

NEUE METHODE ZUR BESTIMMUNG VON VITAMIN D₃ IN PREMIXEN UND FUTTERMISCHUNGEN

Von

F. BÉKÉS, É. BERNDORFER-KRASZNER, R. LÁSZTITY, F. ÖRSI und I. DOBOS
Lehrstuhl für Biochemie und Lebensmitteltechnologie, Technische Universität, Budapest

(Eingegangen am 15. Juli 1976)

Allgemeine Fragen der Bestimmung des Vitamin-D₃-Gehalts von natürlichen Stoffen

Die Bestimmung des Vitamin-D₃-Gehalts in natürlichen Stoffen gehört zu den komplizierten analytischen Aufgaben. Die Analyse verursacht einerseits trennungstechnische Schwierigkeiten, während andererseits der selektive Nachweis von entsprechender Empfindlichkeit und die quantitative Detektierung infolge der in den natürlichen Stoffen vorliegenden Mengenverhältnissen Probleme verursachen.

Die D-Provitamine (Ergosterin, 7-Dehydrocholesterin) bzw. jene Intermediäre, die sich im Laufe des Metabolismus der Stoffe von Vitamin-Charakter bilden (z. B. Lumisterin, Tachisterin) unterscheiden sich so wenig von den vitaminartigen Verbindungen, daß die Bestimmung des Vitamingehaltes nur nach Entfernung dieser Stoffe möglich ist. Dasselbe gilt auch für die Produkte, die auf Einwirkung von Strahlung aus D-Vitaminen gebildet werden und von denen ein Teil toxisch ist.

Ein ernstes Problem bildet ferner die Tatsache, daß Vitamin A und seine Provitamine in gewissen natürlichen Stoffen, ferner in synthetisch zusammengestellten Premixen und Nährstoffen in um mehrere Größenordnungen höherer Konzentration vorliegen als die D-Vitamine. Da Vitamin A und seine Provitamine mit den herkömmlichen D-Vitamin-Reagenzien ebenfalls reagieren, ist ihre Trennung vor der quantitativen Bestimmung unerlässlich.

Bei der Bestimmung der D-Vitamine muß die starke Sauerstoff-, Licht- und Wärmeempfindlichkeit der Substanz beachtet werden; jede Operation muß bei niedriger Temperatur, von Licht und möglicherweise von Luft verschlossen (Stickstoffatmosphäre) vorgenommen werden.

Kritischer Vergleich der Vitamin-D-Bestimmungen

Laut Obengesagtem kann festgestellt werden, daß — mit Ausnahme gewisser reiner Vitaminpräparate (z. B. pharmazeutischer Präparate) — der Vitamin-D-Bestimmung irgendeine vorbereitende Trennungsserie vorausgehen muß. Die Zahl und Art dieser Vorgehen und die verwendeten Parameter werden durch die jeweilige Aufgabe bestimmt, eine allgemeine Rezeptur

kann nicht gegeben werden. Als Prinzip kann festgestellt werden, daß man nach Extraktion des Lipidgehalts der Probe und Verseifung durch die feinere Trennung des unverseifbaren Teils zu der an Vitamin D reichen, reinen Substanz gelangt. Abb. 1 zeigt das allgemeine Schema der Vitamin-D₃-Bestimmung, wobei auch die möglichen Varianten der Trennverfahren bzw. der quantitativen Bestimmung angeführt sind.

ALLGEMEINES SCHEMA DER BESTIMMUNG
VON VITAMIN - D₃

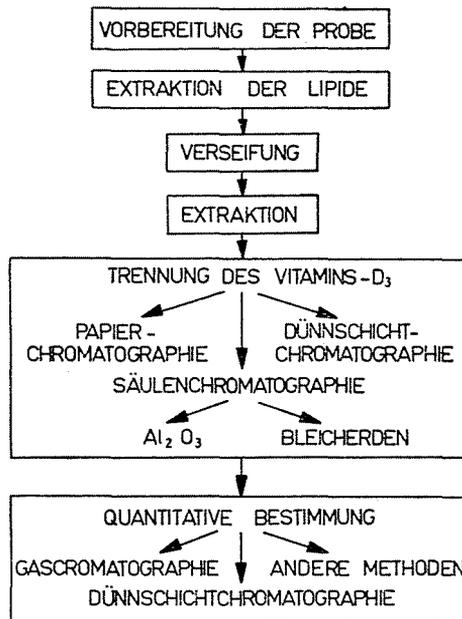


Abb. 1

Durch die *Lipid-Extraktion* vor der Verseifung kann vermieden werden, daß jene Verunreinigungen in die Probe gelangen, welche sich im Laufe der Zersetzung der Bestandteile von Nicht-Lipidcharakter mit starker Lauge bilden würden.

Der Vitamin D₃-Gehalt der mit alkoholhaltiger Kalilauge *verseiften* Probe befindet sich in der wäßrigen — unverseiften — Phase, aus der das Vitamin durch *Extraktion mit Äther* gewonnen werden kann. Verseifung ist eine der heikelsten Arbeitsvorgängen der Vitamin-D-Bestimmung; wegen der Sauerstoff-Empfindlichkeit des Stoffes können bei ungeeigneter Wahl der Parameter große Verluste auftreten. Die Verseifung wird zweckmäßigerweise in Stickstoffstrom vorgenommen. Mehrere Publikationen berichten über die Verwendung verschiedener Antioxidanten [1—3].

Zur Trennung des Vitamin-D-Gehaltes der durch Extraktion mit Äther gewonnenen Probe werden im allgemeinen chromatographische Methoden verwendet.

Säulenchromatographische Methoden, die viel Zeit und einen hohen Aufwand an Reagenzien erfordern, werden vor allem zur Vorreinigung von Vitamin D verwendet. Als Säulenfüllung werden meistens Aluminiumoxid [4—7], oder verschiedene Bleicherden, wie Bentonit, Frankonit, Floridan usw. [8, 9] verwendet. Die Verwendung von Aluminiumoxid gestattet bloß die Trennung der Ester von Vitamin A, wobei der überwiegende Teil des Vitamin-A-Gehalts der Proben im Laufe der Verseifung in die Alkoholform umgesetzt wird. Bei Verwendung von Bleicherden ergeben sich wegen der undefinierten Art der Bindeaktivität der Säule Probleme: bei kleiner Aktivität können Verunreinigungen in der Probe bleiben, während bei zu hoher Aktivität ein Teil des D-Vitamins unelulierbar ist.

Mit *papierchromatographischen Methoden*, die heute bereits als veraltet zu betrachten sind, können nur qualitative Nachweise vorgenommen werden [10].

Die Isolierung und Bestimmung der D-Vitamine mittels *dünnschichtchromatographischer Methoden* wurde für zahlreiche Stoffe ausgearbeitet. Es wird eine Aluminiumoxid-Schicht [8, 11], oder eine Silikagel-Schicht [12—17] verwendet. Der Nachweis und die quantitative Bestimmung des D-Vitamins erfolgen mittels verschiedener Modifikationen der Brochman-Chenschen photometrischen Methoden unter Verwendung von Antimonchlorid als Reagens, durch die direkte Auswertung des Chromatogram-Fleckes oder durch Photometrieren aus dem ausgekratzen Fleck. Wirksamer als das Antimon-(III)-trichlorid-Reagens kann zur Entscheidung der Reinheit des D₃-Vitaminflecks eine spektrophotometrische Methode im ultravioletten Spektralbereich [18—20] verwendet werden. Nachteil der letzteren Methode ist ihre kleinere Empfindlichkeit, ferner müssen die Verunreinigungen der als Träger verwendeten Adsorbenten, sowie die D₃-Verluste in Betracht gezogen werden, die nach der Verdampfung des Lösungsmittels durch die Berührung des trockenen Adsorbents mit Luft und Licht auftreten. Über die D₃-Vitaminbestimmungen mittels UV Detektierung gibt Černý [18] eine gute Zusammenfassung, in der die Ursachen und Größe der im Laufe der Bestimmung auftretenden Verluste eingehend untersucht werden.

Die *gaschromatographische Methode* fand in der letzteren Zeit eine verbreitete Anwendung [1, 3, 21, 22, 23]. Die entsprechende Vorbereitung der Probe bildet auch hier ein Problem, da die Entfernung der Verunreinigungen und die quantitative Bestimmung auch bei der Anwendung von Gaschromatographie nicht in einem Schritt gelöst werden können. Zur Bestimmung des D₃-Vitamin Gehalts der vorgereinigten Probe ist heutzutage GLC die genaueste verwendbare Methode. Die Auswertung der Bestimmung wird dadurch

erschwert, daß im Laufe der bei relativ hoher Temperatur durchgeführten Analyse (über 220 °C) Pyro-Derivate gebildet werden. Die meisten Forscher arbeiten im Interesse einer besseren Trennung mit vorangehend silylierten Proben.

Zielsetzungen der Forschung

Die den Gegenstand der vorliegenden Mitteilung bildende Forschungsarbeit bildet einen Teil der an unserem Lehrstuhl über die Biochemie und die biologische Auswertung von Futtermitteln und Premixen unternommenen Arbeit. Das Hauptziel war die Ausarbeitung einer verhältnismäßig einfachen und verlässlichen Methode, die zur Bestimmung des D₃-Vitamin Gehaltes von heimischen Futtermischungen und Premixen geeignet ist.

Materialien und Methoden

Unter Berücksichtigung der oben angeführten Probleme wurde nach langen Voruntersuchungen eine auf zweidimensionaler dünn-schichtchromatographischer Trennung beruhende Methode ausgearbeitet, die zur Bestimmung des D₃-Vitamin Gehaltes von Premixen und Futtermischungen als geeignet gefunden wurde. Das Schema des von uns entwickelten Verfahrens ist aus Abb. 2 ersichtlich.

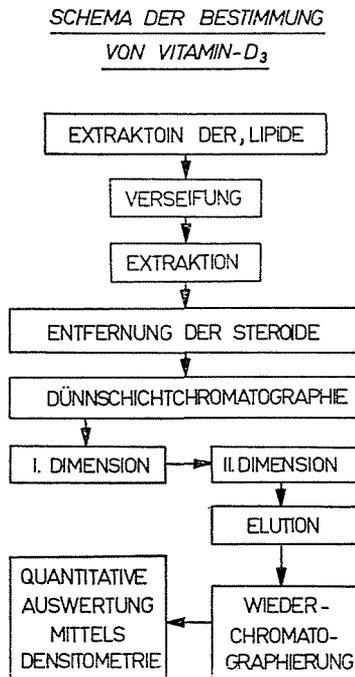


Abb. 2

Die Bestimmung von Vitamin D₃ in Premixen

Verseifung. 20 g festes NaOH werden in einem 500-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, sodann mit 10 ml destilliertem Wasser und 140 ml abs. Alkohol versetzt und in diesem Gemisch unter Schütteln und Erwärmung rückstandslos aufgelöst. Dieser Lösung wird die bereits vorangehend eingewogene Testsubstanz (5 g) zugesetzt und mit Rückflußkühler in einem siedenden Wasserbad 15 Minuten lang verseift. Nach Zugabe von 25 ml destilliertem Wasser wird der Inhalt des Kolbens schnell abgekühlt und in einen 500-ml-Scheidetrichter gefüllt.

Extraktion. 60 ml einer 1:1 Äther:Petroläther-Mischung werden der Substanz im Scheidetrichter zugesetzt. Das Schütteln wird vorsichtig, durch schwaches Rütteln (etwa 2 Minuten) vorgenommen, dann wird der Trichter 10 Minuten lang (bis zur Trennung der Phasen) stehen gelassen. Die untere wäßrige Phase wird in einen Becher abgelassen, die organischen Phasen werden in einem anderen 500-ml-Scheidetrichter gesammelt, in welchen vorangehend etwa 200 ml destilliertes Wasser geschüttet wurden.

Die Extraktion wird mit weiteren 4 × 50 ml Äther-Petroläther Portionen wiederholt und die organischen Phasen im zweiten Scheidetrichter gesammelt. Nach der letzten Ausschüttelung wird die wäßrige Phase weggeschüttet. Die gesammelte Äther:Petroläther-Phase wird durch behutsames Schütteln (Neigung zur Emulsionsbildung) mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Die erhaltene reine Lösung wird mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, sodann das Lösungsmittel abdestilliert, so daß das Endvolumen des Destillationsrückstandes etwa 5—10 ml betrage. Dieser Rückstand wird einer Kristallisierschale behutsam, von Licht geschützt, in einem Vakuumtrockenschrank bis zur Trockne eingedampft.

Entfernung der Steroide. Die getrocknete Probe wird in 2 ml Methanol aufgenommen und mit einer Lösung von 0,4 g Digitonin in 10 ml eines 9:1 Methanol:Wasser-Gemisches versetzt. Die Probe wird mit einer Alufolie abgedeckt über Nacht in einem Tiefkühler gestellt, wobei der überwiegende Teil der Steroide ausgefällt wird und mittels Filtrieren entfernt werden kann. Filtrieren wird zweckmäßigerweise schnell, mit vorgekühlten Geräten vorgenommen, denn bei Zimmertemperatur wird das Präzipitat wieder schnell aufgelöst. Die erhaltene gelbliche, bei richtig ausgeführter Filtrierung glasklare Lösung wird *sehr vorsichtig* (kalte Ventillation) bis zu 1.0 ml eingedampft.

Dünnschichtchromatographische Trennung. Der D₃-Vitamingehalt der Premixe wird von den zahlreichen anderen Bestandteilen mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie getrennt.

An einer Platte mit Kieselgel GF₂₅₄ (Merck)-Schicht wird der Startpunkt in der unteren linken Ecke der Platte je 20 mm von den beiden Enden eingezeichnet. Die Frontdistanzen, die sich in beiden Richtungen in 160 mm

Entfernung von dem Startpunkt befinden, werden ebenfalls eingezeichnet. Zwei chromatographische Tanks von möglicherweise gleicher Dimension werden vorbereitet. In den Tanks werden zwecks Sättigung des Luftraumes Filterpapierstreifen eingesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Laufmittel ist wie folgt:

In Richtung I: Äther:Petroläther (30:40)

In Richtung II: Chloroform:Aceton (90:10)

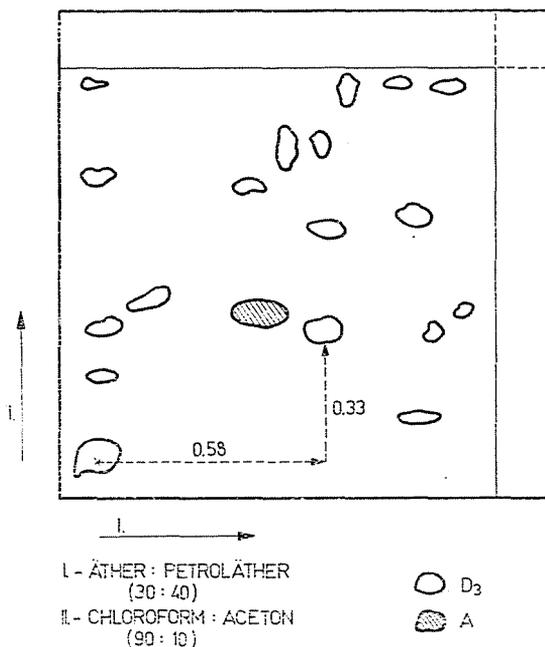


Abb. 3

100 μ l der laut Obigem vorbereiteten Probe wird mit einer Hamiltonspritze in dem Startpunkt aufgetragen.

Die Platte wird dann in den Laufmittel I enthaltenden Tank eingesetzt und das Chromatogramm bis zur Erreichung der eingezeichneten Frontdistanz entwickelt (Laufzeit etwa 1 Stunde). Die Platte wird dann herausgenommen und die letzten Reste des Laufmittels werden durch kalte Ventilation entfernt. Da sich Vitamin D₃ an der Platte leicht zersetzt, wird die Platte *sofort*, in senkrechter Richtung zu der ersten Entwicklung, in den Tank II eingesetzt und das Chromatogramm analog mit dem ersten Lauf entwickelt. Die Laufzeit beträgt etwa 45 Minuten.

Die Platte wird aus dem Tank herausgenommen und an der noch feuchten Platte wird der Fleck von Vitamin D₃ unter einer UV Lampe gesucht:

der Fleck von Vitamin D₃ ist unter den gegebenen Umständen dunkelbraun. (Rf₁: 0,58; Rr₁₁: 0,33.)

Der Fleck wird mit einer Nadel eingegrenzt, sodann behutsam ausgekretzt und das Vitamin D₃ wird an einem Mikro-Glasfilter mit 2 ml Methanol, unter wiederholtem Schütteln von dem Absorbenten abgelöst. Das Filter wird mit weiterem 1 ml Methanol gewaschen. Die erhaltene Lösung wird vorsichtig, von Licht geschützt, mittels kalter Ventilation auf 1 ml eingedampft.

Wiederchromatographie an Dünnschicht und quantitative Auswertung mittels Densitometrie. 0,5 ml der laut oben beschriebener Methode erhaltenen

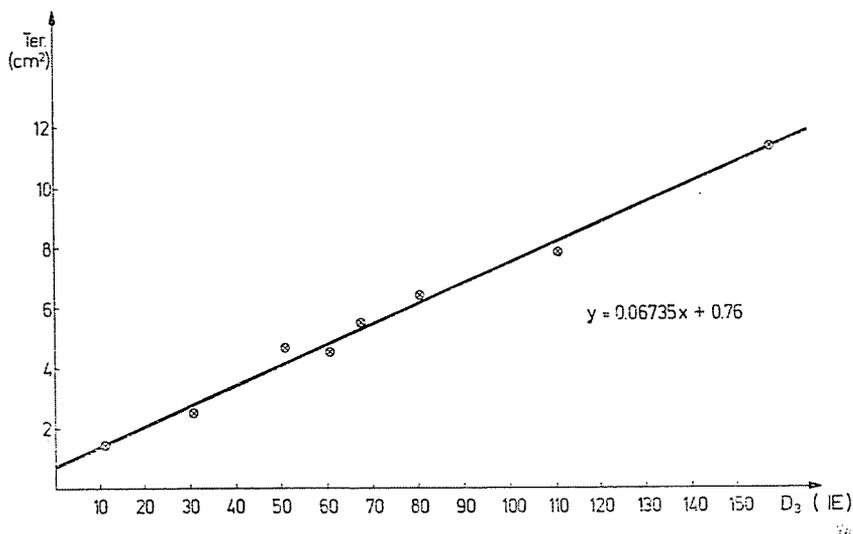


Abb. 4

Lösung werden an einer Kieselgel GF₂₅₄ Platte (Merck) neben einem Standard chromatographiert und mit einer 2%igen Molybdänsäurelösung in Äthanol entwickelt. Nach einer Erwärmung von etwa 15 Minuten erscheint der Fleck des Vitamins D₃ auf gelblicher Grundfarbe in blaulich-lila Farbe. Die Intensität der Flecke wird mit einem Densitometer Typ »Vitatron« an einem Filter U5 gemessen, sodann werden die Flächen unter den Kurven nach Planimetrieung mit Hilfe der angeführten Kalibrationskurve ausgewertet.

Das Zwanzigfache des von der Kalibrationskurve abgelesenen Wertes gibt in IU ausgedrückt den auf 1 kg des Premixes bezogenen Vitamin D₃-Gehalt. (Die Kalibrationskurve wurde mit einer zehnfachen Verdünnung [1000 IE = 25 µg D₃] der im vorangehenden angegebenen Standardlösung aufgenommen.)

Bestimmung von Vitamin D₃ in Futtermischungen

Im folgenden werden nur jene Schritte diskutiert, die von der Bestimmung von Vitamin D₃ in Premixen abweichen. In der Bestimmung von Vitamin D₃ in Futtermischungen geht der Verseifung die Extraktion der Lipide voran. Je 100 g Futtermittel werden in Soxhlet-Extraktionshülsen eingewogen (im allgemeinen 3—4 Stück!) und in einem Soxhlet-Apparat mit Äther extrahiert. Wenn das in den Siederaum zurückgesaugte Lösungsmittel schon ganz farblos ist (3—4 Stunden), werden die Hülsen entfernt und das Extrakt bei fortdauernder Erwärmung eingedampft, so daß das Volumen der gesammelten Äther-Extrakte etwa 20 ml betrage. (Wenn die Lösung zu stark eingedampft wird, kann sich bei der Verseifung ein grünlicher Schleim ausscheiden.)

Die Verseifung, die Präzipitation der Steroide mit Digitonin, sowie die dünnschichtchromatographische Trennung werden in derselben Weise wie bei der Premix-Untersuchung vorgenommen, mit dem einzigen Unterschied, daß der von der Platte abgekratzte Fleck mit weniger Methanol eluiert und statt 1 ml auf 200 µl eingedampft wird, sodann diese ganze Menge für die quantitative Bestimmung aufgetragen wird.

Der D₃-Vitamingehalt der Futtermischung wird mit der folgenden Formel berechnet:

$$D_3(\text{IE/kg}) = 100 \cdot K/0,85,$$

wobei: D₃ = Vitamingehalt des Futtermittels (IE/kg)

K = der von der Kalibrationskurve abgelesene Wert ist.

(Der Faktor 0,85 wurde aufgrund der Resultate jener Versuche bestimmt, in denen nach der Chromatographierung und Elution von bekannten Mengen von Standard-Vitaminproben der Rückgewinnungsindex untersucht wurde.)

Ergebnisse

Untenfolgend werden, zwecks Illustration, die Ergebnisse einiger, mit der beschriebenen Methode vorgenommener D₃-Vitaminbestimmungen angegeben.

Tabelle 1
D₃-Vitamingehalt der einzelnen Premixe

Bezeichnung der Probe	Vitamin-D ₃ -Gehalt IE/ g		
	Durchschnitt*	Minimum	Maximum
Vitamin-Premix I	319	298	336
Vitamin-Premix VIII	349	331	372
Vitamin-Premix XV	492	479	500

* Durchschnitt von 5 Messungen

Tabelle 2

D₃-Vitamingehalt der einzelnen Futtermischungen

Bezeichnung der Probe	Vitamin-D ₃ -Gehalt IE/1000 g		
	Durchschnitt*	Minimum	Maximum
Geflügelfutter	1760	1392	1856
Truthahn-Aufzuchtfutter	1280	1148	1403
Saufutter	3120	2980	3440
Ferkelfutter (II)	2940	2480	3670
Truthahn-Endfutter	1545	1370	1800

* Durchschnitt von 3 Messungen

Tabelle 3

Bestimmung des Vitamin D₃-Gehalts von Premixen und Futtermischungen
(Kontrolluntersuchungen)

Probe	Einwaage					Durchschnitt IE/g
	1	2	3	4	5	
Premix I	350	352	348	350	366	351
	340	350	352	340	360	
	345	358	350	345	355	
Premix VIII	380	382	370	393	387	386
	385	380	375	380	391	
	395	380	385	382	395	
Premix XV	560	570	570	580	568	570
	572	568	570	572	570	
	568	575	572	570	565	
Saufutter	3,268	2,918	3,502			3,185
	3,230	3,105	2,918			
	3,502	3,268	2,958			
Ferkelfutter II	2,077	2,255	2,967			2,650
	2,789	2,611	2,967			
	2,967	2,611	2,611			

Zur Kontrolle der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der ausgearbeiteten Methode wurden durch Kollegen, die an der Ausarbeitung der Methode nicht teilnahmen, Kontrolluntersuchungen durchgeführt, deren Resultate, sowie die charakteristischen Daten der Verteilungen in Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt sind.

Tabelle 4
Charakterisierung der Verteilung von Vitamin D₃

Probe	Durchschnitt	Fehler %
Premix I	326 ± 78	24
Premix VIII	362 ± 16	4,4
Premix XV	523 ± 45	8,7
Geflügel-Anlaßfutter	1766 ± 468	26,5
Truthahn-Aufzuchtfutter	1316 ± 477	36,2
Saufutter	3170 ± 313	9,87
Ferkelfutter II	2829 ± 508	20,0
Truthahn-Endfutter	1508 ± 508	33,8

Zur Bestimmung des Zufallsfehlers der ausgearbeiteten Methode wurde ein Versuchsplan verwendet, auf Grund dessen mittels Varianzanalyse folgendes ermittelt werden konnte:

- Es konnte festgestellt werden, daß die Resultate der durch verschiedene Personen durchgeführten Kontrolluntersuchungen übereinstimmen;
- die aus der ungleichmäßigen Verteilung der zu bestimmenden Komponenten, ferner aus der Isolierungs- und Extraktionsweise stammenden Fehler wurden von dem Fehler der Bestimmungsmethode getrennt;
- der Fehler konnte als die Standardabweichung des Resultates erhalten werden.

Die Standardabweichungen der Vitamin-D₃-Bestimmung sind in Tabelle 5 enthalten, während die Resultate der durch verschiedene Personen durchgeführten Untersuchungen in Tabelle 6 zusammengefaßt sind.

Tabelle 5
Streuungen der Bestimmung von Vitamin D₃

Probe	Freiheits- grad	Relative Streuung der Bestimmung	Relative Streuung der Einwaage	Relative Streuung der totalen Messung
Premix I	20	28,2	∅	28,2
Premix VIII	24	4,6	1,8	5,1
Premix XV	24	12,7	∅	12,7
Geflügel-Anlaßfutter	15	28,3	8,4	29,6
Trn্থahn-Aufzuchtfutter	15	17,4	15,7	23,4
Saufutter	21	9,1	6,4	11,2
Ferkelfutter II	15	12,9	16,0	20,6
Truthahn-Endfutter	9	9,7	17,4	20,0

Tabelle 6

Resultate der Kontrolluntersuchungen von Vitamin D₃
in IE/g (Premix) bzw. IE/kg (Futter)

Probe	Prüferperson No. 1	Prüferperson No. 2	Prüferperson No. 3	Abweichung
Premix I	301 ± 110	351 ± 26	—	50
Premix VIII	349 ± 26	386 ± 28	334 ± 30	1—2 37 1—3 15 2—3 52
Premix XV	492 ± 78	483 ± 78	530 ± 78	1—2 9 1—3 78 2—3 88
Saufutter	3172 ± 536	3185 ± 540	3153 ± 538	1—2 13 1—3 19 2—3 32
Ferkelfutter II	2962 ± 906	2651 ± 688	—	311

Wie aus den Daten der obigen Tabellen ersichtlich, ist die Standardabweichung im Falle der Premixe 5—30%, im Falle der Futtermischungen 10—30%, was mit den in der Literatur beschriebenen Bestimmungen verglichen, als ein gutes Ergebnis bezeichnet werden kann. Betreffs der Inhomogenität der Proben kann festgestellt werden, daß diese im Falle von Futtermischungen bedeutend ist.

Einige Bemerkungen über die Verwendbarkeit und mögliche Weiterentwicklung der Methode

Die von uns entwickelte Methode zur Bestimmung von Vitamin D₃ ist im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen anderen Methoden eine von entsprechender Genauigkeit, die zur Untersuchung von Premixen und Futtermischungen eine entsprechende Empfindlichkeit besitzt. (Empfindlichkeit = 5 IE, d. h. 0,125 µg Vitamin D₃.) Als ein großer Vorteil ist die relativ einfache Ausführung und Schnelligkeit der Methode zu betrachten. Auf Grund von Tabelle 6 weist jedoch jene Tatsache, daß zwischen verschiedenen Untersuchern wesentliche Meßunterschiede vorkamen, darauf hin, daß zur Erzielung von verlässlichen Resultaten die Methode gründlich eingeübt werden muß.

Unten folgend sollen einige Bemerkungen über die Vorteile, die Verwendbarkeit und die mögliche Entwicklung der Methode gemacht werden:

1. Die der tatsächlichen D_3 -Vitaminbestimmung vorangehende Lipidextraktion hat zahlreiche Vorteile:

— Die störende Wirkung vieler Verunreinigungen wird dadurch eliminiert, daß man im Laufe der Verseifung nur die fettartigen Stoffe mit der Lauge in Kontakt bringt.

— Obzwar die eingeschaltete Lipidextraktion eine Zeit beanspruchende Operation ist, bleibt das Filtrieren nach der Verseifung weg, was sonst in vielen Fällen mehrere Stunden beansprucht.

— Aliquote Teile der Äther-Extraktion können auch zu anderen Untersuchungen verwendet werden (z. B. zur Bestimmung von essentieller Fettsäure).

— Laut unserer Untersuchungen mit bekannten Mengen von Vitamin- D_3 -Standard führt die Einschaltung der Lipidextraktion zu einer besseren Ausbeute und zu geringerer Streuung zwischen den parallelen Untersuchungen.

2. Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ist eine sehr empfindliche Methode, die für die einzelnen Stoffe erhaltenen R_f -Koordinatenwerte sind streng abhängig von zahlreichen Parametern. Bei der Einstellung der Analyse bzw. bei irgendeiner Änderung (z. B. Bereitung von frischem Laufmittel) ist es deshalb empfohlen, den R_f -Wert mit dem Standard zu kontrollieren.

Wir machen darauf aufmerksam, daß selbst bei Verwendung eines Vitamin- D_3 -Standards der R_f -Wert des D_3 -Vitamins der Testsubstanz um 5—8% von den meßbaren R_f -Werten abweichen kann, da bei der Chromatographierung der Probe die Wanderung der anderen Substanzen die Bewegung des D_3 -Vitamins beeinflussen kann. In solchen Fällen ist es deshalb ratsam, eine bekannte Menge von D_3 -Standard der Probe als inneren Standard zuzusetzen.

3. Es soll schließlich bemerkt werden, daß die der zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Trennung folgende D_3 -Vitaminbestimmung, in Abhängigkeit von der Ausrüstung des Laboratoriums, in dem diese ausgeführt werden soll, in mehreren Beziehungen weiterentwickelt bzw. modifiziert werden kann.

In Laboratorien, welche über einen Gaschromatograph von entsprechender Empfindlichkeit verfügen, kann die quantitative Auswertung mittels gaschromatographischer Analyse bei hoher Genauigkeit durchgeführt werden. In Laboratorien, die mit einem Lichtreflexion detektierenden Densitometer ausgestattet sind, kann mit gutem Erfolg Dünnschichtchromatographie mit verkehrter Phase verwendet werden. Ihr Vorteil ist, daß sie vom Gesichtspunkt der Trennung als eine Chromatographie in dritter Dimension aufgefaßt werden kann, so daß sie auch für die Entfernung der eventuell noch in der Probe vorhandenen Verunreinigung geeignet ist.

Zusammenfassung

Die quantitative Bestimmung des Vitamins D₃ wird durch mehrere Probleme erschwert, so vor allem dadurch, daß es in natürlichen Stoffen im allgemeinen in sehr kleinen Mengen und meistens in Gegenwart von großen Mengen von Vitamin A vorkommt. Die Bestimmung wird auch dadurch erschwert, daß die Substanz schwer von Stoffen ähnlicher Struktur (Provitamine) zu trennen ist, so daß es ziemlich schwer ist, für Vitamin D₃ ein spezifisches Reagens zu finden. Die Ungewißheit wird durch die starke Sauerstoff-, Licht- und Wärmeempfindlichkeit von Vitamin D₃ noch gesteigert, da dies in den Vorbereitungsverfahren bedeutende Verluste verursachen kann.

Die Autoren entwickelten ein zweidimensionales, dünn-schichtchromatographisches Verfahren, mit dessen Hilfe Vitamin D₃ in Premixen und Futtermischungen qualitativ und quantitativ bestimmt werden kann. Die Methode ermöglicht die Bestimmung von 5 IE = 0.128 Mikrogramm-Mengen D₃. Die entwickelte Methode wird am Beispiel der Untersuchung von 3 Premixen und 5 Futtermischungen beschrieben.

Literatur

1. FRITZ, J. C.—ROBERTS, T.: J. AOAC. **51**, 592 (1969).
2. MURRAY, T. K.—ERDŐDY, D.—PANALAKS, T.: J. AOAC. **51**, 840 (1968).
3. ERDŐDY, P.—MURRAY, T. K.: J. of AOAC. **53**, 304 (1970).
4. BROCKMAN, H.: Z. physiol. Chem. **241**, 129 (1936).
5. EWING, D. T.—SCHLACHBACH, T. D.—POWELL, M. J.—VAITIKUS, J. W.—BIRD, D. F.: Anal. Chem. **26** (1954).
6. BARRA, R. K.—RAO, M. V. K.: Analyst. **89**, 534 (1963).
7. BARRA, R. K.—RAO, M. V. K.: Analyst **90**, 571 (1965).
8. NORMAN, A. W.—DELUCA, H. F.: Anal. Chem. **35**, 1247 (1963).
9. VEDA, F.—TERUO, M.—KAZAMA, A.—WATANABE, K.: J. Vitaminol., **17**, 142 (1971).
10. PEERBOOM, J. W. C.—ROOS, J. B.—BECKES, H. W.: J. Chromat. **5**, 500 (1961).
11. DAVIDEK, J.—BLATTNA, K.: J. Chromat. **7**, 204 (1962).
12. CHEN, P. S.: Anal. Chem. **37**, 301 (1965).
13. LUDWIG, E.—FREIMUTH, V.: Die Nahrung **8**, 563 (1964).
14. HEYSMAN, L. T.—SAWYER, E. R.: Analyst **89**, 529 (1968).
15. SPANYÁR, P.—BLAZOVICH, M.—GÁBOR, I.: Élelmiszervizsg. Közl. **13**, 77 (1967).
16. SPANYÁR, P.—BLAZOVICH, M.—GÁBOR, I.: Élelmiszervizsg. Közl. **13**, 130 (1967).
17. SPANYÁR, P.—BLAZOVICH, M.—GÁBOR, I.: Élelmiszervizsg. Közl. **14**, 94 (1968).
18. ČERNÝ, J.: Česk. Pharm. **20**, 103 (1971).
19. STANLEY, W. Z.—VAUSIER, S. H.—GENTISSI, B.: J. AOAC **40**, 281 (1957).
20. BROWN, T. I.—BENJAMIN, J.: Anal. Chem. **36**, 446 (1964).
21. KOBAYASHI, I.—YASUMURA, M.: J. Vitaminol. **18**, 78 (1972).
22. VEDA, F.—TEROU, M.—KAZAMA, A.—WATANABE, K.: Vitamins (Japan) **44**, 31 (1971).
23. TOUW, H. D. M.—KRÖSE, B. M. C.—MOLENAAR, H. M.: J. AOAC **55**, 622 (1972).

Ferenc BÉKÉS

Dr. Éva BERNDORFER KRASZNER

Prof. Dr. Radomir LÁSZTITY

Dr. Ferenc ÖRSI

Iréń DOBOS

H-1521 Budapest