

## VITAMIN A, SPEKTROFOTOMETRISK (IUPAC)

Definisjon

Ved 1 IE (internasjonal enhet) vitamin A forstås den biologiske aktiviteten av 0,344 µg retinolacetat ( $C_{22}H_{32}O_2$ ), svarende til 0,300 µg retinol ( $C_{20}H_{30}O$ ).

Prinsipp

Fettprøven forsåpes, og innholdet vitamin A ekstraheres over i eterfase. En alikvot eterekstrakt inndampes. Inndampningsresten løses i isopropanol for spektrofotometrisk avlesning ved nærmere gitte bølgelengder og beregning av vitamin A. Hvis absorpsjonsmaksimum ligger utenfor bølgeområdet 323-327 nm, underkastes eterekstraktet en rensning ved kolonnekromatografering.

Reagenser

1. Kaliumhydroksyd, 13,5 N. 60 g KOH, p.a., løses i 40 ml vann
2. Eter, peroksydfri
3. Fenolftalein-indikator. 1,0 g fenolftalein løses til 100 ml med 96 % etanol
4. Isopropanol, p.a.
5. Aluminiumoksyd etter Brockmann. Merck art. nr. 1097
6. Hexan, p.a.
7. Etanol, 96 %.

Utstyr

- a. Ståkolbe (brun), 150 ml, med kort hals og B24-slip
- b. Tilbakeløpsrør, ca. 1 m, med B24-slip
- c. Vannbad
- d. Skilletrakt, 250 ml
- e. Rundkolbe, 150 ml, med kort hals og B24-slip
- f. Ultrafiolett-lampe, Philips 125 Watt kvikksølvlampe med Woods glasskolbe og Schotts lysfiltere nr. Bg 12, Wg 2 (hvert 2 mm tykt) og Yg 2 (1 mm tykt)
- g. Kromatograferingskolonne, total lengde 48 cm, med 3-veis hane. Kolonnens øverste 18 cm har innvendig diameter lik 2,2 cm. De nedre 30 cm har innvendig diameter lik 0,7 cm.
- h. Nitrogen-flaske med reduksjonsventil

### Utførelse

Alle operasjoner utføres samme dag, og det beskyttes mot dagslys og annet skadelig lys.

En nøyaktig utveid mengde prøve, maksimum 1 gram, inneholdende 200-800 IE vitamin A, overføres til ståkolbe (a) forsynt med stigerør. Det tilføres 30 ml etanol (7) og 2,5 ml kaliumhydroksyd-løsning (1). Blandingen kokes i 30 minutter, og det rystes av og til. Løsningen avkjøles og overføres til skilletrakt. Det spyles over med 3 x 10 ml aq.dest.

Prøven utrystes 4 ganger a 1 minutt med eter (2) a 30 ml. De samlede eterekstraktene fintappes for såpe og vaskes med 50 ml vann ved forsiktig rotering. Vaskingen gjentas med samme mengde vann og stadig kraftigere rotering, inntil vaskevannet forblir fargeløst ved tilsetning av noen dråper fenolftalein-indikator. Vaskevannet skal hver gang være helt klart før fratapping. Vasket eterfase hensettes i 15 minutter og fintappes deretter for vann. Eterløsningen overføres til 100 ml målekolbe, og det justeres til merket med eter (2).

En alikvot eterløsning på 20 ml inndampes til tørrhet under vakuum. Inndampningsresten løses umiddelbart i 10 ml isopropanol (4) og absorpsjonen avleses mot ren isopropanol ved bølgelengdene 300, 310, 323, 325, 327 og 334 nm.

Hvis absorpsjonsmaksimum ligger innen bølgeområdet 323-327 nm og forholdet  $\frac{A_{300}}{A_{325}}$  er mindre enn 0,73, foretas beregning som angitt til slutt.

Hvis absorpsjonsmaksimum ligger utenfor bølgeområdet 323-327 nm, eller forholdet  $\frac{A_{300}}{A_{325}}$  overstiger 0,73, foretas følgende rensing av eterekstraktet ved kolonnekromatografering:

Kolonnen (g) forsynes med bomullspropp i stilken. Utløpet tettes ved hjelp av gummislange med glasskule, og hexan påfylles til et stykke opp i kolonnens tykkere del. Aluminiumoksydet (5) tilsettes 6 % v/w vann og påfylles kolonnen. Det bankes forsiktig på kolonnen slik at oksydet setter seg og får riktig tetthet. Oksydet skal ha en høyde på ca. 25 cm i ferdig pakket kolonne.

Kolonnen tettes med gummipropp på toppen og settes under svakt nitrogenstrykk slik at hexan drypper ut stilken med en hastighet på 2-3 ml pr. minutt. Når hexan-nivået er kommet  $\frac{1}{2}$  cm over  $Al_2O_3$ -nivået, stoppes nitrogentilførselen, og gummiproppen tas av.

En alikvot på 50 ml eterløsning etter forsåpningen inndampes under vakuum. Det tilsettes umiddelbart noen ml etanol og inndampes

påny. Denne prosessen gjentas til alt vann er dampet bort. Umiddelbart deretter tilsettes noen ml hexan som avdampes. Prosessen gjentas 1 gang.

Inndampningsresten løses i ca. 10 ml hexan og overføres kvantitativt til kolonnen, som proppes og nitrogen koples til.

Når hexan-nivået har nådd ned til et par mm over  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -nivået, stoppes elueringen, 25 ml ren hexan påfylles, og elueringen fortsettes. Deretter elueres etappevis med hexan tilsatt stigende mengde eter:

1. 5 % eter i hexan (1,25 ml eter + 23,75 ml hexan)
2. 10 % eter i hexan (2,50 ml eter + 22,50 ml hexan)
3. 15 % eter i hexan (3,75 ml eter + 21,25 ml hexan)
4. 20 % eter i hexan (5,00 ml eter + 20,00 ml hexan)
5. 25 % eter i hexan (6,25 ml eter + 18,75 ml hexan)

Ved et gitt blandingsforhold, vanligvis når eter utgjør 20 % av blandingen, vil vitamin A begynne å vandre nedover i kolonnen. Dette blandingsforholdet brukes ved den fortsatte elueringen.

Vitamin A-båndet følges med UV-lampen (f). Når båndet, som har gulgrønn fluorescens, befinner seg 4 cm fra kolonnens utløp, oppsamles eluatet i en 50 ml målekolbe. Eventuelle rester av vitamin A på utsiden av kolonnespissen, spyles til slutt ned i kolben, som fylles til merket med hexan og det blandes.

En alikvot på 20 ml hexanløsning overføres til kolbe, og løsningsmidlet avdampes under vannstrålevakuum på lunkent vannbad. Inndampningsresten løses umiddelbart i 10 ml isopropanol, og absorpsjonen avleses ved de foran angitte bølgelengdene.

### Beregning

Forutsatt at absorpsjonsmaksimum ligger innen bølgeområdet 323-327 nm og forholdet  $\frac{A_{300}}{A_{325}}$  er mindre enn 0,73, beregnes den korrigerede absorpsjon ved 325 nm slik:

$$A_{325\text{korr.}} = 6,815 \cdot A_{325} - 2,555 \cdot A_{310} - 4,260 \cdot A_{334}$$

$A_{325\text{korr.}}$  anvendes bare hvis den er mindre enn  $0,97 \cdot A_{325}$ , ellers anvendes den ukorrigerede verdi for  $A_{325}$ .

Det endelige resultatet omregnes til  $A_{(1\%, 1 \text{ cm}, 325 \text{ nm})}$ , som multipliseres med 1830. Derved fås prøvens innhold av vitamin A, uttrykt i IE/g:

$$\text{Innhold Vitamin A, IE/g} = \frac{1830 \cdot A}{\frac{W \cdot V_2}{V_1} \cdot \frac{100}{V_3}} = \frac{18,3 \cdot A \cdot V_1 \cdot V_3}{W \cdot V_2}, \text{ der}$$

A = Korrigert eller avlest absorpsjon ved 325 nm

W = Utveid mengde prøve, gram

V<sub>1</sub> = Totalvolum eterekstrakt etter forsåpning, ml

V<sub>2</sub> = Alikvot eterløsning eller eluat for inndamping, ml

V<sub>3</sub> = Sluttvolum isopropanol for absorpsjonsavlesning, ml

#### Henvisning

Pharmacopoea Nordica, Vol. I, side 127-129, Universitetsforlaget,  
Aas & Wahls Boktrykkeri, Oslo, 1963.