

Vereinfachte und verbesserte Bestimmung von Vitamin D in Fett, Öl und Margarine mit HPLC = A simplified and improved determination of vitamin D in fat, oil and margarine by HPLC

Autor(en): Rychener, M. / Walter, P.

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **76 (1985)**

Heft 1

PDF erstellt am: **30.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982360>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Vereinfachte und verbesserte Bestimmung von Vitamin D in Fett, Öl und Margarine mit HPLC

A Simplified and Improved Determination of Vitamin D in Fat, Oil and
Margarine by HPLC

M. Rychener und *P. Walter*
Schweizerisches Vitamininstitut, Basel

Einleitung

Bis vor wenigen Jahren war der sogenannte kurative Rattentest (1) die einzige Methode zur Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln (vgl. 2). Die kolorimetrische Bestimmungsmethode mit Antimontrichlorid (3, 4) versagt in vielen Fällen trotz aufwendiger Reinigungsverfahren infolge Interferenz mit Begleitsubstanzen. In letzter Zeit wurden verschiedentlich HPLC-Verfahren zur Analyse von Vitamin D veröffentlicht (5–20). Dabei ist die Bestimmung in Vitaminkonzentraten, Harzen, Trockenpulvern und Multivitaminpräparaten (5–10) aufgrund der relativ hohen Gehalte noch verhältnismässig einfach. In einzelnen Fällen (5–7) ist die Analyse sogar ohne Vorreinigung möglich. Bei der Analyse von Vitamin D in Lebensmitteln wie Milch und Milchprodukte (11–14), Babynahrung (13), Margarine (15, 16), Fischprodukte (17) oder in Blutplasma (18–20) ist eine Vorreinigung in der Regel unumgänglich.

Die Probenvorbereitung besteht bei Lebensmitteln üblicherweise in einer Verseifung des Analysengutes mit Kaliumhydroxidlösung bei Raumtemperatur (11, 12, 14) oder am Rückfluss (15–17). Auch enzymatische Hydrolyse mit Lipase wird vorgeschlagen (13). Die nachfolgende Extraktion des Unverseifbaren geschieht mit Diethylether (16, 17) oder Hexan (13–15). Als Reinigung und Fraktionierung werden Gelfiltration an speziellem Sephadex (11, 20), Chromatographie an Aluminiumoxid (12, 14) und HPLC an Kieselgel (15) oder an gebundenen Phasen (RP–18) (16) vorgeschlagen. Die Analyse auf HPLC erfolgt entweder mit Adsorptionschromatographie (11, 16) oder mit Umkehrphasenchromatographie (12–15, 17).

Während bei Proben mit hohen Vitamin-D-Gehalten die Messung gegen externen Standard möglich ist (5–7, 12, 20), kann diese Methode der Standardisierung bei Lebensmitteln mit wenig Vitamin D in sehr viel Matrix in der Regel nicht angewendet werden, da verschiedenartige Fehler auftreten. Die Fehler re-

sultieren vor allem aus ungleichen Verseifungszeiten, Extraktionsverlusten, Verdunsten von Lösungsmitteln aus kleinen Probenvolumina sowie Verlusten bei der Fraktionierung mittels Flüssigchromatographie. Der Analysengang besteht aus zu vielen Schritten, als dass diese Fehler mit einem konstanten Recovery-Faktor kompensiert werden könnten. Die Verwendung eines internen Standards ist daher angezeigt. Δ 4,6-Cholestadienol (8), 4-Hydroxybiphenyl (9) und Cholesterylphenylacetat (13) wurden vorgeschlagen. Letzteres ist ungeeignet, da es ebenfalls verseifbar ist. Versuche mit 4-Hydroxybiphenyl zeigten, dass dieses Phenolderivat bei der Extraktion zum grössten Teil in der basischen Wasserphase verbleibt. Da Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und D₃ (Cholecalciferol) ähnliche Strukturen haben, erscheint es vorteilhaft, das eine als internen Standard zur Bestimmung des anderen zu benutzen, wie dies auch von verschiedenen Autoren (10, 14–17, 22) empfohlen wird. Mit normaler Adsorbtionschromatographie an Kieselgel lassen sich D₂ und D₃ jedoch nicht trennen (22), hingegen sind in den letzten Jahren eine Reihe von verteilungschromatographischen HPLC-Trennungen von Vitamin D₂ und D₃ auf Umkehrphasen beschrieben worden (10, 14, 15, 17–23). Dieser Sachverhalt legt die Strategie nahe, die zu untersuchende Probe nach Probenvorbereitung durch Verseifen und Extraktion zuerst auf Kieselgel chromatographisch vorzureinigen, und danach die quantitative Bestimmung mit HPLC an einer gebundenen Phase (vorzugsweise RP-18) durchzuführen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode ist auf dieser Strategie aufgebaut und wurde speziell auf die in der Schweiz zulässigen Vitamin-D-Mengen in Lebensmitteln ausgerichtet, d. h. entweder 150 IE D oder 450 IE D pro Tagesportion Fett (50 g) bzw. Margarine (60 g). Der Einfachheit halber bedeutet D₃ immer das zu analysierende Vitamin und D₂ den internen Standard. Die Methode ist jedoch auch umgekehrt anwendbar.

Material

Material

- 250-ml-, 500-ml, 50-ml-Birkenkolben NS 29
- 2-ml-, 10-ml-Vollpipetten
- 100-ml-Messkolben mit Stopfen
- Rückflusskühler mit N₂-Überleitung
- Wasserbad
- 750-ml-Scheidetrichter, Trichter
- Rotationsverdampfer
- Pasteurpipetten, Glaswatte
- Probenfläschchen, 300- μ l-Einsätze (passend zu WISP).

HPLC-Apparatur für präparative Chromatographie

- Waters M-45 Pumpe
- Rheodyne Modell 7161 Probeaufgabeventil mit 500- μ l-Schlaufe und passender 1-ml-Spritze
- Säule: siehe chromatographische Bedingungen
- Pye Unicam PU4020 UV Detektor
- Unicam ARI5 Schreiber.

HPLC-Apparatur für Analyse

- Waters M-45 Pumpe
- Waters WISP 710B Probeaufgabesystem
- Säule: Siehe chromatographische Bedingungen
- Pye Unicam Detektor
- Spectra Physics SP4270 Integrator.

Reagenzien

- Vitamin D₂ bzw. D₃ (Ergocalciferol bzw. Cholecalciferol, für biochemische Zwecke, krist., 40 Mio IE/g, Merck)
- Ethanol abs., Chloroform, Tetrahydrofuran, Diethylether (p. a., Merck)
- Isopropanol, Kaliumhydroxid (p. a., Fluka)
- HPLC-Lösungsmittel: Acetonitril (Mallinckrodt)
n-Hexan (Romil Chemicals)
Methanol (Baker).

Standardlösungen

- *Stammlösungen:* Je 25 mg Vitamin D₂ bzw. D₃ werden in 100 ml Methanol gelöst und davon 10 ml mit Methanol auf 100 ml verdünnt (\cong 1000 IE/ml, 1 IE (internationale Einheit) = 25 ng Vitamin D; gekühlt, im Dunkeln 1 Monat haltbar).
- *Arbeitsstandard:* Je 10 ml Stammlösung werden mit Methanol auf 100 ml verdünnt (\cong 100 IE/ml; gekühlt, im Dunkeln 1 Monat haltbar).
- *Mischstandard:* 10 ml Vitamin D₂ und 10 ml Vitamin D₃-Stammlösung werden mit Methanol auf 100 ml verdünnt (\cong 100 IE D₂/ml + 100 IE D₃/ml).
- *Eichstandard:* 5 ml Mischstandard werden eingedampft und 2,5 ml Acetonitril/Methanol/Chloroform (94:2:4) aufgenommen (vor Gebrauch frisch herstellen).

Durchführung der Bestimmung

Verseifung

In einem 250-ml-Birnenkolben werden ca. 15 g Margarine bzw. ca. 12 g Fett oder Öl genau (0,01 g) eingewogen. Dazu werden 2 ml Standardlösung (Vitamin-D₂-Standard zur Bestimmung von Vitamin D₃ und umgekehrt, \cong 200 IE) pipetiert. Nacheinander werden eine Spatelspitze Ascorbinsäure (als Antioxidans), 30 ml Methanol, 30 ml Ethanol, 30 ml wässrige Kaliumhydroxidlösung (50%) sowie einige Siedesteinchen zugesetzt. Der Kolben wird möglichst rasch ins siedende Wasserbad verbracht und unter N₂-Strom 20 min am Rückfluss gekocht. Danach wird wenig Wasser durch den Kühler in den Kolben gespült und dieser im kalten Wasser unter Umschwenken auf Raumtemperatur abgekühlt.

Extraktion

Durch einen Trichter wird der Kolbeninhalt mit ca. 100 ml Wasser in einen mit 100 ml Diethylether beschickten 750-ml-Scheidetrichter übergeführt und kräftig geschüttelt. Die untere Phase wird mit einer 100-ml- und einer 50-ml-Portion Diethylether zwei weitere Male extrahiert und danach verworfen. Die vereinigten Etherphasen werden viermal mit je 50 ml Wasser neutralgewaschen (Universalindikator-Papier). Die Etherphase wird in einen 500-ml-Birnenkolben abgelassen und am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 400 Torr eingedampft. 30 ml Ethanol abs. werden zugesetzt und bei vollem Wasserstrahlvakuum zur vollständigen Trockne eingedampft. Der Kolben wird auf Raumtemperatur abgekühlt und der Rückstand in 3 ml n-Hexan/Isopropanol/Tetrahydrofuran (99:0,5:0,5) gelöst. Durch einen kleinen Glaswattebausch in einer Pasteurpipette wird die Lösung in ein Probenfläschchen filtriert.

Präparative Chromatographie

Diese Lösung wird auf dem präparativen System wie folgt chromatographiert:

- Säule: Stahlsäule (250 x 4,6 mm + 40 mm Vorsäule) gefüllt mit LiChrosorb SI 60, 7 μ m (Knauer, Fertigsäule)
- Mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/Tetrahydrofuran (98:1:1)
- Eingespritzte Menge: 500 μ l
- Flussrate: 2,5 ml/min
- Detektion: UV 264 nm
- Empfindlichkeit: 0,32 AU \cong 10 mV
- Papiervorschub: 1 cm/min.

Dabei werden Vitamin D₂ und D₃ genau gleichzeitig eluiert und ergeben einen Peak zwischen 7,8 min und 8,8 min. Die vitamin-D-haltige Fraktion wird in einem 50-ml-Kölbchen aufgefangen, am Rotationsverdampfer eingedampft, in

300 μ l Acetonitril/Methanol/Chloroform (94:2:4) aufgenommen und in ein Probenfläschen mit 300- μ l-Einsatz übergeführt.

Analyse

Die quantitative Bestimmung erfolgt unter folgenden Bedingungen:

- Säule: 2 Glaskartuschen (100 x 3 mm) gefüllt mit CPtmSpher C₁₈, 8 μ m (Chrompack, Fertigsäule) in Serie
- Mobile Phase: Acetonitril/Methanol/Chloroform (91:3:6)
- Einspritzvolumen: 25 μ l
- Laufzeit: 13 min
- Flussrate: 0,8 ml/min
- Detektion: UV 264 nm
- Empfindlichkeit: 0,04 AU \cong 10 mV.

Die Peakflächen von Vitamin D₂ und D₃ bei ca. 9,3 min und 10,2 min werden mit dem Integrator mit folgenden Eingaben berechnet:

- AT = 8 (Verstärkung)
- CS = .25 (Papiervorschub)
- PW = 6
- PT = 100 (Parameter zur Peakerkennung)
- T1 = 8 (Beginn der Peakerfassung)
- MA = 1000 (kleinste erfasste Peakfläche).

Berechnung

Die Berechnung des Vitamin-D₃-Gehaltes (X) erfolgt aufgrund der integrierten Peakflächen nach folgender Formel:

$$X (\text{IE D}_3/\text{Tp}) = \frac{\text{D}_3 \cdot 200 \cdot \text{Tp}}{a \cdot \text{D}_2 \cdot E}$$

wobei:

D₃ = Peakfläche der Probe

D₂ = Peakfläche des internen Standards

E = Einwaage

Tp = Tagesportion (60 g bei Margarine, 50 g bei Fett bzw. 30 g bei Öl)

$$a = \frac{\text{D}_3^{(h)}}{\text{D}_2^{(h)}} = 1,075 \pm 0,007 (n = 11)^*$$

* Die Resultate in dieser Arbeit werden \pm Standardabweichung angegeben; n = Anzahl Messungen

Zur Bestimmung von a werden 25 μl Eichstandard eingespritzt (Mittelwert von 3 Einspritzungen). Das Verhältnis a , mit welchen die beiden Standardsubstanzen D_2 und D_3 gegeneinander geeicht werden, war bei verschiedenen Ansätzen von frischen und 1 Monat gekühlt gelagerten Eichstandards praktisch konstant.

Natürlich ist klar, dass die Berechnungsmethode nur dann sinnvoll angewandt werden kann, wenn sich D_2 und D_3 während der Probenvorbereitung gleich verhalten. Um dies zu überprüfen, wurde eine Mischung von je 5 ml D_2 - und D_3 -Arbeitsstandard (\cong 500 IE) während verschiedener Zeiten den Verseifungsbedingungen unterworfen (2 Serien von 5, 10, 20, 40 und 80 min). Nach Extraktion, Vorreinigung und Analyse zeigte sich, dass sich das Verhältnis a trotz variabler Verseifungsdauer kaum veränderte. Infolgedessen verhalten sich D_2 und D_3 bei der gewählten Probenvorbereitung gleich.

Resultate

Chromatographische Kenngrößen

Um die einfachsten chromatographischen Kenngrößen im analytischen Chromatogramm zu bestimmen, wurde Eichstandard bei einer Schreibergeschwindigkeit von 1 cm/min eingespritzt. Die mittlere theoretische Trennstufenzahl (N), bezogen auf D_3 , betrug ca. 6000, und die Auflösung (R), zwischen D_2 und D_3 , war 1,69. Die Kapazitätsfaktoren (k') betrugen 6,8 für D_2 und 7,6 für D_3 , was eine relative Retention (α) von 1,12 ergab. Diese Kenngrößen sind nach (24) vernünftig, so dass die Integration der beiden Peakflächen problemlos erfolgte.

Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit

Um zu prüfen, ob das gefundene Resultat der Analyse auch dem tatsächlichen Vitamin-D-Gehalt entsprach, wurden zu 12 g D-freiem Fett Vitamin D_3 in Form einer methanolischen Lösung zugesetzt und mit der beschriebenen Methode wiederzufinden versucht. Auf diese Weise wurden grössenordnungsmässig Produkte mit Gehalten von 400 IE D_3 /50 g bzw. 100 IE D_3 /50 g simuliert. Die Wiederfindungsrate betrug bei einer vorgelegten Menge von 100 IE D_3 $98,8 \pm 1,7\%$ ($n = 8$). Wurden nur 25 IE D_3 vorgelegt, betrug die Wiederfindungsrate $100,6 \pm 9,5\%$ ($n = 6$).

Zur Erfassung der Reproduzierbarkeit wurde eine Reihe von Fettprodukten mittels Doppelbestimmung auf Vitamin D_3 analysiert. Bei angepriesenen Gehalten von 450 IE D_3 pro Tagesportion wurde eine durchschnittliche Abweichung von $1,5 \pm 1,0\%$ ($n = 16$) und bei Gehalten von 150 IE D_3 pro Tagesportion eine solche von $1,7 \pm 1,1\%$ ($n = 9$) gefunden. Gesamthaft ergibt sich eine durch-

schnittliche Abweichung bei Doppelbestimmungen von $1,6 \pm 1,0\%$ ($n = 25$). Der reine Einspritzfehler, welcher aus der analytischen HPLC resultierte und durch mehrmaliges Einspritzen von Eichstandard bestimmt wurde, betrug 0,5%.

Effektive Verluste

Es ist klar, dass bei der beschriebenen Probenvorbereitung sowohl ein Teil des zu bestimmenden D_3 als auch des als Standard zugesetzten D_2 verloren geht. Zur Kenntnis dieser tatsächlichen Verluste und somit des Verhaltens von D_2 und D_3 , wurden folgende Messungen (sowohl für D_2 als auch für D_3) durchgeführt ($n = 4$).

Probenvorbereitungsverlust

Zur Messung des Verlustes, welcher durch Verseifen und Extrahieren entstand, wurden 500 IE D_3 im entsprechenden Milieu (Reagenzien ohne Fett, mit D-freiem Fett, mit D-freier Margarine) verseift und extrahiert. Vor dem Eindampfen wurden 500 IE D_2 als interner Standard zugesetzt. Präparative Chromatographie und Analyse erfolgten wie beschrieben.

Extraktionsverlust

Das entsprechende D-freie Milieu wurde verseift. Vor der Extraktion wurden 500 IE D_3 und vor dem Eindampfen 500 IE D_2 zugesetzt. Nach präparativer Chromatographie und Analyse mit HPLC ergab sich somit die Menge D, welche beim Extrahieren verloren ging.

Reiner Verseifungsverlust

Der Verlust, welcher aus dem Verseifen allein resultiert, ergab sich aus der Differenz von Probenvorbereitungsverlust und Extraktionsverlust.

In der Tabelle 1 fällt vorerst auf, dass sich die Verluste von D_2 und D_3 nirgends wesentlich unterscheiden. Die Verseifungsverluste betragen 15% für reine Standardlösungen, 12% für Fett und 8% für Margarine. Interessanterweise zeigten Ansätze ohne Fett praktisch keine Extraktionsverluste, während sie bei Fett und Margarine immerhin 15% betragen. Dies vor allem, weil durch die lösungsvermittelnde Wirkung der Kaliumsalze der Fettsäuren auch die apolaren D-Vitamine zum Teil in die Wasserphase gelangen konnten. Insgesamt ist bei der beschriebenen Probenvorbereitung somit mit effektiven Verlusten von 25–30% zu rechnen.

Diese Verluste, welche insbesondere auch durch die Umwandlung von Vitamin D in Prävitamin D entstehen (4), werden durch Verwendung von internem Standard kompensiert, da gleiche Anteile D_2 und D_3 umgewandelt werden. Bereits im Analysengut vorhandenes Prävitamin wird nicht mitberücksichtigt, weil es bei der präparativen HPLC sauber abgetrennt wird.

Tabelle 1. Effektive Verluste an Vitamin D₂ und D₃ während der Probenvorbereitung (Vorlage: 500 IE D)

	Reagenzien (ohne Fett)		Fett		Margarine	
	Gefunden IE D	Verlust %	Gefunden IE D	Verlust %	Gefunden IE D	Verlust %
Probenvorbereitung						
D ₂	426 ± 4	14,8	367 ± 11	26,6	394 ± 9	21,3
D ₃	424 ± 3	15,2	350 ± 10	30,1	385 ± 19	23,3
Extraktion						
D ₂	497 ± 3	0,6	427 ± 10	14,6	430 ± 4	14,0
D ₃	499 ± 1	0,2	413 ± 17	17,5	427 ± 6	14,7
Verseifung						
D ₂		14,2		12,1		7,3
D ₃		15,0		12,3		8,4

Vergleich HPLC-Methode/Rattentest

Zu Vergleichszwecken wurde eine Reihe von handelsüblichen Margarinen und Fetten einerseits mit der beschriebenen HPLC-Methode und andererseits mit dem kurativen Rattentest (1) auf Vitamin D₃ geprüft. Die Resultate der HPLC-Methode waren dabei durchschnittlich $9,9 \pm 14,6\%$ ($n = 16$) höher als diejenigen des Rattentests. Die relativ grossen Unterschiede bei einzelnen Vergleichen (Extremwerte -17% und $+44\%$), sind nicht verwunderlich, da sich die beiden Methoden nicht direkt vergleichen lassen. Die HPLC-Methode liefert eine reine Gehaltsangabe der Substanz Cholecalciferol, während der Rattentest ein Mass für die physiologische Wirksamkeit der zu analysierenden Probe gegen Rachitis ist uns solcherart von verschiedensten Einflüssen wie Resorbierbarkeit, Wirksamkeit von Prävitamin D usw. abhängt.

Diskussion

Als geeignetstes Reagenz für die Verseifung von Fett, Öl sowie den Fettanteil von Margarine hat sich eine Mischung von Ethanol, Methanol und wässriger Kaliumhydroxidlösung (50%) erwiesen, da sich darin das Analysengut nach dem Schmelzen relativ rasch löste. Dies war wichtig, damit sich das zu analysierende Vitamin D₃ möglichst schnell im gleichen Medium befand wie das als methanolische Lösung angesetzte D₂ (Standard). Ein Parallelversuch zeigte, dass es nicht

nötig war, den internen Standard erst nach einer Minute Kochzeit zuzusetzen, wie dies *van Niekerk* et al. (15) vorschlugen.

Bei der nachfolgenden Extraktion mit Diethylether traten manchmal Emulsionen auf, welche sich unter Umständen auch nach Zufügen von Ethanol oder festem Natriumchlorid nicht vollständig auflösten. Im Zweifelsfall wurden emulgierte Zwischenschichten mit der organischen Phase weiterverarbeitet. Beim letzten, neutralen Waschwasser war jeweils eine klare Phasentrennung zu erkennen. Durch Zusetzen von etwas absolutem Ethanol vor dem Eindampfen konnte auf das mühsame, zeitraubende Trocknen über Na_2SO_4 verzichtet werden, welches verschiedentlich (9, 13, 15) empfohlen wird. Eventuelle Verluste bei der Extraktion fielen nicht ins Gewicht, da sie durch das Einsetzen eines internen Standards kompensiert wurden. Das Fällern von Cholesterin mit Methanol oder methanolischer Digitoninlösung, wie es *Munitz* (14) für Milch oder *Egaas* (17) für Fischprodukte vorschlugen, war bei den cholesterinarmen pflanzlichen Fetten nicht nötig. Insgesamt konnte die Probenvorbereitung gegenüber der Literatur (15, 17) erheblich vereinfacht und standardisiert werden.

Die chromatographische Vorreinigung des Unverseifbaren auf LiChrosorb SI 60 im Laufmittel n-Hexan/Isopropanol/Tetrahydrofuran (98:1:1) trennte den grössten Teil der störenden Begleitsubstanzen ab, so dass die D_2/D_3 -Fraktion im Chromatogramm (Abb. 1) als deutlicher Peak sichtbar wurde. Anfang und Ende der Sammeldauer wurde durch analoges Einspritzen von D_2/D_3 -Mischstandard festgelegt, womit sich das Zusetzen einer Markiersubstanz zur Probe (z. B. γ -Tocopherol, nach 15) erübrigte. Eine einmalige präparative Chromatographie war in diesem System ausreichend, während nach (15) zwei Vorreinigungsstufen notwendig waren. Im Gegensatz zu Vorreinigungen durch Chromatographie an Aluminiumoxid in offenen Glassäulen (12, 14) konnte beim HPLC-System das eluierte Gemisch auf dem Schreiber fortlaufend überprüft und somit die D-haltige Fraktion nicht verpasst werden.

Versuche zur Trennung von D_2 und D_3 mit HPLC an einer Octadecyl-Umkehrphase mit Methanol/Wasser als mobile Phase waren unbefriedigend. Daher wurde zur Analyse ein nichtwässriges Umkehrphasensystem gewählt. Die besten Ergebnisse wurden mit CPTM Spher C_{18} als stationäre Phase und Acetonitril/Methanol/Chloroform (91:3:6) erzielt. Dabei wirkte Acetonitril selektiv verzögernd auf die D-Vitamine. Dadurch erschienen sämtliche Substanzen, welche nach der präparativen Chromatographie noch in der D-Fraktion verblieben waren, im analytischen Chromatogramm (Abb. 2) deutliche vor D_2 und D_3 , welche typische Retentionen von 9,33 bzw. 10,18 min aufwiesen. Die Trennung war einwandfrei besser als bei *Egaas* (17) und *van Niekerk* (15), welche ansonsten ungefähr dieselbe Strategie verfolgten.

Schlussbetrachtung

Mit der vorliegenden Arbeit steht eine Methode zur Analyse von bei der Herstellung zugesetztem Vitamin D in Fettprodukten zur Verfügung, welche weit

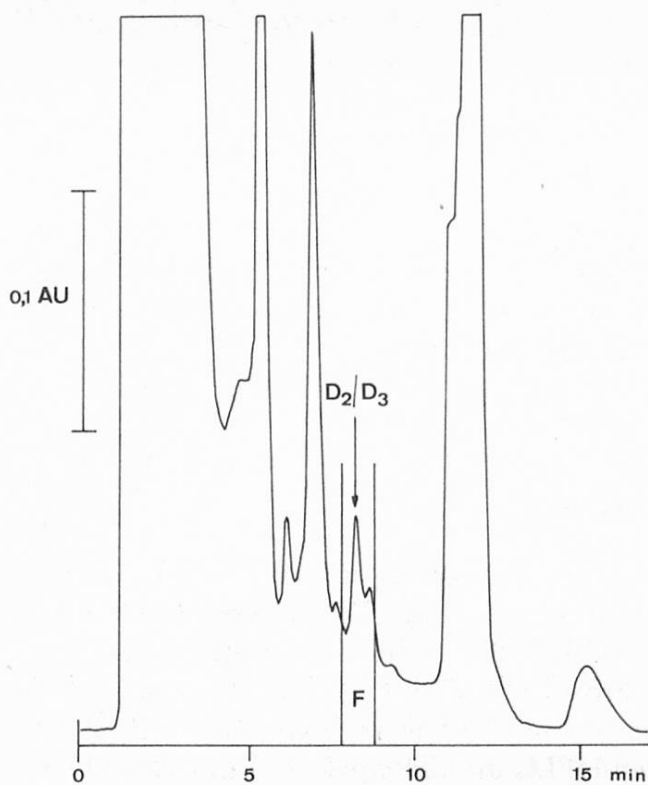


Abb. 1. Präparatives Chromatogramm des Etherextraktes von verseifeter Margarine
F = gesammelte, D-haltige Fraktion

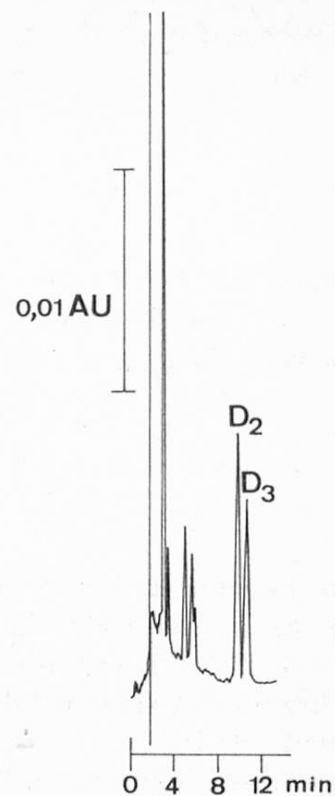


Abb. 2. Analytisches Chromatogramm der D-haltigen Fraktion aus dem Etherextrakt von verseifeter Margarine
Retentionszeiten: $D_2 = 9,33$ min,
 $D_3 = 10,18$ min

schneller, genauer und billiger ist als der herkömmliche Rattentest (1). Gegenüber bereits publizierten HPLC-Methoden (15, 17), konnte der Aufwand reduziert und die Präzision gesteigert werden. Da die Standardabweichung der Vitamin- D_3 -Bestimmung bei einem Gehalt von 100 IE D_3 pro 50 g Fett unter 10% lag, eignet sich die beschriebene Methode gut zur Routineprüfung der auf dem schweizerischen Markt befindlichen vitamin-D-haltigen Fettprodukte, welche je nach Anpreisung 450 IE pro Tagesportion («reich an Vitamin D») bzw. 150 IE pro Tagesportion («enthält Vitamin D») enthalten müssen.

Unseres Wissens erstmals wurden durch geeignete Versuchsanordnung die durch die Probenvorbereitung hervorgerufenen D_2 - und D_3 -Verluste mit HPLC sauber quantifiziert, wobei sich zeigte, dass diese erheblich grösser sind als bisher (6, 12, 16) angenommen wurde. Ebenso konnte der Beweis für das gleiche Verhalten von D_2 und D_3 während des Analysenganges erbracht werden. Voraussetzung für die Anwendbarkeit ist, dass ein zu analysierendes Produkt nur entweder D_2 oder D_3 enthält. Bei sämtlichen getesteten fetthaltigen Lebensmitteln war dies der Fall.

Weiterhin ein Problem bleibt die Bestimmung von natürlichen Vitamin-D-Gehalten. Doch gerade bei der Suche nach natürlichen Vitamin-D-Quellen im

Hinblick auf naturnahe (biologische) Lebensmittelproduktion werden in Zukunft vermehrt derartige Analysemethoden entwickelt werden müssen.

Dank

Wir danken Frl. *U. Olbrecht* für die Vitamin-D-Messungen mit den kurativen Rattentests. Ferner sei dem Bundesamt für Bildung und Wissenschaft für die im Rahmen des COST-Projektes gewährte finanzielle Unterstützung gedankt.

Zusammenfassung

Eine vereinfachte und verbesserte Methode zur Bestimmung von Vitamin D₃ in Fett, Öl und Margarine mit HPLC, unter Verwendung von Vitamin D₂ als interner Standard, wird beschrieben. Nach Verseifung der Probe und Extraktion des Unverseifbaren mit Diethylether wird durch präparative HPLC an LiChrosorb SI 60 mit n-Hexan/Isopropanol/Tetrahydrofuran (98:1:1) als mobile Phase die vitamin-D-haltige Fraktion isoliert. Deren Analyse mit nichtwässriger Umkehrphasen-HPLC an CPtmSpehr C₁₈ mit Acetonitril/Methanol/Chloroform (91:3:6) ergibt nach Integration der Peakflächen den Vitamin-D-Gehalt.

Die Wiederfindungsrate mit dieser Methode betrug $98,8 \pm 1,7\%$ ($n = 8$) bei 100 IE D₃ und $100,6 \pm 9,5\%$ ($n = 6$) bei 25 IE D₃ pro 12 g Fett. Die mittlere Abweichung bei Doppelbestimmungen belief sich auf $1,6 \pm 1,0\%$ ($n = 25$). Die effektiven Verluste bei der Probenvorbereitung betragen für D₂ und D₃ ca. 27% bei Fett und ca. 22% bei Margarine. Die gefundenen Werte waren durchschnittlich $9,9 \pm 14,6\%$ ($n = 16$) höher als die mit dem kurativen Rattentest ermittelten.

Die Methode eignet sich speziell für die Analysen der in der Schweiz offiziell zugelassenen Mengen an zugegebenem Vitamin D in Fetten, Ölen und Margarinen.

Résumé

Une méthode simplifiée et améliorée est décrite, permettant de déterminer la vitamine D₃ dans les graisses, les huiles et la margarine à l'aide de la HPLC, en utilisant la vitamine D₂ comme standard interne. Après saponification de l'échantillon et extraction de la partie insaponifiable avec l'éther, la fraction contenant les vitamines D est isolée par HPLC préparative sur le LiChrosorb SI 60 avec n-hexane/isopropanol/tétrahydrofurane (98:1:1) comme phase mobile. L'analyse de cette fraction à l'aide de la HPLC en phase inverse (non-aqueuse) sur le CPtmSpher C₁₈ avec acétonitrile/méthanol/chloroforme (91:3:6) comme phase mobile donne la teneur en vitamine D₃ après l'intégration de la surface des pics.

Les taux de recouvrement étaient de $98,8 \pm 1,7\%$ ($n = 8$) pour 100 IE D₃ et de $100,6 \pm 9,5\%$ ($n = 6$) pour 25 IE D₃ dans 12 g de graisse. La différence moyenne entre des déterminations doubles était de $1,6 \pm 1,0\%$ ($n = 25$). Effectivement, on perdait env. 27% des vitamines D₂ et D₃ dans la graisse et env. 22% dans la margarine lors de la préparation des échantillons. Les résultats trouvés étaient en moyenne $9,9 \pm 14,6\%$ plus élevés que ceux estimés à l'aide du test curatif chez le rat.

La methode décrite est particulièrement appropriée pour le dosage des taux de vitamine D officiellement autorisés en Suisse dans les graisses, huiles et margarines.

Summary

A simplified and improved method for the determination of vitamin D₃ in fat, oil and margarine is described with the use of vitamin D₂ as an internal standard. After saponification of the sample and extraction of the unsaponifiable with diethyl ether, the vitamin D containing fraction is isolated by preparative HPLC on Lichrosorb SI 60 with n-hexane/isopropanol/tetrahydrofuran (98:1:1) as mobile phase. This fraction is analysed by non-aqueous reversed phase HPLC on CPtmSpher C₁₈ with acetonitril/methanol/chloroform (91:3:6) as mobile phase, and the vitamine D₃ content is calculated after integration of the peak areas.

With his method, the recovery of added vitamin amounted to $98.8 \pm 1.7\%$ ($n = 8$) for 100 IE D₃ and to $100.6 \pm 9.5\%$ ($n = 6$) for 25 IE D₃ in 12 g fat. The mean difference between double determinations was $1.6 \pm 1.0\%$ ($n = 25$). The actual losses of D₂ as well as D₃ during sample preparation were about 27% for fat and about 22% for margarine. The results with this method were $9.9 \pm 14.6\%$ ($n = 16$) higher than those determined with the curative rat test. The method is especially suitable for the determination of vitamin D added in amounts officially authorized in Switzerland to fat, oil and margarine.

Literatur

1. Bestimmung des Vitamin-D-Gehaltes. Pharmacopoea helvetica, editio quinto, suppl. sec. 141–4. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1955.
2. Walter, P.: Vitaminbestimmung in der Schweiz. *Alimenta* **21**, 47–51 (1982).
3. Vitaminbestimmung in Lebensmitteln, Vitamin D. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 5. Aufl., 1. Band 669–672. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1964.
4. Bolliger, H. R. und König, A.: Quantitative Bestimmung von Vitamin D in Konzentraten, Arzneimitteln und weiteren Kombinationspräparaten mittels Dünnschichtchromatographie. *Z. Anal. Chem.* **214**, 1–23 (1965).
5. Hofsass, H., Grant, A., Alicino, N. J. and Greenbaum, S. B.: High-pressure liquid chromatographic determination of vitamin D₃ in resins, oils, dry concentrates, and dry concentrates containing vitamin A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **59**, 251–260 (1976).
6. Ray, A. C., Dwyer, J. N. and Reagor, J. C.: High pressure liquid chromatography determination of vitamin D₃ in livestock feed supplements. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**, 1296–1301 (1977).
7. Vanhaelen-Fastré, R. and Vanhaelen, M.: High-performance liquid chromatography determination of potential content of vitamin D₂ (ergocalciferol) and vitamin D₃ (cholecalciferol) in resins, oils, dry concentrates and multivitamin formulations. *J. Chromatogr.* **153**, 219–226 (1978).
8. de Vries, E. J., Zeeman, J., Esser, R. J. E., Borsje, B. and Mulder, F. J.: Analysis of fat-soluble vitamins. XXIII. High performance liquid chromatographic assay for vitamin D in vitamin D₃ and multivitamin preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **62**, 1285–1291 (1979).
tablets by high-performance liquid chromatography. *Analyst* **104**, 626–636 (1979).

10. *Fong, G. W. K., Johnson, R. N. and Kho, B. T.*: Nonaqueous reverse phase liquid chromatographic determination of vitamin D₂ in multivitamin tablets, using vitamin D₃ as internal standard. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 939–945 (1983).
11. *Thomson, J. N., Maxwell, W. B. and L'Abeé, M.*: High pressure liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 998–1002 (1977).
12. *Henderson, S. K. and Wickroski, A. F.*: Reverse phase high pressure liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61**, 1130–1134 (1978).
13. *Barnett, S. A., Frick, L. W. and Baine, H. M.*: Simultaneous determination of vitamin A, D₂ or D₃, E and K₁ in infant formulas and dairy products by reverse-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **52**, 610–614 (1980).
14. *Muniz, J. F., Wehr, C. T. and Wehr, H. M.*: Reverse phase liquid chromatographic determination of vitamins D₂ and D₃ in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**, 791–797 (1982).
15. *van Niekerk, P. J. and Smit, S. C. C.*: The determination of vitamin D in margarine by high performance liquid chromatography. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 1980, 417–421.
16. *Brawand, F., Ganzoni, L., Heizmann, R., Olbrecht, U. and Walter, P.*: Determination of added vitamin D to foodstuffs by high performance liquid chromatography. Thermal processing and quality of foods, concluding seminar. COST 91, Athens, November 14–18, 1983.
17. *Egaas, E. and Lambertson, G.*: Naturally occurring vitamin D₃ in fish products analysed by HPLC using vitamin D₂ as an international standard. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **49**, 35–42 (1979).
18. *Jones, G.*: Assay of vitamins D₂ and D₃, and 25-hydroxyvitamins D₂ and D₃ in human plasma by high performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* **24**, 287–298 (1978).
19. *Shepard, R. M., Horst, R. L., Hamstra, A. J. and DeLuca, H. F.*: Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. *Biochem. J.* **182**, 55–69 (1979).
20. *Horst, R. L. and Littledike, E. T.*: Assay for vitamin D₂ and vitamin D₃ in plasma of dairy cows: Changes after massive dosing of vitamin D₃. *J. Dairy. Sci.* **62**, 1746–1751 (1979).
21. *Oscada, M. and Araujo, M.*: High pressure liquid chromatographic separation and identification of vitamins D₂ and D₃ in the presence of fat-soluble vitamins in dosage forms. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 993–997 (1977).
22. *Wiggins, R. A.*: Separation of vitamin D₂ and vitamin D₃ by high pressure liquid chromatography. *Chem. & Ind.* 841–842 (1977).
23. *Zonta, F., Stancher, B. and Bielawny, J.*: High performance liquid chromatography of fat-soluble vitamins; Separation and identification of vitamins D₂ and D₃ and their isomers in food samples in the presence of vitamin A, vitamin E and carotene. *J. Chromatogr.* **246**, 105–112 (1982).
24. *Meyer, V.*: Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, 3. Aufl., 15–30. Diesterweg/Salle, Sauerländer, 1984.

Dr. M. Rychener
 Prof. Dr. P. Walter
 Schweizerisches Vitamininstitut
 Vesalgasse 1
 CH-4051 Basel