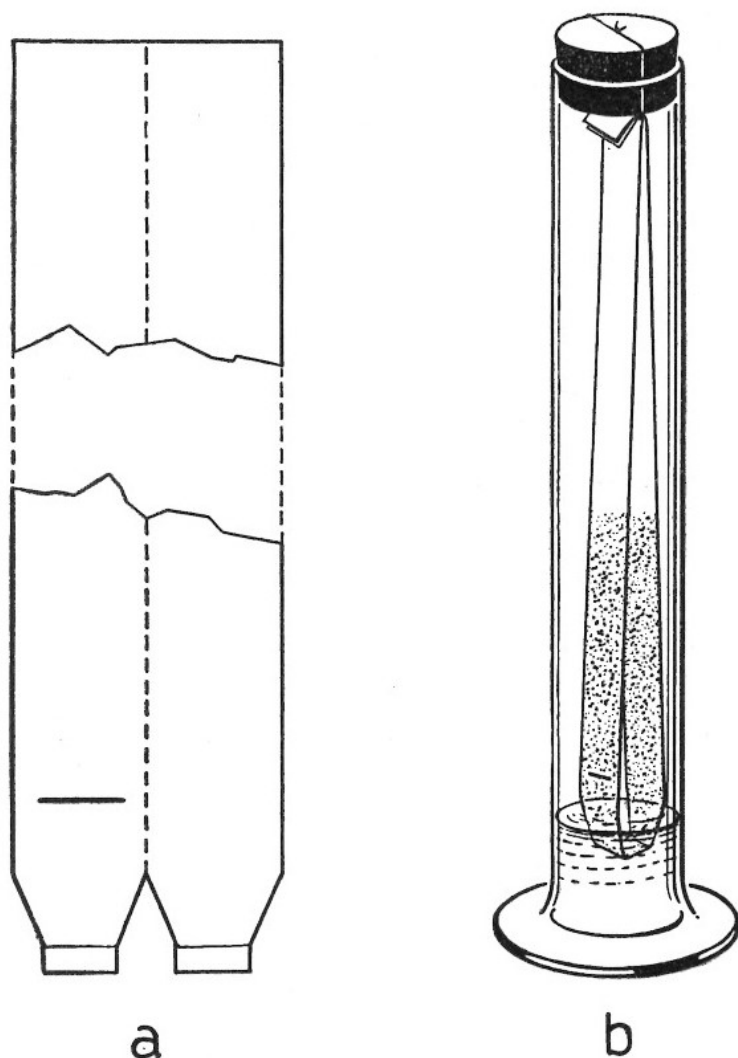


Fig. 2. - a) Forma della striscia di carta pronta per il trattamento con soluzione di olio di oliva in etere di petrolio. b) Cilindro nel quale è già in corso la cromatografia.

completa dell'etere di petrolio e quindi si tagliano a metà nel senso della lunghezza (lungo la linea tratteggiata della figura 2a). Su una sola delle due strisce così ottenute, a circa 6 cm di distanza dalla estremità rastremata (in corrispondenza della linea trasversale indicata in figura 2a e 2b), si depone una opportuna quantità della soluzione in esame fatta con alcool o con altro solvente nel quale l'olio di oliva sia pochissimo solubile. Quando si debbono deporre volumi relativamente forti di soluzione,

ad esempio 0,2—0,5 cm³, si può facilitare l'evaporazione del solvente con una leggera corrente di azoto. L'altra striscia serve per i confronti.

Evaporato il solvente si ripiegano e si sovrappongono le estremità inferiori delle due strisce fermandole con una grappetta di acciaio inossidabile. Le due strisce così preparate vengono fissate al tappo ed introdotte nel cilindro graduato da 1000 cm³ nel quale si fa avvenire la cromatografia, in modo che la loro estremità inferiore sia immersa per ca. 0,5 cm nel solvente in esso contenuto (figura 2b). Il cilindro viene quindi posto al buio per tutto il tempo della cromatografia (è bene compiere a luce ridotta anche tutte le operazioni che precedono e seguono la cromatografia).

Quando il solvente ha percorso un sufficiente cammino sulle strisce (30-35 cm), si tolgono queste dal cilindro e dopo evaporata la gran parte del solvente si osservano dinanzi ad una lampada che fornisca radiazioni U.V. di 265 mμ (lampada germicida Philips munita di filtro Corning 7910 trasparente al 70% delle radiazioni di 254 mμ).

La zona in cui è situata la vitamina D appare scura su fondo leggermente fluorescente in blu, mentre la zona della vitamina A mostra una forte fluorescenza gialla. I prodotti che accompagnano la vitamina A nei preparati che si sono presi in esame danno macchie scure come quelle della vitamina D, ma avendo un R_f notevolmente maggiore (R_f = 0,35 vedi figura 1), risultano sempre da questa ben separati.

Quando sono presenti forti quantità di vitamina A, un componente con R_f uguale a quello della vit. D e che dà una fluorescenza gialla può rendere impossibile la localizzazione della zona di assorbimento della vitamina D. In tal caso si preleva per l'eluizione un tratto di carta i cui estremi dal punto di partenza vengono calcolati dal valore di R_f proprio della vitamina D. Le condizioni della cromatografia allora devono essere curate in modo che si abbia una buona riproducibilità nei valori di R_f.

Con un leggero tratto di matita si delimita la zona dove è presente la vitamina D, si sovrappongono le due strisce e si taglia in corrispondenza della zona delimitata.

I due rettangoli di carta tagliati dalle strisce (in genere di 4 × 5 cm) vengono ripiegati ed introdotti in un palloncino a fondo tondo da 100 cm³ munito di allunga da vuoto; si fa il vuoto con una pompa ad acqua e si immerge per 10' il pallone in un bagno a 50°. Con tale operazione si allontanano le ultime tracce di solvente che potrebbero notevolmente disturbare le susseguenti misure spettrofotometriche.

I due rettangoli di carta vengono poi tagliati in pezzetti più piccoli e questi introdotti in due beutine da 50 cm³ con tappo smerigliato nelle quali si procede all'eluizione con 20 cm³ di etanolo di 95° o di etere

di petrolio a seconda che si proceda poi alla determinazione spettrofotometrica o colorimetrica.

Si lascia a sè per 20' ca., agitando ogni tanto, e quindi, attraverso un imbuto di vetro munito di setto filtrante di porosità 1 o α si trasferisce la soluzione o direttamente nelle vaschette di silice di 1 cm di spessore per la misura nell'U.V. o in provette per la misura colorimetrica con il reattivo al tricloruro di antimonio. In ambedue i casi la soluzione ottenuta dalla eluzione della striscia di confronto serve come bianco per l'altra.

PROVE CON LA SOLA VITAMINA D₂.

Accertato che le vitamine D₂ e D₃ nelle condizioni del metodo hanno un comportamento cromatografico assolutamente identico, come si può notare nella figura 1, per le prove appresso descritte si è usata unicamente la vitamina D₂.

In varie esperienze si sono cromatografate quantità di vitamina D₂ comprese tra 20 e 200 μ g e si è potuto rilevare quanto segue:

a) La vitamina D₂ si sposta sulla carta con un Rf = 0,12 e anche quando è presente in forti quantità dà una banda stretta e ben delimitata.

b) L'eluzione, effettuata nelle condizioni riportate, permette il recupero pressochè totale (92-98%) della vitamina D₂, come è chiaramente mostrato nella tabella I in cui sono riportati i risultati delle prove effettuate.

TABELLA I

Risultati delle prove effettuate con sola vitamina D.

N.	Quantità di vit. D ₂ cromatografata μ g	Quantità di vit. D ₂ trovata μ g	Vitamina D ₂ recuperata %	Tipo di determinazione
1	150	144	96	Spettrof.
2	150	139	93	»
3	150	145	97	»
4	75	69	92	»
5	75	75	100	»
6	35	34	97	Colorim.
7	35	33	95	»

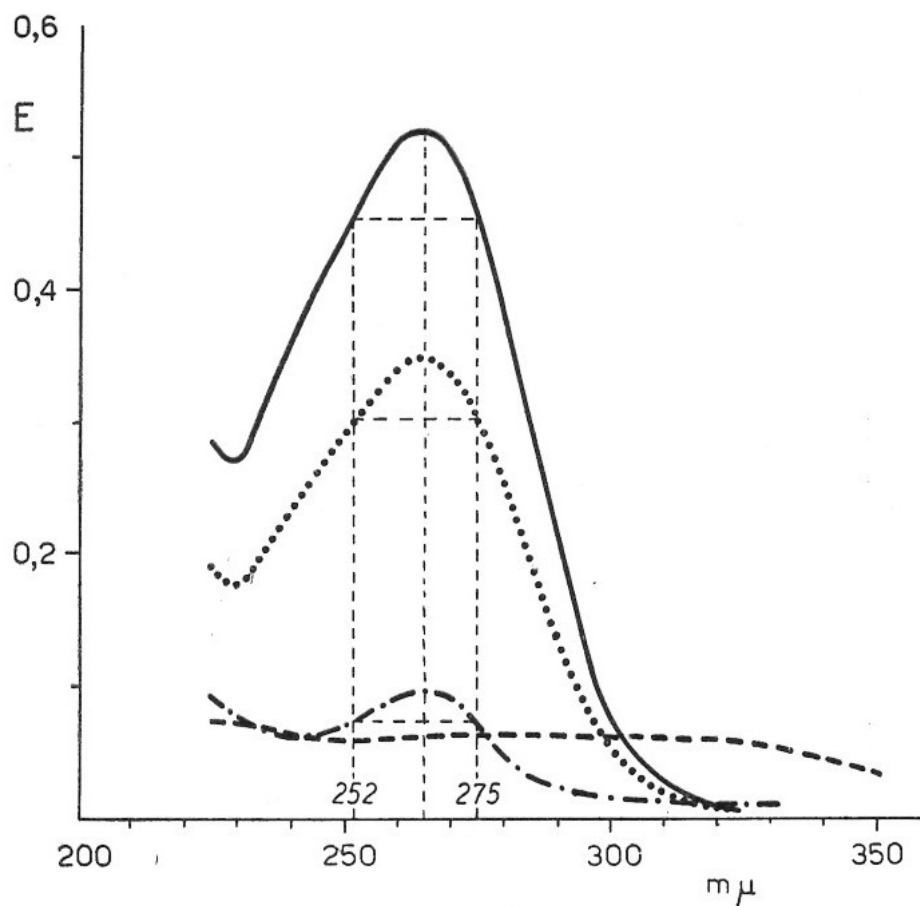


Fig. 3. - Curve di assorbimento di:

- Vitamina D_2 pura; 4,4 mg in 400 cm³ di etanolo di 95°.
- Vitamina D_2 eluita dalla carta dopo cromatografia; 0,7 mg in 400 cm³ di etanolo di 95°.
- Sostanza dei preparati di vitamina A con Rf uguale a quello della vitamina D_2 (dalla quantità contenuta in 10 mg di vitamina A alcool; eluita con 20 cm³ di etanolo di 95°).
- Componente dell'insaponificabile dell'olio di oliva che ha lo stesso Rf della vitamina D_2 (dalla quantità contenuta nell'insaponificabile di 4 cm³ di olio di oliva; eluita con 20 cm³ di etanolo di 95°).

c) Le caratteristiche sia spettrofotometriche che colorimetriche della vitamina D_2 recuperata con l'eluzione, sono identiche a quelle della vitamina pura iniziale, come è mostrato nelle figure 3 e 4. Si può quindi dedurre che durante la cromatografia la vitamina D_2 non subisce alterazioni.

La determinazione colorimetrica venne eseguita nel modo consigliato da MARIANI e CAVINA ⁽¹⁾: si porta a secco in corrente di azoto una aliquota dell'eluato, si riprende il residuo con 0,5 cm³ di etere di petrolio e si aggiungono 4,5 cm³ del reattivo al tricloruro di antimonio. Le letture vengono effettuate in vaschette di 1 cm di spessore, a 500 mμ dopo 60 secondi e a 550 mμ dopo 90 secondi. Con la vitamina D_2 pura a 550 mμ

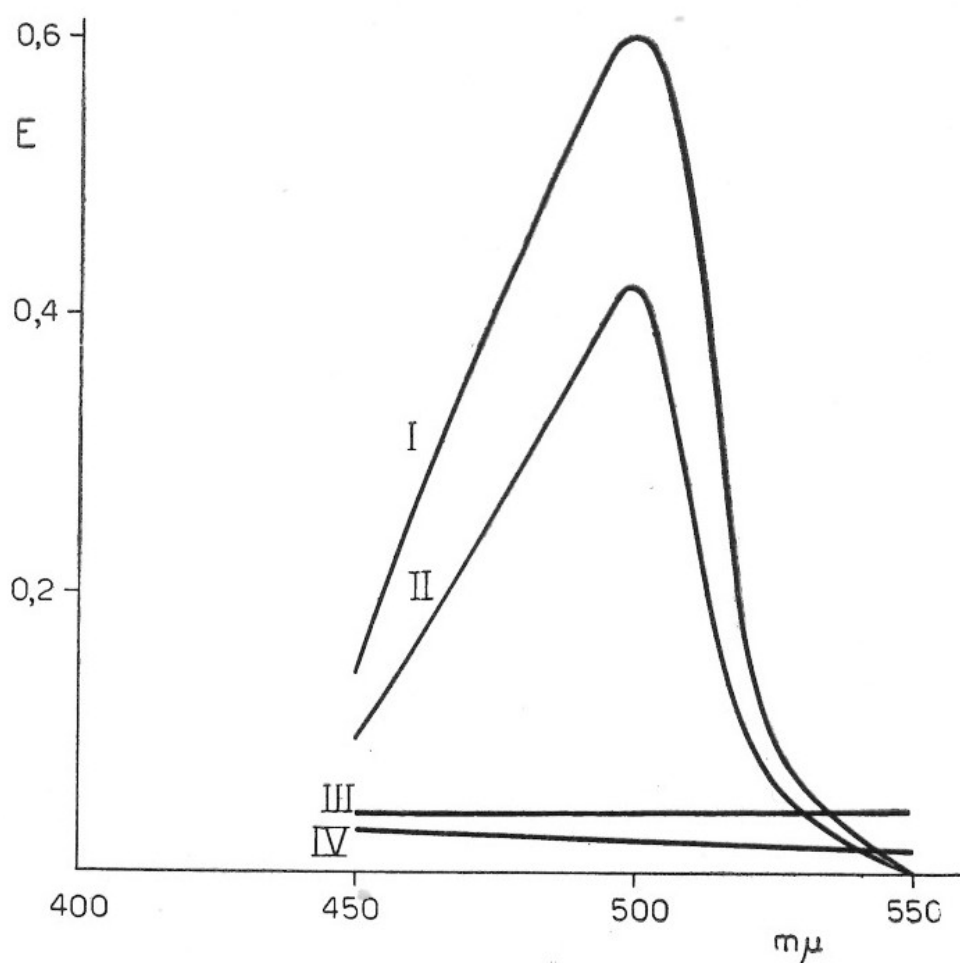


Fig. 4. - Curve di assorbimento dei prodotti di reazione con tricloruro di antimonio di: I) Vitamina D_2 pura. - II) Vitamina D_2 eluita dalla carta dopo cromatografia. - III) Componente della vitamina A con Rf uguale a quella della vitamina D_2 (dalla quantità contenuta in 4 mg di vitamina A). - IV) Componente dell'insaponificabile dell'olio di oliva con Rf uguale a quello della vitamina D_2 (dalla quantità contenuta nell'insaponificabile di 1 cm³ di olio di oliva).

si deve avere un assorbimento trascurabile. Nella figura 5 è riportato in grafico l'andamento dell'estinzione a 500 mμ rispetto alla concentrazione, per la vitamina D_2 pura.

PROVE CON LA SOLA VITAMINA A.

Quando si cromatografano piccole quantità di preparati di vitamina A alcool non si nota alcun componente che abbia lo stesso Rf della vitamina D_2 , come si può notare nella figura 4.

Per accertarsi che nessun componente, presente anche in quantità minima, potesse disturbare la determinazione della vitamina D_2 , si sono cromatografate quantità di ca. 10 mg di vitamina A alcool su una sola striscia.

Al termine della cromatografia, che ha un decorso regolare nonostante la forte quantità di vitamina A, si è notata una zona di debole fluorescenza gialla con R_f pressochè uguale a quello della vitamina D_2 . Tale zona è stata eluita dalla carta e l'eluato esaminato nell'U.V. e saggiato con la reazione colorimetrica.

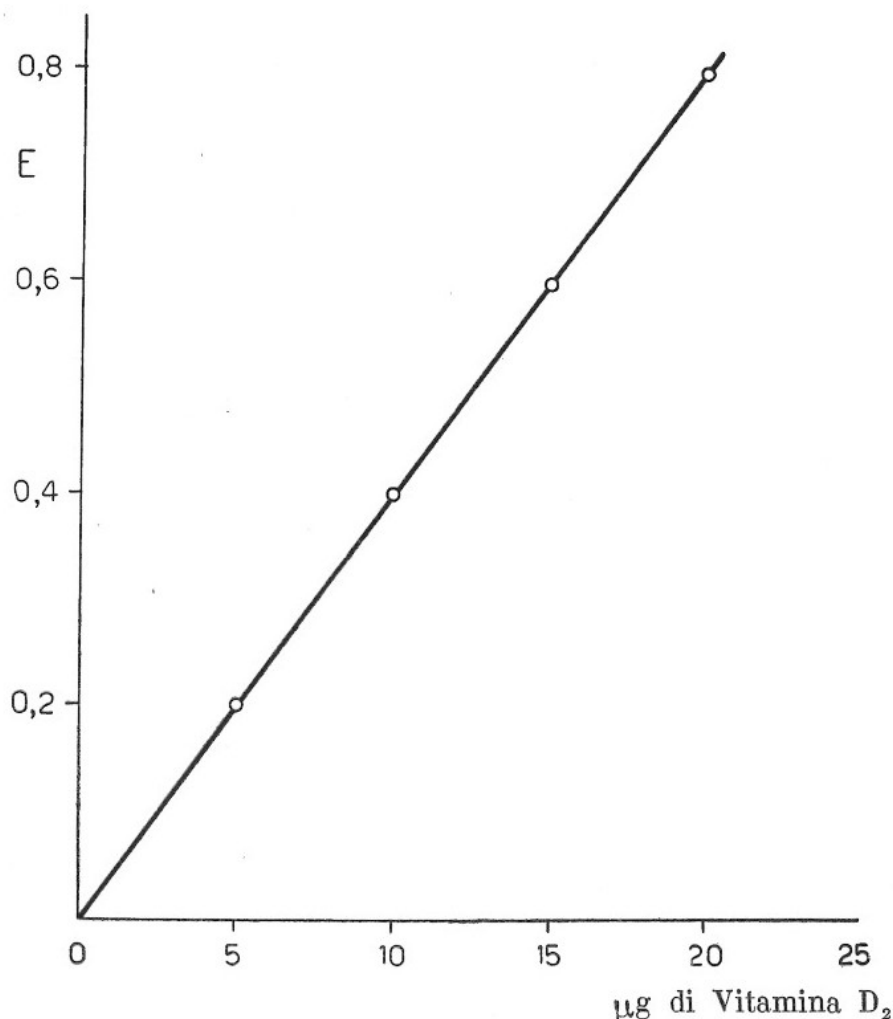


Fig. 5. - Andamento a 500 $m\mu$ dell'estinzione rispetto alla concentrazione per la vitamina D_2 pura nella reazione con il tricloruro di antimonio.

Il prodotto ha delle caratteristiche sia spettrofotometriche che colorimetriche essenzialmente diverse da quelle della vitamina D_2 come si può rilevare dalle curve di assorbimento riportate nelle figure 3 e 4: anzi l'andamento di queste consente di apportare una correzione alle curve di assorbimento della vit. D_2 per cui questa può essere determinata anche in presenza di detta impurezza della vitamina A. Di questa correzione si dirà più avanti.

PROVE CON VITAMINA D₂ IN PRESENZA DI VITAMINA A.

Sono state effettuate le seguenti prove i cui risultati sono elencati nella tabella II.

a) Soluzione alcolica contenente 150.000 U.I. di vitamina D₂ e 150.000 U.I. di vitamina A alcool per cm³: se ne depongono sulla striscia di carta 50 µl corrispondenti a 6000 U.I. (1,8 mg) di vitamina A e 6000 U.I. (0,15 mg) di vitamina D₂ e se ne effettua la cromatografia e l'eluizione secondo la tecnica descritta.

L'eluuto dà una curva di assorbimento nell'ultravioletto, nella zona compresa tra 225 e 325 mµ, che ha le seguenti caratteristiche: il rapporto fra i valori delle estinzioni al minimo e al massimo di assorbimento è uguale a 0,51; i valori delle estinzioni a 252 e a 275 mµ sono identici; il rapporto fra i valori delle estinzioni a 252 mµ (o a 275 mµ) e al massimo è uguale a 6/7; il valore della estinzione a 325 mµ è trascurabile.

Poichè le caratteristiche indicate corrispondono a quelle della vitamina D₂ pura, si può escludere la presenza di sostanze estranee in quantità tali da interferire sul risultato e quindi la quantità di vitamina D₂ si calcola direttamente dal valore della estinzione a 265 mµ, per la quale lunghezza d'onda, in etanolo, si assume $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 470$. Così operando, la quantità di vitamina D₂ recuperata corrisponde al 98% di quella cromatografata.

b) Soluzione alcolica contenente 30.000 U.I. di vitamina D₂ e 150.000 U.I. di vitamina A alcool per cm³.

I^a prova. Se ne depongono sulla striscia di carta 0,2 cm³ corrispondenti a 6000 U.I. (0,15 mg) di vitamina D₂ e 30.000 U.I. (9,0 mg) di vitamina A alcool.

Data la gran quantità di vitamina A presente, si può prevedere che il componente con Rf uguale a quello della vitamina D₂ sia presente in quantità tale da disturbare la determinazione spettrofotometrica sull'eluuto.

La curva di assorbimento che si ottiene da questo, appare difatti notevolmente deformata rispetto a quella della vitamina D₂ pura ed ha le seguenti caratteristiche: il rapporto tra le estinzioni al minimo ed al massimo è uguale a 0,59; il valore dell'estinzione a 275 mµ è più alto di quello a 252 mµ; il rapporto tra le estinzioni a 252 mµ e 265 mµ è uguale a 6,2/7; si ha un notevole assorbimento a 325 mµ.

Calcolando la vitamina D₂ presente nell'eluuto servendosi diretta-

Risultati delle prove effettuate sulle soluzioni di vitamina D in presenza di vitamina A.

N.	Caratteristiche della soluzione	Quantità di vit. D ₂ cromatografata µg	Quantità di vit. D ₂ trovata µg	Vitamina D ₂ recuperata %	Tipo di determinazione	Note
1	430.000 U.I. di vit. D ₂ e 450.000 U.I. di vit. A per cm ³ di soluzione alcoolica	150	147	98	Spettrofot.	
2	30.000 U.I. di vit. D ₂ e 450.000 U.I. di vit. A per cm ³ di soluzione alcoolica	150	135 142	90 95	Spettrofot. Colorimetr.	
3	6.000 U.I. di vit. D ₂ e 30.000 U.I. di vit. A per grammo di soluzione oleosa	30	27	90	Colorimetr.	Cromatografia dopo saponificazione
4	500.000 U.I. di vit. D ₂ e 50.000 U.I. di vit. A per 1,5 g di soluzione oleosa	125	122	98	Spettrofot.	Cromatografia direttamente sulla soluzione oleosa.

mente del valore dell'estinzione a 265 m μ si ottengono valori troppo alti.

Poichè il prodotto che interferisce ha un assorbimento pressochè uniforme nella zona tra 240 e 325 m μ , (figura 3) e poichè a 325 m μ la vitamina D₂ ha un assorbimento trascurabile, si può tentare una correzione sottraendo dal valore dell'estinzione a 265 m μ quello a 325 m μ . Sia operando in tal modo, come pure applicando una correzione sul tipo di quella proposta da MORTON e STUBBS (5) per la vitamina A, si calcola un recupero di vitamina D₂ del 90%.

Migliori risultati si ottengono con la determinazione colorimetrica effettuata su parte dell'eluato portata a secco in corrente di azoto. I risultati sono sempre falsati dalla presenza del prodotto estraneo, ma si può effettuare una correzione più attendibile perchè (figura 4) il componente con Rf uguale a quello della vitamina D₂, nella reazione colorimetrica col tricloruro di antimonio dà assorbimento perfettamente uniforme nella zona di lunghezze d'onda compresa tra 450 e 550 m μ mentre la vitamina D₂ dà un massimo pronunciato a 500 m μ e assorbimento pressochè nullo a 550 m μ . Si effettua la correzione sottraendo il valore della estinzione a 550 m μ da quello a 500 m μ . Si calcola in tal modo un recupero del 95% della vitamina D₂ cromatografata.

II^a prova. - Si effettua la cromatografia su 40 μ l della soluzione, corrispondenti a 1200 U.I. (30 μ g) di vitamina D₂ e 6000 U.I. (1,8 mg) di vitamina A alcool, e si procede come nella prima prova limitandosi però alla sola determinazione colorimetrica. Si ritrova il 92% della quantità di vitamina D₂ cromatografata.

c) Soluzione oleosa contenente 6000 U.I. di vitamina D₂ e 30.000 U.I. di vitamina A acetato per grammo. Si saponifica 1 grammo della soluzione oleosa con uno dei metodi descritti e si riprende il residuo dell'insaponificabile con 1 cm³ di etanolo di 95°. Si effettua la cromatografia su 0,2 cm³ di tale soluzione corrispondenti a 1200 U.I. (30 μ g) di vitamina D₂ e 6000 U.I. (1,8 mg) di vitamina A alcool.

Si è notato che alcune sostanze dell'insaponificabile dell'olio di oliva, le quali durante la cromatografia rimangono ferme al punto di partenza, ritardano il movimento delle vitamine A e D₂, per cui tutti gli Rf risultano notevolmente inferiori.

Di tale fatto occorre tener conto dato che la vitamina D₂ nelle condizioni della prova non è direttamente localizzabile per osservazione alla luce U.V. Conviene allora prelevare per l'eluazione tutto il tratto della striscia di carta compreso tra il componente ad Rf 0,35 della vitamina A e un punto vicino alla linea di partenza.

La presenza dell'insaponificabile dell'olio di oliva, oltre a disturbare l'andamento della cromatografia, rende anche impossibile la determinazione spettrofotometrica sull'eluato poichè un suo componente che ha lo stesso comportamento cromatografico della vitamina D₂ ha anche un assorbimento nell'U.V. molto simile a quello della vitamina D₂, come si può rilevare dalla figura 3.

Nella reazione con il tricloruro di antimonio tale prodotto dà invece un assorbimento trascurabile e uniforme nella zona 450-550 mμ (v. figura 4), per cui è possibile la determinazione della vitamina D₂ anche in sua presenza.

Nel caso in esame, con la determinazione colorimetrica si ritrova nell'eluato una quantità di vitamina D₂ pari al 90% di quella cromatografata.

d) Soluzione oleosa contenente 50.000 U.I. di vitamina A palmitato e 500.000 U.I. di vitamina D₂ per 1,5 grammi.

Si è voluto cromatografare direttamente una piccola aliquota di tale soluzione dato che prove effettuate in precedenza avevano indicato che il palmitato di vitamina A nelle condizioni del metodo, ha un Rf=0 come risulta dalla figura 1.

Sulla striscia di carta si depongono circa 15 mg (pesati con esattezza) della soluzione oleosa, si attende per circa 15' che questa si sia ben assorbita sulla carta e poi si procede come al solito.

Al termine della cromatografia, osservando la striscia di carta alla luce U.V. si nota al punto di partenza la zona di fluorescenza gialla del palmitato di vitamina A, mentre lungo la striscia è presente solamente la zona di assorbimento della vitamina D₂, che risulta però più estesa. Tale zona viene come al solito eluita in etanolo procedendo quindi alla determinazione spettrofotometrica.

Si ottiene una curva di assorbimento in tutto identica a quella fornita dalla vitamina D₂ pura e dal valore dell'estinzione al massimo si calcola una quantità di vitamina D₂ corrispondente al 98% di quella cromatografata.

e) Preparato di vitamine A e D idrosolubilizzate con TWEEN, contenente 300.000 U.I. (90 mg) di vitamina A e 20.000 U.I. (0,5 mg) di vitamina D₂ per cm³. Si tratta di un preparato conservato in laboratorio da alcuni mesi in boccetta scura chiusa con tappo di sughero, e nel quale la vitamina D₂ ha sicuramente subito notevoli alterazioni. Tenuto conto di ciò e del fatto che nel preparato già all'origine si aveva un rapporto in peso di 1:180 tra vitamina D₂ e vitamina A, una prova condotta su di esso poteva fornire utili informazioni sui limiti di applicabilità del

metodo. La prova ha dato buoni risultati: si è potuto cioè stabilire il titolo in vitamina D₂ del preparato con buona approssimazione.

Si idrolizza 1 cm³ del preparato secondo il metodo I° e si riprende l'insaponificabile con 1 cm³ di etanolo. Si depongono sulla striscia di

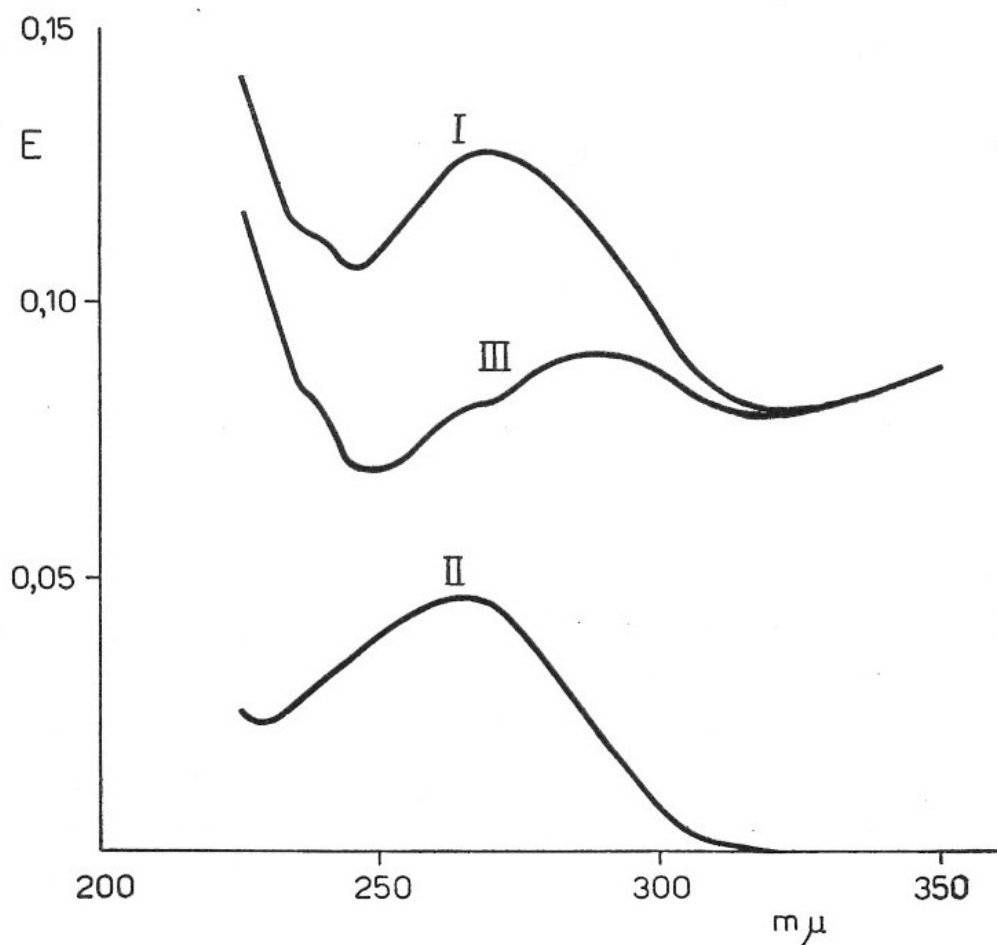


Fig. 6. - Curve di assorbimento di: I) Eluito con etanolo di 95° della prova con preparato di vitamine A a D₂ idrosolubilizzate. - II) Vitamina D₂ (dalla quantità presumibilmente presente). - III) Differenza della II dalla I.

carta 0,15 cm³ di tale soluzione e si procede alla cromatografia e all'eluzione come al solito.

Nella figura 6 è riportata la curva di assorbimento nell'U.V. che si ottiene dall'eluito in etanolo di 95°; essa è notevolmente deformata rispetto a quella della vitamina D₂ pura e precisamente il minimo è situato a 240 mμ anziché a 230 mμ, il massimo è situato a 270 anziché a 265 mμ, il rapporto tra i valori dell'estinzione al minimo e al massimo è uguale a 0,77 anziché 0,51, il valore dell'estinzione a 275 mμ è più alto di quello a 252 mμ e si ha un notevole assorbimento a 325 mμ.

Si è applicata una prima correzione semplicemente sottraendo il valore dell'estinzione a 325 mμ da quello a 265 mμ. Servendosi del valore dell'estinzione a 265 mμ così ottenuto, si è ricavata la curva di assorbi-

mento dovuta alla quantità di vitamina D_2 corrispondente e per differenza con la curva di assorbimento dell'eluato, si è ricavata quella dovuta ai prodotti estranei (figura 6).

Nella zona fra 252 e 275 $m\mu$ quest'ultima curva è fortemente inclinata ma si può assimilare ad una retta ed applicare quindi una correzione sul tipo di quella di Morton e Stubbs. Dal valore della estinzione a 265 $m\mu$ ottenuto dopo tale correzione si deduce che nel preparato vi sono mg 0,125 di vitamina D_2 per cm^3 e cioè il 25% di quella originariamente dichiarata dal preparatore.

Tale risultato è stato pienamente confermato dalla determinazione colorimetrica di vitamina D_2 , eseguita sull'eluato, che ha fornito il 24% della quantità dichiarata.

Per controllare se, per la forte quantità di vitamina A presente (13,5 mg), non venisse alterato il cammino sulla carta della vitamina D_2 , si è ripetuta una prova aggiungendo al preparato una piccola quantità di vitamina D_2 , precisamente 70 $\mu g/cm^3$, al momento della idrolisi.

Sia con la determinazione spettrofotometrica che con quella colorimetrica si ritrova complessivamente una quantità di vitamina D_2 pari alla somma di quella trovata in precedenza più quella aggiunta.

CONCLUSIONI

Dall'esame dei risultati sperimentali si possono trarre le seguenti conclusioni:

a) Il metodo proposto risulta di facile e semplice esecuzione e richiede un minimo di attrezzatura cromatografica.

b) Esso rende possibile il dosaggio della vitamina D_2 anche in presenza di forti quantità di vitamina A con un errore (in meno) che nei casi più sfavorevoli arriva al 10% ma che di norma è del 2-5%.

c) In molti casi è possibile effettuare la determinazione spettrofotometrica della vitamina D_2 e solamente in casi particolari si deve ricorrere alla reazione colorimetrica e procedere a correzioni che del resto sono molto semplici.

d) In alcuni casi, quando cioè la vitamina D_2 è presente in forti quantità e associata a vitamina A palmitato, è possibile eseguire direttamente la cromatografia su piccole quantità di soluzioni oleose evitando la fastidiosa operazione della saponificazione.

e) Dai risultati delle prove effettuate sul preparato di vitamine A e D idrosolubilizzate, si può dedurre che il metodo ha vaste possibilità di applicazione. Infatti in tale preparato si è riusciti a dosare, si ritiene con buona approssimazione, il contenuto di vitamina D₂ pur in presenza di un peso 700 volte superiore di vitamina A.

Ringrazio il Prof. F. TOFFOLI ed il Prof. A. MARIANI per i consigli avuti durante l'esecuzione della presente ricerca.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MARIANI A. e CAVINA G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 16: 725 (1953).
 - (²) ROSSI C. A. - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 26: 1563 (1950).
 - (³) DAVIS R. B. e Coll. - J. Amer. Chem. Soc., 74: 4483 (1952).
 - (⁴) VOGEL E. e NEUKAM H. - Milchwissenschaft, 8: 284 (1953).
 - (⁵) MORTON R. A. e STUBBS A. L. - Biochem. J., 42: 195 (1948).
-