

## VERGELYKING VAN TWEË METODES VIR DIE BEPALING VAN VITAMIEËN A\*

J.J. Erasmus\*\*

Departement Veekunde, Universiteit van Stellenbosch

**SUMMARY:** A COMPARISON OF TWO METHODS FOR THE DETERMINATION OF VITAMIN A WITH SPECIAL REFERENCE TO THE EFFECTS OF STORAGE TIME, STORAGE TEMPERATURE AND LIGHT ON THE VITAMIN A CONTENT OF PLASMA

The destructive-irradiation technique and the Carr-Price method for the determination of vitamin A were compared. No significant difference could be found between the two methods with regard to repeatability and percentage recovery of vitamin A. Exposure to light at room temperature for a period of up to 8 hours after sampling had no influence on the vitamin A content of plasma. Plasma could be stored up to 14 days at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  without any loss of vitamin A.

### OPSOMMING

Die bestralingsmetode vir die bepaling van vitamien A is met die Carr-Price metode vergelyk. Geen betekenisvolle verskil ten opsigte van herhaalbaarheid en persentasieherwinning van vitamien A kon gevind word nie. Blootstelling aan lig by kamertemperatuur vir 'n periode van tot 8 uur na monsterneming het geen invloed op die vitamien A-inhoud van bloed gehad nie. Plasma kon tot 14 dae by  $-20^{\circ}\text{C}$  geberg word, sonder noemenswaardige verlies aan vitamien A.

'n Nadeel van die bepaling van vitamien A met behulp van kolorimetriele metode is dat die kleurintensiteit van die gevormde gekleurde kompleks vinnig verander en dus die neem van akkurate lesings bemoeilik. Die metode wat mees algemeen gebruik word, is die Carr-Price metode (Carr & Price, 1926) hoewel verskeie ander metode ontwikkel is (Neeld & Pearson, 1963; Dugan, Frigerio & Siebert, 1964; Bayfield, 1971).

Dit is moeilik om 'n suiwer ekstrak van vitamien A uit biologiese materiaal te verkry sonder dat daar ander verbindings teenwoordig is wat ook lig absorbeer by dieselfde golflengte as vitamien A. Little (1944) het die probleme oorkom deur die bestralingsmetode te ontwikkel soos deur Peacock (1926) voorgestel. Hiervolgens word die vitamien A in 'n oplossing deur ultravioletligbestraling vernietig. Die hoeveelheid vitamien A word verteenwoordig deur die verskil tussen die absorpsiewaardes voor en na bestraling. Daar word dan aangeneem dat die bestraling geen invloed op die verbindings anders as vitamien A het nie. Bessey, Lowry, Brock & Lopez (1946) het die metode verder verbeter. Hulle het egter op mikro-liter hoeveelhede plasma gewerk en hulle metode was moeilik toepasbaar op 'n roetine basis.

In die huidige studie is die metode van Bessey *et al.* (1946) op groter hoeveelhede plasma toegepas en is 'n poging aangewend om die metode so te wysig dat dit op 'n roetine basis op 'n groot aantal monsters uitgevoer kan word. Die metode is met die Carr-Price-metode vergelyk en omdat vitamien A deur lig en lug by kamertemperatuur vernietig word, is ook ondersoek ingestel na moontlike verliese aan vitamien A tydens hantering en opberging van bloed- en plasmamonsters vanaf monsterneming tot analise.

\*Uittreksel uit 'n gedeelte van 'n verhandeling ingedien vir die M.Sc.(Agric.)-graad aan die Universiteit van Stellenbosch.

\*\*Huidige adres: Landbounavorsingsinstituut, Potchefstroom.

### Prosedure

#### Reagense

- (i) Carr-Price reagens: 20 g  $\text{SBCl}_3$ (A.R.)(Merck) is in 100 ml  $\text{CHCl}_3$ (A.R.) opgelos waarna 3 ml asynsuuranhidried (A.R.) bygevoeg is.
- (ii) USP vitamien A-standaard kapsules: elke kapsule bevat ongeveer 250 mg oplossing van vitamien A-asetaat in katoensaadolie (= 30 mg vitamien A alkohol of 34,4 mg vitamien A-asetaat per g oplossing).
- (iii) Petroleummeter (A.R.); Diëtleter (chemies suiwer): absolute alkohol en KOH (A.R.)
- (iv) Heparien.

#### Apparaat

- (i) Spektrofotometer: Zeiss PMQ 2.
- (ii) Bausch & Lomb kolorimeter: Spectronic 20.
- (iii) Ultraviolet (U.V.) lamp: Phillips "TL" 40W/8.

#### Metode

Bloed is, onderskeidelik, van 'n koei en 'n hamel verkry uit die *venae jugularis* en 10 I.E. heparien per ml bloed is as antistolmiddel gebruik. Die plasma is afgeswaai teen 2440 G en by  $-20^{\circ}\text{C}$  geberg tot analise vir vitamien A. Die lewer van 'n hamel is in 'n vleismeul fyngemaal en ook by  $-20^{\circ}\text{C}$  geberg.

Tien ml plasma is verseep deur dit met 'n gelyke volume alkoholiese KOH (9 ml 60% KOH opgemaak na 100 ml met absolute alkohol) in 'n waterbad by  $60^{\circ}\text{C}$  vir 15 minute te inkubeer. Lewer is op dieselfde wyse verseep deur 0,3 g lewer met 5 ml alkoholiese KOH 920 ml 60% KOH opgemaak na 100 ml met absolute alkohol) in die waterbad te inkubeer. Die versepingsprosedure was basies dieselfde as die waarmee Bessey *et al.* (1946) goeie resultate verkry het.

Vitamien A is geëkstraheer deur die verseepte plasma

en lewer na 'n afkoelingsperiode vir 10 minute onder 'n stikstofatmosfeer op te skud met 'n bepaalde hoeveelheid wat gewissel het tussen 7 en 14 ml van 'n mengsel wat bestaan het uit een deel diëtiel- en drie dele petrolium-eter. Na skeiding van die fases is die eterfase gebruik vir die vitamien A-bepaling. Die monsters is al die tyd, ook gedurende die analise in donker houers geberg en daar was geen skerp lig in die laboratorium nie.

#### Carr-Price-metode

Presies 5 ml van die eterfase is drooggedamp in 'n kolorimeterbuis met behulp van 'n stikstofstroom, die residu opgelos in 1 ml  $\text{CHCl}_3$  en 2 druppels asynsuuranhidried is bygevoeg. Die buis is in die kolorimeter geplaas, 5 ml  $\text{SbCl}_3$ -oplossing is bygevoeg en die absorpsie binne 5 tot 10 sekondes by 620 nm gelees. Die vitamien A-konsentrasie is bereken vanaf standaardkurwes wat volgens hierdie metode met behulp van die USP vitamien A standaard opgestel is.

#### Bestralingsmetode

Ongeveer 5 ml van die eterfase is in 'n kuwet oorgebring en die absorpsie by 327 nm bepaal. Die ekstrak is daarna vir 3 uur in geslote houers bestraal met behulp van die UV-lamp en die absorpsie weer by 327 nm bepaal. Die vitamien A-konsentrasie is bereken deur die verskil in absorpsiesings te gebruik en te verwys na standaardkurwes wat volgens hierdie metode opgestel is.

#### Metodes van opberg van bloed

Bloed, uit die nekaar van hamels getrek, is gehepariniseer (10 IE heparien/ml bloed) en in verskillende houers geberg, nl.

- Donker bottel in ysbad gehou
- Donker bottel by kamertemperatuur
- Deursigtige bottel by kamertemperatuur
- Deursigtige bottel in ysbad.

#### Tyd van opberg van bloed

Die plasma van bogenoemde monsters is teen 2440 G afgeswaai onmiddellik na monsterneming en ook na 4 en 8 uur respektiewelik na monsterneming. Bepaling van vitamien A is onmiddellik na afswaaiing volgens die bestralingsmetode op die plasma uitgevoer en volwaardige triplikaat herhalings is gedoen.

#### Tyd van opberg van plasma

Plasma, onmiddellik na monsterneming afgeswaai is in donker bottels geberg by  $-20^{\circ}\text{C}$ . Bepaling van vitamien A is op hierdie plasma direk na uitswaai en op die eerste, tweede, derde en vierde, sewende en veertiende dag na monsterneming volgens die bestralingsmetode gedoen. Volwaardige triplikaat herhalings is gedoen.

#### Resultate

In Tabel 1 word 'n opsomming verstrek van die statistiese vergelyking van die hoeveelheid vitamien A soos verkry deur die toepassing van die Carr-Price en die bestralingsmetode.

Tabel 1

Die vitamien A-inhoud van plasma en lewer soos verkry deur die Carr-Price- en die bestralingsmetodes

Behandeling	Getal bepaling	$\bar{x}$	$S^2$	SF	KV	Herwinningspersentasie $\pm$ SF
Plasma: bestraling	60	4.321	0.049	0.070	4.41	94,7 $\pm$ 1,1
Carr-Price	60	4.116	0.054	0.074	5.33	91.2 $\pm$ 1,8
Lewer: bestraling	60	24.271	1.645	0.359	4,71	98,1 $\pm$ 1,6
Carr-Price	60	23,002	2.557	0.454	5,99	98,2 $\pm$ 2,4

\*  $\bar{x}$  = mikrogram vitamien A per 10 ml plasma of per 0.3 g lewer.

Uit Tabel 1 is dit duidelik dat die Carr-Price-metode by plasma sowel as by lewer 'n hoër KV (Koëffisiënt van variasie) as die bestralingsmetode het. As die F-waardes vir plasma en lewer bereken word, nl.:

$$F(\text{plasma}) = \frac{SC^2}{Sb^2} = \frac{0,054}{0,049} = 1,10 \text{ N.B. en}$$

$$F(\text{lewer}) = \frac{SC^2}{Sb^2} = \frac{2,557}{1,645} = 1,55 \text{ N.B., is dit duidelik}$$

dat daar geen verskil in herhaalbaarheid tussen die twee metodes is nie. Die persentasie herwinning by plasma was laer as by lewer, waarskynlik as gevolg van die 170-voudige groter hoeveelheid vitamien A per gewig in lewer as in plasma.

In Tabel 2 word 'n opsomming verstrekkend van die vitamien A konsentrasie in bloed wat op verskillende wyses vir verskillende tye geberg was.

**Tabel 2**

*Die vitamien A-konsentrasie in bloed wat op verskillende wyse vir verskillende tye geberg word (ug Vit. A/ml eterestrak)*

		Ure na monsterneming		
		0	4	8
Donker bottel	Ysbad	0,84	0,81	0,83
	Kamertemperatuur	0,84	0,82	0,84
Deursigtige bottel:	Ysbad	0,84	0,82	0,82
	Kamertemperatuur	0,84	0,82	0,85

Uit Tabel 2 is dit duidelik dat bloed vir tot 8 uur na monsterneming in enige tipe houers geberg kan word sonder noemenswaardige verlies aan vitamien A.

Die vitamien A-inhoud in die eterestrak van plasma, gestoor vir 0, 1, 2, 3, 4, 7 en 14 dae, was 0,84, 0,86, 0,80, 0,82, 0,84, 0,76 en 0,78 ug vitamien A per ml eterestrak, onderskeidelik. Die gegewens is volgens die Student Newman-Keuls-metode (Snedecor & Cochran, 1967) ontleed om te bepaal watter monsters betekenisvol van mekaar verskil. Uit die resultate blyk dit vanaf die vierde dag, daar 'n effense afname in die vitamien A-inhoud van die plasma was. Die waardes vir die plasma verkry wat op dae 7 en 14 ontleed is, verskil nie van mekaar nie, maar verskil betekenisvol van dié verkry oor die eerste 4 dae. Bessey *et al.* (1946) het geen afname in vitamien A-inhoud van serum gevind wat in verseelde houers by 4°C of by 20°C vir een maand geberg was nie. Hansen & Warwick (1969) het na die tweede week, waar serum in gevriesde toestand geberg was, 'n afname in vitamien A by onverseelde houers gevind.

Die resultate van die huidige studie dui dus op 'n geringe afname in die vitamien A-inhoud van plasma wat vir langer as 4 dae by -20°C geberg word. Die afname tot 14 dae berging is nie groot nie, en dit lyk dus of plasma met redelike veiligheid vir 14 dae in verseelde houers by -20°C geberg kan word sonder dat daar beduidende verlies aan vitamien A plaasvind.

Die ondersoek het getoon dat die bestralingsmetode vir die bepaling van vitamien A (Bessey *et al.*, 1946) soos gewysig, goeie moontlikhede bied vir die vinnige roetine ontleding van groot getalle monsters. Die apparaat wat vereis word is redelik algemeen beskikbaar en nie besonder duur nie. Soos aangetoon kon die monsters, met die nodige voorsorg, met veiligheid vir 'n ruk geberg word voordat die ontledings uitgevoer word.

### Bedanking

Skrywer bedank prof. J.L. de Wit en dr. H.W. Stindt van die Departement Landboubiochemie vir hulp en raad asook die gebruik van apparaat.

### Verwysings

- BAYFIELD, R.F., 1971. Colorimetric determination of vitamin A with trichloro-acetic acid. *Anal. Biochem.* 39, 282.
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.A., BROCK, MARY J. & LOPEZ, JEANNE A., 1946. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. biol. Chem.* 166, 177.
- CARR, F.H. & PRICE, E.A., 1926. Colour reactions attributed to vitamin A. *Biochem. J.* 20, 297.
- DUGAN, R.E., FRIGERIO, N.A. & SIEBERT, J.M., 1964. Colorimetric determination of vitamin A and its derivatives with trifluoro-acetic acid. *Anal. Chem.* 36, 114.
- HANSEN, L.G. & WARWICK, W.J., 1969. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am. J. clin. Path. Tech. Sect.* 51, 538.
- LITTLE, R.W., 1944. Destructive irradiation technique of spectrophotometric vitamin A assay. *Indust. Engng. Chem. Anal. Ed.* 16, 288.
- NEELD, J.B. & PEARSON, W.N., 1963. Macro- and micromethods for the determination of serum vitamin A using trifluoro acid. *J. Nutr.* 69, 454.
- PEACOCK, P.R., 1926. The action of light on cold-liver oil. *Lancet*, 11, 328.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.H., 1967. *Statistical methods*, 6th edn. Ames: Iowa State University Press.