

CHROM. 8536

BESTIMMUNG VON VITAMIN D₃ UND SEINEN FOTOISOMEREN IN D₃-HARZEN SOWIE IN MISCHUNGEN MIT VITAMIN A-ACETAT

HELMUT STEUERLE

BASF-Aktiengesellschaft, Untersuchungslaboratorium, 67 Ludwigshafen (B.R.D.)

Eingegangen am 28. April 1975)

SUMMARY

Determination of vitamin D₃ and its isomers in D₃ resins and in mixtures with vitamin A acetate

Vitamin D₃ and its isomers, prepared from 7-dehydrocholesterol by photochemical reaction, can be separated and quantitatively determined by high-pressure liquid chromatography on aluminium oxide using chloroform as the eluting agent. The determination of small amounts of vitamin D₃ in an excess of vitamin A acetate can be achieved by the same method.

EINLEITUNG

Vitamin D₃ (Cholecalciferol) (I) wird technisch durch Bestrahlen von 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D₃) (II) mit kurzwelligem UV-Licht hergestellt. Dabei entstehen je nach Temperatur und Bestrahlungsbedingungen ausser Vitamin D₃ eine Reihe von isomeren Nebenprodukten, deren Struktur weitgehend aufgeklärt ist (Tabelle I).

Ein neueres Schema der bei der Bestrahlung auftretenden Isomerisierungsvorgänge ist bei Lit. 1 beschrieben.

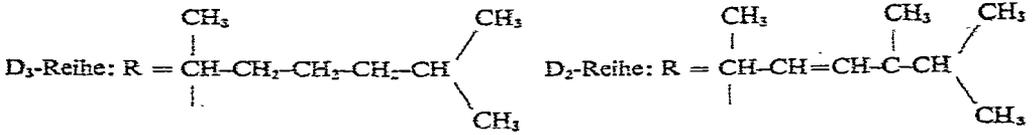
Für die Analyse von derartig komplex zusammengesetzten Gemischen ist im allgemeinen eine chromatographische Trennung erforderlich. Zwar kann unter bestimmten Voraussetzungen Vitamin D₃ und Prävitamin D₃ nach Maskierung des Tachysterins mit Maleinsäureanhydrid colorimetrisch mit Hilfe des Nield-Reagenzes (COCl₂) bestimmt werden², doch erhält man dabei keine Information über die Menge des restlichen Ausgangsmaterials und der mitentstandenen Fotoisomeren.

Für die Trennung der Isomeren wurden die Dünnschichtchromatographie (z. B. Lit. 3-6), die klassische Säulenchromatographie⁶⁻¹¹ und die Gaschromatographie¹² eingesetzt. Für die Bestimmung von Vitamin D₃ neben Vitamin A (bzw. seinen Estern) wurde in neuerer Zeit die Hochdruck-Flüssigchromatographie herangezogen^{13,14}.

Vitamin D₃ und seine Fotoisomeren verändern sich an der Luft, am Licht und in der Wärme. Besonders Tachysterin ist sehr oxydationsempfindlich und geht an der

TABELLE I

STRUKTURFORMELN VON VITAMIN D UND SEINEN ISOMEREN



Nummer	Struktur	Name
I		Vitamin D
II		Provitamin D (7-Dehydrocholesterin bzw. Ergosterin)
III		Tachysterin
IV		Lumisterin
V		Prävitamin D

TABELLE I (Fortsetzung)

Nummer	Struktur	Name
VI		Pyrocalciferol
VII		Isopyrocalciferol
VIII	$C_{23}H_{44}O$ Konst. unbekannt	Suprasterol I
VIII		Suprasterol II
VIII	unbekannt	Suprasterol III
IX	unbekannt	Toxisterole A und B
X		Photopyrocalciferol
X'		Photoisopyrocalciferol

Läuft in höhermolekulare sauerstoffreiche Produkte über. Ähnliches gilt in weniger starkem Masse für Prävitamin D₃ (Lit. 1, S. 143). Wegen dieser Empfindlichkeit der zu trennenden Substanzen sind die Dünnschicht- und die Gaschromatographie von vornherein nicht optimal. Am wenigsten sind diese Verbindungen bei der schnellen Hochdruck-Flüssigchromatographie gefährdet.

Bei Verwendung des in kommerziellen Chromatographen üblichen UV-

Photometerdetektors entfällt die für Vitamin D₃ relativ spezifische aber schwer beherrschbare Farbreaktion mit dem Nield'schen Reagenz, die bei den meisten Flüssigchromatographiemethoden zur Endbestimmung von D₃ verwendet wird. Das Maximum der UV-Absorption von Vitamin D₃ liegt bei 267 nm. Wird diese Wellenlänge am Detektor eingestellt, so absorbieren noch stark die Verbindungen II-VII und IX A. VIII absorbiert nicht und tritt daher im Chromatogramm nicht auf. Die in ihrer Konstitution nicht genau bekannten Toxisterole IX A und B kommen selbst bei starker Überbelichtung nur in sehr geringer Menge (~0.1%) vor, so dass sie hier ausser Betracht bleiben können.

EXPERIMENTELLES UND ERGEBNISSE

Zur quantitativen Analyse von Vitamin D₃ durch Hochdruck-Flüssigchromatographie ist eine gute Abtrennung von den Fotoisomeren erforderlich. Besonders die vollständige Trennung von Tachysterin, die bei der Dünnschichtchromatographie meistens nicht gelingt, ist hier ein Kriterium für die Brauchbarkeit des Systems. Wir erhielten die besten Trennungen an Aluminiumoxid mit äthanolfreiem Chloroform als Elutionsmittel (siehe Fig. 1).

Für die Zuordnung der Peaks zu den einzelnen Isomeren standen folgende Substanzen zur Verfügung: Vitamin D₃ rein (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.), 7-Dehydrocholesterin (Merck), Lumisterin₂ (Roth, Karlsruhe, B.R.D.), Prävitamin D₃ (Gleichgewichtsgemisch aus 80% D₃ und 20% Prävitamin D₃ aus D₃ in Tetrachlorkohlenstoff in 2 h bei 77° erhalten) und Pyrocalciferol₂ (durch Erhitzen von D₃ 18 h auf 180° im Einschmelzrohr unter Stickstoff als Hauptkomponente erhalten).

Die Peaks von II, IV und V auf dem Chromatogramm wurden durch Zusätze, der Peak von Tachysterin wurde durch UV-Spektroskopie der entsprechenden Eluatfraktion im Mikromassstab identifiziert.

Das gleiche Chromatographiesystem wie für die Bestrahlungsprodukte kann für die Bestimmung von Vitamin D₃ neben viel Vitamin A-Acetat verwendet werden. Dabei kann das Verhältnis der beiden Vitamine bis etwa 1:100 variieren.

Die beiden Vitamine liegen nebeneinander oft in Gelatine-Mikrokapseln vor, die vor der Analyse aufgeschlossen werden müssen. Da schon bei leicht erhöhter Temperatur D₃ in flüssigem A-Acetat gelöst vorliegen dürfte, ist beim Aufschluss jede

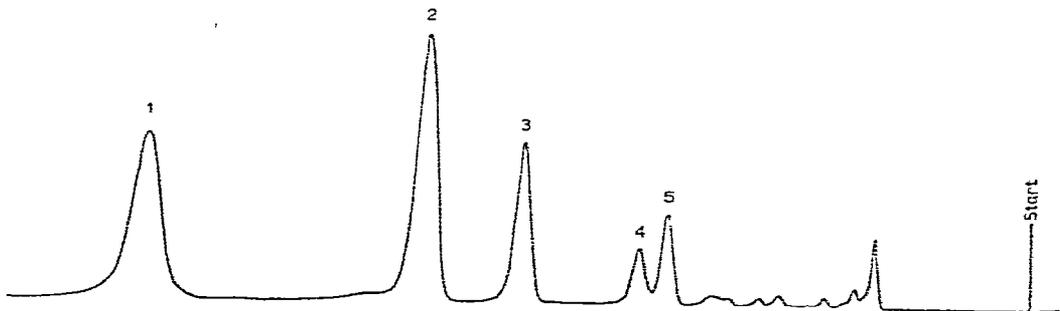


Fig. 1. Chromatogramm eines Vitamin D₃-Harzes. Säule: 30 cm × 3 mm Edelstahl; Säulenfüllmaterial: Merckosorb Al₂O₃ T, 5 μm; Elutionsmittel: Chloroform; Durchfluss: 24 ml/h. 1 = 7-Dehydrocholesterin; 2 = Vitamin D₃; 3 = Tachysterin₂; 4 = Lumisterin₂; 5 = Prävitamin D₃.

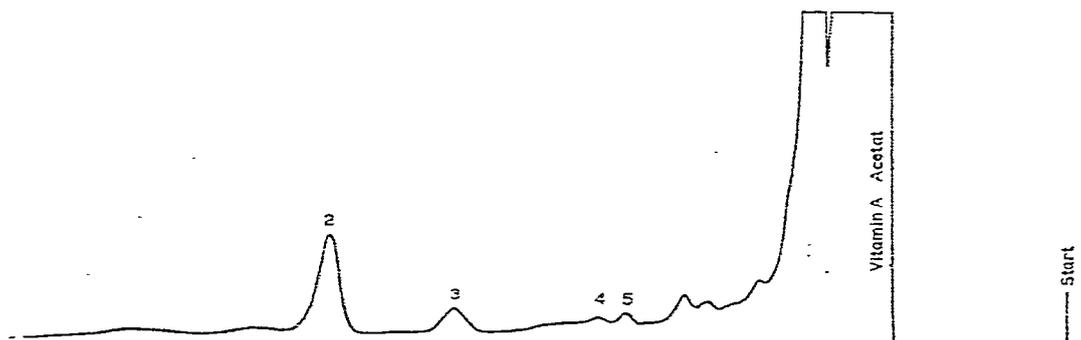


Fig. 2. Chromatogramm eines Vitamin D₃-Vitamin A-Acetatgemisches aus Gelatine Mikrokapseln. Bedingungen und Peaks wie bei Fig. 1.

grössere thermische Belastung zu vermeiden, um eine Verschiebung des Verhältnisses D₃:Prävitamin D₃ zu verhindern. In besonderen Fällen, wenn der "potential content" bestimmt werden soll und der Peak von Prävitamin D₃ nicht auswertbar ist, kann es zweckmässig sein, das Verhältnis bei einer definierten Temperatur bis zum Gleichgewicht zu verschieben, um dann aus dem D₃-Gehalt auf den "potential content" zu schliessen. Dazu stehen Tabellen zur Verfügung¹⁵. Fig. 2 zeigt eine Trennung von wenig D₃ neben viel A-Acetat.

Chromatographiesystem

Ein Siemens Hochdruck-Flüssigchromatograph S 200 P mit Photometerdetektor PM4 CHR und Transmissions-Extinktionswandler wurde mit einem pneumatischen Hamilton-Einschleusventil (5 μ l) ausgerüstet. Alle Trennungen wurden mit einer 30 cm-Siemens-Edestahlsäule (Innendurchmesser 3 mm), die mit Aluminiumoxid Merckosorb Alox T, 5 μ m, gefüllt war, durchgeführt. Das Füllen der Säule geschah nach der "Balanced density slurry method" mit Dijodmethan-Dioxan. Nach dem Füllen wurde die Säule zunächst mit Cyclohexan gewaschen. Beim Umstellen auf Chloroform (äthanolfrei von Höchst, Höchst, B.R.D.) muss zwischen das Lösungsmittelvorratsgefäss (Tropftrichter mit Schliffkern) und die Pumpe eine Vorsäule aus Glas (40 \times 3.5 cm mit Schliffhülse oben) geschaltet werden, die mit Kieselgel 60 (Merck) 230-400 mesh gefüllt ist. Dadurch sollen Spuren von Wasser und Äthanol entfernt werden, ohne dass eine Phosgenbildung zu befürchten ist, die bei reinem Chloroform sehr schnell eintritt. Der Durchfluss wurde auf etwa 24 ml/h eingestellt, wozu ein Druck von 50-100 bar erforderlich war. Am Detektor wurde die Empfindlichkeit 1 (= 1 Extinktionseinheit bei Vollausschlag), die Wellenlänge $\lambda = 267$ nm und die Bandbreite von 20 nm eingestellt. Die Papiergeschwindigkeit am Schreiber betrug 2.5 cm/min und die Spannungseinstellung 10 mV.

Durchführung der Analyse

Die Bestrahlungsprodukte von 7-Dehydrocholesterin liegen im allgemeinen als Harze vor. Diese können direkt eingewogen werden, ebenso Lösungen in fetten Ölen (Erdnussöl, Cornöl, Sojabohnenöl). Die Einwaage wird so gewählt, dass in der Probe Lösung etwa 30 mg D₃ in 10 ml enthalten sind. Die Einwaage wird erst unmittelbar

vor dem Auftragen auf die Säule in Chloroform gelöst, da sich beim Stehen die Zusammensetzung der Lösung ändert.

Liegen Gelatine-Mikrokapseln vor, so werden diese durch Behandeln mit warmem Wasser aufgeschlossen. Dazu werden z.B. 1.5 g Probe (entsprechend 2.5–5 mg D_3) in einem 500 ml-Messkolben mit 11 ml Wasser versetzt. Der Kolbeninhalt wird unter Stickstoff auf dem Dampfbad geschüttelt, bis alle Körner zerfallen sind und eine milchige Emulsion entstanden ist (1–2 min). Dann wird schnell abgekühlt, mit 100 ml Äthanol und 100 ml Diäthyläther, peroxidfrei, versetzt, gut durchgeschüttelt und mit Diäthyläther zur Marke aufgefüllt. Nach einstündigem Stehen werden 300 ml der überstehenden Flüssigkeit abpipettiert und im Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Eindampfdruckstand wird in 10 ml Chloroform gelöst.

Von der frisch hergestellten Probe- bzw. Aufschlusslösung werden 5 μ l mit Hilfe des Hamilton-Einschleusventils ohne Abbau des Druckes in den Chromatographen eingeschleust. Der Durchfluss wird während der Chromatographie auf 0.1 ml/h genau gemessen. Der erste Peak (V_0) erscheint nach etwa 4 min, der letzte nach etwa 20 min. Bei nachlassender Wirksamkeit der Vorsäule rücken IV und V zusammen und können bei einer bestimmten, sich einstellenden Aktivität der Trennsäule zu einem einheitlich erscheinenden Peak zusammenfallen. In diesem Fall muss die Vorsäule frisch gefüllt werden. Die Auswertung kann durch Planimetrie der Peakflächen oder durch Computerintegration erfolgen.

Eichung

Die Eichung wird zweckmässigerweise vor jeder grösseren Analysenserie durchgeführt. Dazu werden jeweils etwa 30 mg Vitamin D_3 rein (auf 0.1 mg genau abgewogen) in 10 ml Chloroform gelöst. Die Eichlösung wird wie die Probelösung eingeschleust und chromatographiert. Dieser Vorgang wird noch zweimal mit neuen Einwaagen wiederholt.

Da die Eichsubstanz einheitlich ist, können diese Einschleusungen im Abstand von 15 min erfolgen. Die Flächen der erhaltenen Eichpeaks werden wieder durch Planimetrie oder durch Computerintegration ermittelt. Das Eichergebnis wird in "Flächeneinheiten" pro mg Einwaage angegeben. Von den drei Messwerten wird der Mittelwert gebildet (= Eichfaktor f_E). Die Differenz der einzelnen Werte zum Mittelwert soll unter 1 % des Mittelwertes liegen. Der Durchfluss beim Eichlauf wird auf 0.1 ml/h genau gemessen.

Berechnung

Die Berechnung des Vitamin D_3 -Gehaltes erfolgt nach folgender Gleichung

$$\% \text{ Vitamin } D_3 = \frac{F_P \cdot D_P \cdot a \cdot 100}{E_P \cdot D_E \cdot f_E}$$

Dabei bedeuten

F_P = Peakfläche D_3 der Probe

E_P = Einwaage der Probe in mg

f_E = Eichfaktor D_3

D_P = Durchfluss beim Chromatogramm der Probe

D_E = Durchfluss beim Eichchromatogramm

α = Volumfaktor; $\alpha = 1$ bei direkter Einwaage $\alpha = \frac{5}{3} \approx 1.67$ bei Mikrokapselaufschluss.

Die Peaks von I bis V werden zunächst mit dem Eichfaktor f_E von Vitamin D₃ ausgewertet. Dieses Ergebnis muss für II bis V noch mit einem spezifischen Faktor korrigiert werden. Für diese vier Verbindungen wurden vorläufige Korrekturfaktoren ermittelt: II, 1.20; III, 0.87; IV, 2.8 und V, 2.1.

Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde ein Vitamin D₃-Cholesterin-komplex (Molverhältnis 1:1) verwendet.

Cholesterin, das bei der Chromatographie abgetrennt wird, absorbiert bei $\lambda = 267$ nicht und ist daher auf dem Chromatogramm nicht sichtbar. Bei zehn D₃-Bestimmungen wurden folgende Werte erhalten: Mittelwert: 44.2%; Standardabweichung: 0.5%; Variationskoeffizient: 1.0%; Grösste Abweichung: 0.6%.

ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin D₃ und die bei seiner fotochemischen Herstellung aus 7-Dehydrocholesterin zwangsläufig mit entstehenden Isomeren können durch Hochdruckflüssigchromatographie an Aluminiumoxid mit Chloroform als Elutionsmittel getrennt und quantitativ bestimmt werden. Nach der gleichen Methode ist die Bestimmung von Vitamin D₃ neben viel Vitamin A-Acetat möglich.

LITERATUR

- 1 G. M. Sanders, J. Pot und E. Havinga, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 27 (1969) 145.
- 2 F. J. Mulder, E. J. de Vries und B. Borsje, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 1168.
- 3 H. R. Bolliger und A. König, *Z. Anal. Chem.*, 214 (1965) 1.
- 4 K. H. Hanewald, F. J. Mulder und K. J. Keuning, *J. Pharm. Sci.*, 57 (1968) 1308.
- 5 J. Borup, *Pharm. Ind.*, 33 (1971) 12.
- 6 A. W. Norman und H. F. De Luca, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1247.
- 7 *US Pharmacopoeia*, XVIII (1970) 915.
- 8 W. H. C. Shaw und J. P. Jefferies, *Analyst (London.)* 82 (1957) 8.
- 9 R. Mermet-Bouvier, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 584.
- 10 A. W. Norman, J. Lund und H. F. De Luca, *Arch. Biochem. Biophys.*, 108 (1964) 12.
- 11 J. Green, *Biochem. J.*, 49 (1951) 232.
- 12 A. J. Sheppard, A. R. Prosser und W. D. Hubbard, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 49 (1972) 619.
- 13 G. J. Krol, C. A. Mannan, F. Q. Gemmill, Jr., G. E. Hicks und B. T. Kho, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 43.
- 14 D. F. Tomkins und R. J. Tscherne, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 1602.
- 15 J. A. Keverling Buisman, K. H. Hanewald, F. J. Mulder, J. R. Roborgh und K. J. Keuning, *J. Pharm. Sci.*, 57 (1968) 1328.