

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА D₃ В РЫБЬИХ ЖИРАХ

Канд. техн. наук Р. Я. Файнгерш

Лаборатория витаминов ВНИРО

ВВЕДЕНИЕ

Определение витамина D₃ в жирах печени рыб производится длительным и трудоемким биологическим методом. По этой причине жиры печени большинства рыб и морских млекопитающих СССР мало изучены на содержание витамина D₃*, что задерживает изыскание источников сырья для производства этого витамина. Кроме того, отсутствие данных о содержании витамина D₃ в рыбьих жирах препятствует их правильному использованию в качестве медицинских жиров. Например, при приготовлении медицинского жира к натуральному фильтрованному жиру добавляют по расчету концентрат витамина D₂ (облученного эргостерола), при этом, как правило, не учитывается первоначальное содержание витамина D₃ в рыбьем жире.

В настоящее время термин «витамин D» имеет собирательное значение, так как охватывает все наиболее важные антирахитические вещества, разные по своему химическому строению. Относительно полно исследовано лишь около 10 витаминов D (6).

В животном мире наиболее распространен витамин D₃, предшественником которого является животный стерол — дегидрохолестерол, превращающийся после облучения в витамин D₃.

Наиболее богатым естественным источником витамина D₃ являются жиры печени рыб.

Антирахитическая активность витамина D₃ гораздо выше по сравнению с витамином D₂ (облученным эргостеролом).

Стеро́лы — это провитамины D, приобретающие антирахитическую активность при ультрафиолетовом облучении.

В печени рыб в значительных количествах встречается холестерол, который входит в состав неомыляемых веществ печеночного жира. Данные по содержанию холестерола в некоторых рыбьих жирах приводятся в табл. 1.

Холестерол растворим в горячем спирте, а на холоду выпадает в осадок. Этим свойством холестерола пользуются для отделения его от других составных частей неомыляемых веществ.

Классической реакцией для осаждения холестерола является реакция с дигитонином, которой пользуются для количественного отделения

* В 1949 г. витаминной лабораторией ВНИРО совместно с Институтом биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР начаты работы по систематическому изучению отечественных рыбьих жиров на содержание витамина D₃.

Содержание холестерина в некоторых рыбьих жирах

Наименование жира	Содержание холестерола в жире (в %)	Содержание холестерола в неомыляемых веществах (в %)
Печеночный жир тихоокеанской колючей акулы	3,0	—
Жир сардины (пильчарда)	6,0	—
Печеночный жир трески	0,3 (средн.)	до 50
Печеночный жир щуки и карпа	от 0,5 до 0,9	—
Головной жир кашалота	0,2	—
Печеночный жир китовой акулы	от 4,0 до 22,0	—

холестерола (4). (Дигитонин — глюкозид очень сложной природы, принадлежащий к группе сапонинов).

Необходимо отметить, что опыты по разработке методики определения витамина D в рыбьих жирах были впервые начаты в 1939 г. М. А. Гудлетом и сотрудниками (1, 5) во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте (ВНИВИ). Однако положительных результатов не получено.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Основная трудность химического определения витамина D₃ в рыбьих жирах заключается в отсутствии специфической цветной реакции только для витамина D₃. Наиболее изученной и распространенной реакцией на витамин D₃ до сих пор остается реакция с треххлористой сурьмой¹, дающая с витамином D₃ желтовато-розовое, а с витамином A синее окрашивание. Цветная реакция с витамином A обладает гораздо большей интенсивностью, по сравнению с реакцией протекающей с эквивалентным количеством витамина D₃, учитывая еще то, что в рыбьих жирах обычно содержится значительно больше витамина A, чем витамина D₃. Образующаяся при реакции с витамином A интенсивно синяя окраска мешает колориметрическому определению витамина D₃. Для разделения этих витаминов мы использовали метод хроматографической адсорбции, открытый и разработанный русским ученым, проф. М. С. Цветом еще в 1903—1906 гг. (7).

Идея метода очень проста, несложна и техника анализа; исследуемый раствор, представляющий собой смесь различных компонентов, пропускается через столбик адсорбента (хроматографическую колонку). Проходя через хроматографическую колонку, составные части смеси разделяются и располагаются отдельными горизонтальными слоями («зонами»), причем вещество с большей способностью адсорбироваться занимает верхнюю часть колонки, менее адсорбирующееся вещество располагается вслед за ним и т. д. Чем меньше адсорбционная способность вещества, тем ниже оно располагается в столбике адсорбента. Выделение веществ, адсорбированных на хроматографической колонке, произ-

¹ Рекомендуемые различными авторами цветные реакции на витамин D с ди-хлоргидрин-глицерином, раствором брома в хлороформе не дали положительных результатов.

водится при помощи смывания их растворителями или непосредственным разрезанием колонки по различно окрашенным зонам.

Применяемые нами хроматографические колонки представляют собой две стеклянные трубочки разного диаметра. К суженному концу широкой трубочки припаивается более узкая. В трубочку большего диаметра вкладывается ватный тампон, который закрывает узкую часть трубки, во избежание просыпания адсорбента.

Колонку вставляют узким концом через пробку в колбу для отсасывания, присоединенную к водоструйному насосу, отрегулированному так, чтобы в колбе образовалось небольшое разрежение.

В хроматографическом анализе очень большое значение имеет подготовка адсорбентов, так как адсорбирующая способность зависит не только от химического строения, но и от способа приготовления, размера частичек (степени измельчения) и влажности адсорбента. При хроматографировании, как правило, применяются стандартизованные адсорбенты с определенной степенью влажности и величиной частиц. Стандартизованных адсорбентов мы не имели в своем распоряжении, поэтому подготовка их производилась в процессе работы.

Разделение витаминов А и D₃ на хроматографической колонке осложняется тем, что оба витамина бесцветные, неокрашенные вещества, и для того, чтобы обнаружить зоны их расположения на адсорбенте, необходимо проводить еще ряд дополнительных операций.

Получить резко окрашенные стойкие продукты реакции этих витаминов с какими-нибудь веществами почти не удастся. Чтобы обнаружить границу между зонами адсорбции витаминов А и D₃, был применен метод «цветного индикатора».

Метод „цветного индикатора“

В качестве «цветного индикатора» применяли краситель Судан III, адсорбирующийся на окиси алюминия в виде красного кольца, причем зона его адсорбции непосредственно примыкает к зоне адсорбции бесцветного витамина D₃.

Необходимо отметить, что витамин А лучше адсорбируется, чем витамин D₃, т. е. располагается выше в адсорбционной колонке. Это объясняется, повидимому, большим количеством сопряженных двойных связей в молекуле витамина А, по сравнению с витамином D.

Первым этапом работы была проверка адсорбционной способности в отношении витаминов А и D₃ и красителя Судана III следующих адсорбентов:

1. Окись магния, подсушенная при 105—110°.
2. Окись алюминия, прокаленная при 500—600° С.
3. Окись алюминия, подсушенная при 105—110° С.
4. Bentonit.

Проверку адсорбентов вначале производили на «искусственных смесях», т. е. смесях концентратов витамина А и витамина D₂¹. Перед адсорбцией концентраты витаминов подвергались омылению по стандартному способу.

Омыление необходимо проводить по двум причинам: во-первых, следует разрушить жир, который понижает активность адсорбента и дает дополнительную окраску с цветным индикатором — Судан III; во-вторых, витамин А при омылении переходит в форму спирта, обладающую большей адсорбционной способностью, благодаря наличию в ней гидроксильной группы.

¹ Физические и химические свойства витаминов D₂ и D₃ считают одинаковыми.

Неомыляемые вещества извлекали серным эфиром. Эфирный экстракт промывали водой и высушивали сернокислым натром, фильтровали и удаляли эфир на водяной бане. Остаток неомыляемых веществ растворяли в легком бензине (темп. кипения до 80°).

Попытки извлекать неомыляемые из гидролизата непосредственно легким бензином не дали положительных результатов, так как при этом происходило образование довольно стойкой эмульсии, что приводило к большим потерям витамина.

Было испытано несколько растворителей и несколько вариантов смесей растворителей. Наиболее подходящим растворителем для неомыляемых веществ оказался чистый легкий бензин (темп. кип. до 80°). Наиболее подходящим растворителем для красителя Судан III оказалась смесь бензола с легким бензином (в соотношении 1 : 4).

При наполнении колонки необходимо соблюдать следующее правило: колонка должна быть чистой и совершенно сухой. В нижнюю часть вкладывают ватный тампон и затем небольшими порциями насыпают адсорбент.

Уплотнение колонки производилось равномерными и короткими ударами деревянного пестика. Когда колонка наполнена адсорбентом примерно до $\frac{4}{5}$ длины, сверху кладут кусочек ваты, смоченной растворителем, пускают водоструйный насос и приливают по каплям растворитель.

Верхние слои адсорбента при этом равномерно и медленно пропитываются растворителем и при дальнейшем приливании его не отслаиваются. Столбик адсорбента должен быть покрыт жидкостью, иначе он может сморщиться и дать изломы и трещины.

После смачивания через колонку пропускают смесь витаминов и Судан III, а затем производят «проявление», т. е. приливание довольно значительного количества растворителя, что приводит к расширению зон адсорбции.

Размер колонок следующий (в см):

Диаметр широкой части	1,2
Длина	7,0
Диаметр узкой части	0,8
Длина узкой части	8,0

Выделение веществ, адсорбированных на колонке, производилось путем смывания (элюции) другим растворителем, смывная (элюирующая) способность которого больше, чем у легкого бензина. В качестве такого растворителя применяли хлороформ. Содержание витамина А определялось в фильтрате после «проявления», в фильтрате после смывания хлороформом и в адсорбенте после смывания.

Качественная реакция на витамин D₂ проводилась на этих же этапах.

Проверка вышеуказанных адсорбентов показала, что:

1) окись магния обладает очень низкой адсорбирующей способностью по отношению к витаминам А и D₂, растворенным в легком бензине. Краситель Судан III совершенно не удерживается окисью магния;

2) прокаленная окись алюминия плохо адсорбирует витамин А, который смывается при «проявлении» легким бензином;

3) подсушенная при 105—110° окись алюминия адсорбирует витамин А и удовлетворительно адсорбирует краситель Судан III.

Однако витамин D₂ полностью не удерживается подсушенной окисью алюминия после «проявления» и частично переходит в фильтрат;

4) немногочисленные опыты с бентонитом показали, что бентонит, адсорбируя Судан III, одновременно дает яркосинее окрашивание с витамином А (вверху располагается широкая, без извилин, зона витамина А синего цвета, под ней светлокрасная каемка Судан III).

Испытание адсорбента-асканита

Асканит (аскангель) — глиноподобная порода, разновидность бентонитовых глин, залегает в Грузии близ селения Аскани и представляет собой в измельченном виде порошок темносерого цвета.

По нашему мнению, асканит не является подходящим адсорбентом для разделения витаминов А и D₃ в рыбьем жире, ввиду темной окраски асканита, на которой очень трудно различить синее окрашивание зоны адсорбированного витамина А, особенно при сравнительно небольшом содержании последнего в натуральных рыбьих жирах.

Необходимо отметить, что после промывки растворителями высушенный асканит становится гораздо светлее, а растворители после промывки приобретают светложелтый цвет.

Однако при смачивании колонки растворителем промытый асканит снова темнеет.

Асканит обладает небольшой гидрофильностью, а следовательно, и невысокими коллоидными свойствами, что, повидимому, снижает его адсорбирующую способность.

Проведенные нами опыты использования асканита в качестве адсорбента не дали положительных результатов. Небольшая концентрация витамина А, не превышающая 1000 инт. ед. на 1 мл, давала настолько слабое окрашивание, что его не было заметно на темносером фоне колонки с адсорбентом.

Применение бентонита как адсорбента

Еще в 1947 г., работая с очень небольшими количествами бентонита, полученного из Минералогического музея Академии наук Союза ССР, мы обнаружили, что при пропускании бензинового раствора неомыляемой фракции рыбьего жира через хроматографическую колонку из бентонита появилась яркосиняя полоска, указывающая зону адсорбирования витамина А.

Таким образом, при работе с бентонитом отпадает необходимость в применении «цветного индикатора», так как бентонит, адсорбируя витамин А, дает с последним яркосинее окрашивание.

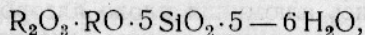
Это наблюдение нашло подтверждение в статье А. С. Вечера, опубликованной в журнале «Биохимия» в 1948 г. (3).

В настоящей статье автор даже предлагает использовать бентонит в качестве нового реактива на витамин А вместо треххлористой сурьмы.

Все основные опыты мы проводили с бентонитом огланлинского месторождения, добываемым близ ст. Джебел Ашхабадской ж. д.

Бентонит — глиноподобная порода, состоит в основном из минерала монтмориллонита, имеющего тонкую пластинчатую структуру¹.

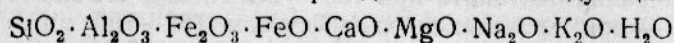
По своей химической природе бентонит представляет собой соединения типа:



где под R_2O_3 подразумевается Al_2O_3 или Fe_2O_3 , а под RO — MgO , CaO , FeO .

¹ Существует мнение, что монтмориллонит является большим многовалентным анионом, обладающим свойством связывать водородные ионы.

Бентонит огланлинского месторождения имеет следующий состав (3):



и является довольно чистым природным монтмориллонитом.

Огланлинский бентонит представляет собой мягкий, белый с кремовым оттенком минерал, легко раскалывающийся на куски с неровным раковистым изломом.

В настоящее время бентонитовые «глины» применяются в бумажном и мыловаренном производстве, а также при обработке кожи.

Главное применение огланлинский бентонит нашел в качестве формовочной земли для отливки сложных деталей. Кроме того, в последнее время бентонит употребляется в фармакологии, как составная часть таблеток «Бентоксил» для лечения желудочных болезней.

Для использования в качестве адсорбента бентонит измельчали в ступке и просеивали через сито с диаметром ячеек 1 мм.

Обрабатывали бентонит, так же как рекомендует Вечер, соляной кислотой с последующей промывкой водой (3).

Однако применяемый нами бентонит, повидимому, обладает высокими коллоидными свойствами, так как при действии воды очень сильно набухает, образуя студнеобразную аморфную массу, не поддающуюся фильтрованию ни на обычном фильтре, ни с отсасыванием на Бюхнеровской воронке.

Бентонит, обработанный соляной кислотой, но не промытый, после высушивания приобретал яркожелтый («канареечный») цвет и почти не давал синего окрашивания с витамином А. Поэтому в дальнейшем мы не обрабатывали бентонит кислотой.

Что касается высушивания бентонита, то нами были испытаны различные варианты времени и температуры сушки (см. табл. 2).

Таблица 2

Отделение витамина А от витамина D₂ хроматографической адсорбцией на бентоните (растворитель-хлороформ)

Смесь концентратов витаминов А и D ₂ № пробы	Обработка бентонита	Внесено на колонку		Обнаружено в фильтрате		
		витамина А (в инт. ед.)	витамина D ₂ (в инт. ед.)	витамина А (в инт. ед.)	витамина А (в %)	витамина D ₂ (качественная реакция)
№ 1	Неподсушенный	2750	4350	550	20	Положительная
№ 2	То же	2650	4750	610	25	То же
№ 3	"	3150	5430	660	21	"
№ 4	Подсушенный при 160° 1 час	8100	5000	Не обнаруж.	—	Отрицат.
№ 5	Подсушенный при 140° 2 часа	500	7250	" "	—	Положит.
№ 6	Подсушенный при 120° 1,5 часа	4250	5250	" "	—	"
№ 7	Подсушенный при 120° 1 час	5100	4500	" "	—	"

Как видно из табл. 2, неподсушенный бентонит плохо удерживает витамин А: так, при проявлении колонки 80—100 мл хлороформа в фильтрат переходит около 20% витамина А.

(16) Подсушивание бентонита при 160° увеличивает его адсорбирующую способность — при проявлении хлороформом (80—100 мл) на колонке удерживается не только витамин А, но и витамин D_2 .

Лучше всего подсушивать бентонит при температуре 120° .

Мы применяли колонки из обычного стекла следующих размеров (в см):

Диаметр широкой части	1,5
Высота " "	20,0
Диаметр узкой части	0,8
Высота " "	8

Бентонит не требует уплотнения, подобно окиси алюминия, окиси магния и другим распространенным адсорбентам. При осторожном насыпании и легком поворачивании колонки бентонит образует ровную поверхность, не дающую трещин и отслаивания. Благодаря большой дисперсности бентонита он заполняет легко и равномерно колонку.

Применение в качестве растворителя эфирнохлороформенной смеси (90% эфира и 10% хлороформа по объему) в нашей работе не дало удовлетворительных результатов, так как смесь обладала значительной элюирующей способностью. Очевидно серный эфир является довольно сильным «смывателем», даже по отношению к такому активному адсорбенту, как бентонит.

Применение легкого бензина (темп. кип. до 80°) усложнено тем, что полное удаление бензина требует повышенной температуры, отрицательно влияющей на витамин D_3 . Остатки бензина в неомыляемых веществах причиняют неудобство при колориметрировании, так как приводят к помутнению хлороформенного раствора.

Наилучшим растворителем, на основании проведенных опытов, можно считать хлороформ, он хорошо смывает витамин D_3 и часть стеролов, оставляя на бентонитовой колонке яркосинюю зону витамина А, которая равномерно передвигается вниз в результате «проявления», т. е. промывания колонки определенным количеством хлороформа.

Перед хроматографированием жир обязательно омыляли. Несколько опытов было проведено с жирами без предварительного омыления. В этом случае под яркосиней полоской, указывающей зону адсорбции витамина А, образовалась широкая фиолетовая полоса, повидимому, в результате адсорбции неомыленного жира. Эта полоса не давала возможности четко определить нижнюю границу синей зоны адсорбированного витамина А.

При пропускании неомыляемой фракции через колонку с бентонитом образования этой фиолетовой полоски не наблюдалось.

Надо отметить, что появление фиолетового окрашивания на бентоните является довольно чувствительным показателем присутствия неомыленного жира.

Фильтрат после хроматографирования выпаривают до определенного объема и в нем колориметрически определяют содержание витамина D_3 по интенсивности цветной реакции с треххлористой сурьмой.

Испытания проводились электрофотоколориметром.

Выбор светофильтра

При фотоколориметрических измерениях очень важно применять соответствующий светофильтр.

В результате реакции витамина D_3 с треххлористой сурьмой в присутствии хлористого ацетила получается желтовато-розовое окрашивание, имеющее максимум светового поглощения при длине волны около

500 м μ . Как правило, выбирают светофильтр, спектральная пропускная способность которого противоположна пропускной способности измеряемого раствора, т. е. фильтр должен пропускать больше всего света, именно, при той длине волны, при которой измеряемый раствор поглощает максимум света.

Таким образом, для реакции с треххлористой сурьмой необходимо применять светофильтр, имеющий максимум пропускания около 500 м μ .

В приборе имеется стеклянный светофильтр № 54 зеленого цвета, спектральные пределы пропускной способности которого колеблются от 500 до 570 м μ , а максимум пропускной способности указывается равным 540 м μ .

Мы произвели измерение максимума пропускной способности зеленого светофильтра на спектрофотометре Бекмана с вольфрамовой лампой в качестве источника света (см. табл. 3).

Таблица 3

Результаты измерений максимума пропускной способности зеленого светофильтра № 54 на спектрофотометре Бекмана

Длина волны (в м μ)	% пропускной способности светофильтра	Длина волны (в м μ)	% пропускной способности светофильтра	Длина волны (в м μ)	% пропускной способности светофильтра	Длина волны (в м μ)	% пропускной способности светофильтра
500	4,5	520	9,5	536	8,5	565	1,8
504	4,5	522	10,0	538	8,3	570	1,5
506	5,0	524	10,0	540	8,0	—	—
510	6,3	526	10,0	542	6,5	—	—
512	7,0	528	10,0	545	5,5	—	—
514	8,0	530	9,5	547	4,8	—	—
516	8,5	532	9,5	550	4,5	—	—
518	9,0	534	9,0	555	3,0	—	—
				560	2,5		

На основании данных табл. 3 построена кривая максимума пропускной способности (рис. 1). Из этой кривой видно, что максимум пропускной способности этого светофильтра (10%) находится в пределах длины волны между 520 и 530 м μ .

Отсчеты на электрофотоколориметре

Шкала на приборе имеет логарифмическую калибровку и поэтому, в большинстве случаев, отсчеты на данной шкале прямо пропорциональны оптической плотности окрашенного вещества (оптическая плотность пропорциональна концентрации вещества).

При наличии окрашенного стандарта, соответствующего определенной концентрации испытуемого вещества, расчеты концентрации на этом электрофотоколориметре становятся такими же простыми, как и на обыч-

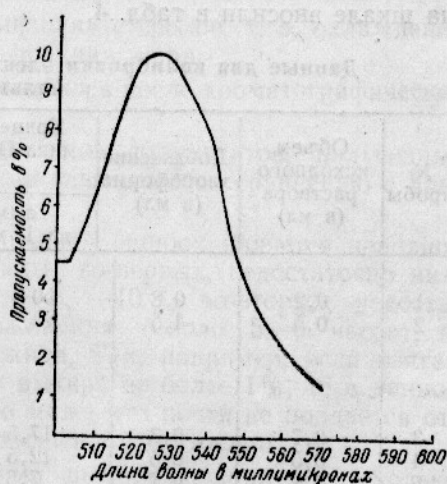


Рис. 1

ном визуальном колориметре, т. е. отсчеты на шкале прямо пропорциональны концентрации.

Чтобы проверить правильность этого положения, был проведен ряд опытов. Результаты опытов показали, что пропорциональность отсчетов концентрации верна лишь в определенных пределах, т. е. не ниже 20 и не выше 300 делений шкалы.

Ввиду того что окраска витамина D_3 с треххлористой сурьмой очень нестойкая и быстро изменяется во времени, возникает необходимость откалибровать прибор таким образом, чтобы отсчеты соответствовали определенным концентрациям витамина D_3 .

Калибровка проводилась по двум эталонам:

1) Эталон, изготовленный Государственной контрольной витаминной станцией Академии медицинских наук Союза ССР, представляет собой раствор облученного эргостерола (витамина D_2) в подсолнечном масле, активность которого равна 10 000 инт. ед. в 1 мл (согласно биологической проверки). Эта калибровка не дала удовлетворительных результатов.

2) Раствор чистого кальциферола (витамина D_2) в хлороформе (1 г. кальциферола содержит 40 000 инт. ед. витамина D_2).

Калибровка электрофотоколориметра по чистому кальциферолу

Исходный раствор кальциферола в хлороформе содержал 10 000 инт. ед., или 250 гамм витамина D_2 в 1 мл¹.

Для калибровки подготавливались растворы определенной, заранее известной концентрации (см. табл. 4). Эти разведения имели довольно широкий диапазон концентраций — от 100 до 2000 инт. ед. на 1 мл.

При калибровке, как и в дальнейшей работе, установка на нуль производилась не по раствору чистого хлороформа, а по раствору реактива — треххлористой сурьмы в хлороформе, так как раствор $SbCl_3$ по своей прозрачности несколько отличается от хлороформа.

Растворы готовили непосредственно в колориметрических пробирках.

К 1 мл раствора добавляли 5 мл свежеприготовленного насыщенного раствора треххлористой сурьмы и три капли хлористого ацетила. Нарастание окраски проходило постепенно. По прошествии четырех минут интенсивность окраски измеряли на электрофотоколориметре и отсчеты на шкале вносили в табл. 4.

Таблица 4

Данные для калибровки электрофотоколориметра по чистому кальциферолу

№ пробы	Объем исходного раствора (в мл)	Добавление хлороформа (в мл)	Концентрация витамина D в измеряемой пробе		Показания прибора	Примечание
			гамм на 1 мл	инт. ед. на 1 мл		
1	0,2	0,8	50	2000	150	Проба 2 служила исходным раствором для дальнейших разведений
2	0,5	4,5	25	1000	93	
3	0,7	0,3	17,5	700	70	
4	0,5	0,5	12,5	500	52	
5	0,3	0,7	7,5	300	35	
6	0,2	0,8	5,0	200	21	
7	0,1	0,9	2,5	100	10	

¹ Гамма (микрограмм) витамина D_2 равняется 40 инт. ед.

При больших концентрациях — 2000 и 1000 инт. ед. на 1 мл — получалась желтовато-оранжевая со слабозловонным оттенком окраска; при более низких концентрациях получающаяся окраска имела розовый цвет.

Для построения калибровочной кривой на оси абсцисс откладывали концентрацию кальциферола в инт. ед. на 1 мл, а на оси ординат — показания электрофотоколориметра. Полученная калибровочная кривая (рис. 2) служила в дальнейшем для вычисления концентрации витамина D₃.

Для количественного определения витамина D₃ в натуральных рыбьих жирах использовалась часть жиров, заготовленных лабораторией витаминов ВНИРО для биологических испытаний на витамин D₃.

Удаление стеролов

На основании ряда предварительных опытов с рыбьим жиром, можно вывести заключение, что отделение витамина А на хроматографической колонке из бентонита проходит хорошо.

Однако в фильтрат переходят стеролы, дающие такую же цветную реакцию с треххлористой сурьмой, как и витамин D₃.

Стеролы (в основном холестерол) содержатся в значительном количестве в некоторых рыбьих жирах, и поэтому увеличивают результат колориметрических измерений в несколько раз.

Стеролы обладают свойством выпадать в осадок из раствора в метаноле при температуре минус 10—15°. Этим свойством мы воспользовались для отделения стеролов от витамина D₃.

Мы применяли метод «вымораживания» стеролов, т. е. охлаждения метанолового раствора неомыляемой фракции жира.

Вначале «вымораживание» производилось после хроматографической адсорбции.

Эти опыты не дали удовлетворительных результатов, полученные данные содержания витамина D₃ весьма завышены по сравнению с данными биологической проверки.

По нашему мнению, основной причиной ошибок является неполное удаление стеролов. Это можно объяснить, во-первых, недостаточной низкой температурой «вымораживания» (—8, —10°), во-вторых, недостаточной продолжительностью вымораживания (около 5—6 часов), и, в-третьих, слишком малой навеской жира. Так, например, если взятая навеска составляет 3—4 г, а стеролов в жире не более 1%, то в данной навеске количество стеролов настолько мало, что почти не поддается отделению и находится в растворе во взвешенном состоянии.

В дальнейшем мы увеличили время вымораживания и несколько снизили температуру.

Кроме того, упомянутая выше схема определения (вначале хроматографирование, затем вымораживание) связана с усложнением методики, введением дополнительных операций отгонки растворителя. Поэтому

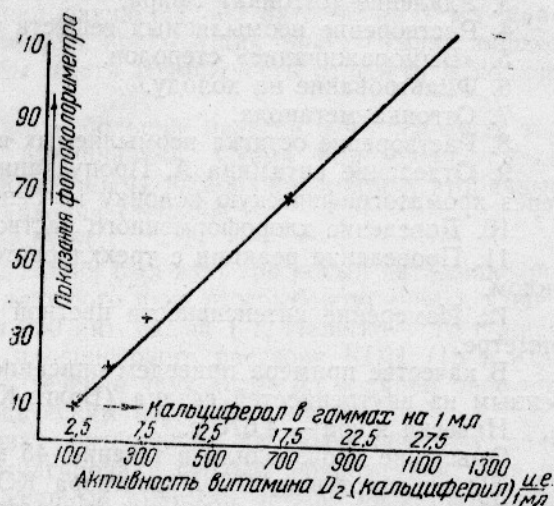


Рис. 2

в дальнейшем вымораживание стеролов проводилось непосредственно после выделения неомыляемых веществ и до хроматографирования.

Схему определения витамина D₃ можно представить так:

1. Омыление жира спиртовым раствором КОН (омыленная часть отбрасывается).
2. Экстракция неомыляемых веществ серным эфиром.
3. Удаление (отгонка) эфира.
4. Растворение неомыляемых веществ в метаноле.
5. «Вымораживание» стеролов.
6. Фильтрование на холоду.
7. Отгонка метанола.
8. Растворение остатка неомыляемых веществ в хлороформе.
9. Отделение витамина А. Пропускание хлороформенного раствора через хроматографическую колонку из бентонита.
10. Доведение хлороформенного раствора до определенного объема.
11. Проведение реакции с треххлористой сурьмой и хлористым ацетилом.
12. Измерение интенсивности цветной реакции на электрофотоколориметре.

В качестве примера приведем описание опыта № 43 с жиром, полученным из внутренностей сазана (Волго-Каспийский район).

Навеска жира — 4,676 г.

Омыление производили в течение 45 минут при температуре 85—90°, 50 мл спиртового 0,5 N раствора КОН.

Все операции для получения неомыляемой фракции проводили по стандартной методике.

Неомыляемую фракцию растворили в 60 мл метанола, причем неомыляемые вещества растворялись в метаноле плохо. Для того, чтобы добиться полного растворения, раствор нагревали около 30 минут при температуре 40—50° (на водяной бане) с обратным холодильником, во избежание улетучивания метанола. Затем раствор помещали на 16 часов в холодильник при температуре минус 15°. Появился очень незначительный осадок, в виде легких хлопьев. Фильтрование осадка проводилось при той же температуре через складчатый бумажный фильтр¹, осадок два раза промывали охлажденным до той же температуры метанолом.

Из фильтрата отгоняли метиловый спирт, а остаток растворяли в 20 мл хлороформа.

Подготавливали хроматографическую колонку из подсушенного бентонита и смачивали 10 мл хлороформа. Раствор неомыляемых веществ в хлороформе пропускали через колонку и промывали 80 мл хлороформа.

Из фильтрата удаляли хлороформ (отгонкой) до объема 10 мл.

К 1 мл полученного хлороформенного раствора добавляли 5 мл SbCl₃ и три капли хлористого ацетила. Получалось желтовато-розовое окрашивание, интенсивность которого увеличивалась в течение некоторого времени. Через четыре минуты интенсивность окраски измеряли на электрофотоколориметре со светофильтром № 54. Нуль прибора устанавливали по раствору треххлористой сурьмы в хлороформе.

Из двух параллельных отсчетов брали среднее (если разница между отсчетами превышала 5, проводился третий опыт):

Отсчет 1-й	301	Среднее
	261	28

Показание электрофотоколориметра 28 по калибровочной кривой (рис. 2) соответствует 250 инт. ед. на 1 мл хлороформенного раствора.

¹ Фильтры и посуда примерно за один час до фильтрования помещали в холодильник, чтобы охладить их до нужной температуры.

Содержание витамина D₃ на 1 мл жира с учетом разбавления и навески можно рассчитать следующим образом:

$$x = \frac{250 \cdot 10}{4,676} = 535 \text{ инт. ед. на 1 мл жира.}$$

Согласно данным биологических опытов, содержание витамина D₃ в жире из внутренностей сазана равняется 300 инт. ед. на 1 мл жира.

Величина навесок жира во всех предыдущих опытах была слишком мала (4—5 г) для того, чтобы иметь возможность отделить и количественно учесть стеролы.

В последующих опытах брали большие навески и на основных этапах определения проводили взвешивания. Схема определения была усложнена дополнительным (вторичным) вымораживанием и вторичным хроматографированием для удаления стеролов.

Приводим описание опыта № 51.

В качестве объекта исследования был взят тресковый витаминизированный жир (полученный из жирового цеха Мосрыбокомбината). Содержание витамина D₂ равняется 200 инт. ед. на 1 г. Навеска — 10 г жира.

Омыление проводили 80 мл спиртового раствора КОН (15 г КОН на 100 мл 90%-ного спирта) в течение двух часов на водяной бане при температуре 80—85° с периодическим перемешиванием.

После омыления гидролизат разбавляли двойным объемом воды и неомыляемые вещества экстрагировали серным эфиром: два раза по 250 мл и один раз 200 мл, эфирные вытяжки четыре раза промывали дистиллированной водой (порциями, по 300 мл) до исчезновения щелочной реакции промывных вод на фенолфталеин.

К эфирному экстракту добавляли прокаленный сернистый натр. После фильтрования эфир отгоняли, неомыляемые вещества подсушивали до постоянного веса при температуре 40—50°. Вес неомыляемых веществ 0,497 г, что составляет 0,77% к весу жира.

Неомыляемые вещества растворяли в 350 мл метанола химически чистого при нагревании на водяной бане до температуры 40—50° в течение 30 минут, с обратным холодильником. Метаноловый раствор неомыляемых переносили в холодильник и хранили 48 часов при температуре минус 8°. За час до начала фильтрования в холодильник была поставлена посуда, фильтры и метанол для промывки.

Стерола выпали в очень небольшом количестве.

После отфильтрования осадок два-три раза промывали на фильтре охлажденным метанолом.

После отгонки метанола остался осадок неомыляемых веществ. Вес осадка после удаления стеролов 0,63 г. Удалено 0,08 г, что составляет около 10% к весу неомыляемых веществ.

Повидимому, температура в холодильнике не была достаточно низкой, и стеролы выпали в осадок неполностью.

Было проведено дополнительное, второе вымораживание. Остаток растворяли снова в 20 мл метанола и помещали на 10 часов в холодильник при температуре минус 10°.

Осадок отфильтровывали с последующим промыванием. Вес осадка — 0,62 г (лишь на 0,02 г отличается от осадка после первого вымораживания). Осадок растворяли в 50 мл хлороформа и пропускали через колонку, наполненную бентонитом, подсушенным в течение полтора часов при температуре 120°. Высота колонки 15 см. Образовалась яркая синяя зона с узкой фиолетовой полоской внизу (повидимому, омыление жира не прошло полностью).

При приливании 100 мл хлороформа синяя зона адсорбции витамина А расширилась и достигла почти основания колонки. Для повторного

Дигитонин в настоящее время нигде не производится, хотя исходным материалом для его получения является широко распространенная в СССР лекарственная трава красная наперстянка.

Выводы

1. Применение метода хроматографической адсорбции обеспечивает полное отделение витамина А, мешающего при химическом определении витамина D₃ в рыбьих жирах.

2. Лучшим из проверенных нами адсорбентов оказался бентонит оглантинского месторождения с размером частиц не более 1 мм, подсушенный перед анализом в течение 1 часа при температуре 120°.

3. В качестве растворителя рекомендуется применять чистый хлороформ.

4. Вымораживание стеролов не обеспечивает их полного удаления. Присутствие даже весьма малых количеств стеролов приводит к искажению результатов химического определения, давая значительно увеличенные цифры содержания витамина D₃ по сравнению с результатами биологических испытаний.

5. Предварительные опыты с осаждением стеролов, находящихся в рыбьих жирах, дигитонином показали, что в этом случае результаты химического определения витамина D₃ более близки к данным, получаемым при биологических испытаниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аронов Я. Г. и Гешелина Е. Н. О химическом определении витамина D в рыбьих жирах, «Витамины в теории и практике», Пищепромиздат, 1941.
2. Букин В. Н., Витамины, Пищепромиздат, 1941.
3. Вечер А. С., Цветная реакция при адсорбции на бентоните и способ определения витамина А, «Биохимия», т. 13, вып. 6, 1948.
4. Виндаус, Обзор работ по химии витамина D, «Успехи химии», т. 16, 1936, стр. 841.
5. Гудлет М. А., О химическом определении витамина D в рыбьих жирах, «Витамины в теории и практике», Пищепромиздат, 1941.
6. Кудряшов В. А., Биологические основы учения о витаминах, «Советская наука», 1948.
7. Цвет М. С., Хроматографический адсорбционный анализ (избранные работы), Изд. АН СССР, 1946.