

WORLD HEALTH
ORGANIZATIONORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉDEUXIEME ASSEMBLEE
MONDIALE DE LA SANTEA2/39
13 juin 1949

ORIGINAL: ANGLAIS

✓ RAPPORT DU SOUS-COMITE DES VITAMINES LIPOSOLUBLES
(COMITE D'EXPERTS POUR LA STANDARDISATION BIOLOGIQUE)
(Point 8.16.1.1 de l'Ordre du jour provisoire)

Le Directeur général transmet à la Deuxième Assemblée Mondiale de la Santé le document WHO/BS/65 : Rapport du Sous-Comité des Vitamines liposolubles (Comité d'experts pour la Standardisation biologique).

Conformément aux instructions données par le Conseil Exécutif à sa deuxième session ^{1,2}, il a été pris note de ce rapport par un Comité ad hoc du Conseil Exécutif au cours d'une séance tenue le 10 juin 1949.

L'Assemblée de la Santé désirera peut-être adopter la résolution suivante :

La Deuxième Assemblée Mondiale de la Santé

PREND ACTE du rapport du Sous-comité des Vitamines liposolubles (Comité d'experts pour la Standardisation biologique);

RENVOIE ce rapport au Conseil Exécutif pour examen et suite à donner.

¹ Actes off. Org. mond. Santé, 17, 13

² Les observations du Comité ad hoc seront jointes, s'il y a lieu, au présent document sous forme d'addendum.

WORLD HEALTH
ORGANIZATIONORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉCOMITE D'EXPERTS POUR LA
STANDARDISATION BIOLOGIQUEWHO/BS/65
29 avril 1949

ORIGINAL : ANGLAIS

RAPPORT DU SOUS-COMITE DES VITAMINES LIPOSOLUBLES

Réunion tenue à Londres, du 26 au 29 avril 1949

Le Sous-comité des Vitamines liposolubles s'est réuni à Londres du 26 au 29 avril 1949, dans les bureaux du Medical Research Council, 26 Old Queen Street. Etaient présents :

Membres :

- Professeur A. Chevallier, Professeur de Physique biologique, Université de Strasbourg
- Dr Katharine H. Coward, Head of the Nutrition Department, School of Pharmacy, Université de Londres
- Professeur N.B. Guerrant, Professor of Biochemistry, Department of Agricultural and Biological Chemistry, Pennsylvania State College, State College, Pa., Etats-Unis d'Amérique
- Professeur B.C.F. Jansen, Professeur de Chimie physiologique, Université d'Amsterdam
- Sir Edward Mellanby, Secretary, Medical Research Council, Londres (Président)
- Dr E.M. Nelson, Chief, Division of Vitamins, Food and Drug Administration, Washington, D.C.
- Professeur R. Nicolaysen, Professeur à l'Institut de Recherches sur la Nutrition, Université d'Oslo
- Professeur F. Verzar, Professeur de Physiologie, Université de Bâle

Membres cooptés :

- Mlle E.M. Hume, Member of the External Scientific Staff, Medical Research Council; Honorary Member of the Staff, Lister Institute for Preventive Medicine, Londres (Secrétaire technique)
- Dr J.O. Irwin, Member of the Statistical Research Unit, Medical Research Council; London School of Hygiene and Tropical Medicine
- Professeur R.A. Morton, Professor of Biochemistry, Université de Liverpool

- Observateurs : N.T. Gridgeman, Biochemist, Research Department, Lever Bros. and Unilever Ltd., Port Sunlight, Royaume-Uni.
- Dr A.A. Miles, Director, Department of Biological Standards, National Institute for Medical Research (Medical Research Council), Londres
- Dr A. Neuberger, Member of the Scientific Staff, Medical Research Council, National Institute for Medical Research, Londres
- Représentant de la FAO : Dr F. Verzar
- Secrétaire : Dr R. Gautier, Sous-Directeur général, Organisation Mondiale de la Santé, Genève

Après avoir esquissé la procédure qui a conduit à l'établissement du Sous-comité - dont le mandat est de donner des avis au Comité d'experts pour la Standardisation biologique - le Sous-Directeur général s'est félicité de voir un représentant de la FAO participer aux travaux du Sous-comité.

Sir Edward Mellanby, qui avait présidé les Conférences internationales pour la Standardisation des Vitamines de 1931 et de 1934, a été réélu Président.

I. VITAMINE D

Préambule

L'étalon international de Vitamine D, constitué par une solution d'ergostérol irradié, a été adopté en 1931 par la Commission permanente de Standardisation biologique de l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations. Etant donné qu'il s'agissait d'une solution contenant principalement de la Vitamine D₂, elle ne s'est pas avérée suffisamment représentative des Vitamines D.

La suggestion présentée à la Deuxième Conférence internationale pour la Standardisation des Vitamines en 1934, selon laquelle l'étalon d'ergostérol irradié devrait être en fin de compte remplacé par la Vitamine D₂ cristallisée pure (Calciférol), est par conséquent inacceptable à l'heure actuelle. Il était admis dès cette époque que l'étalon de Vitamine D₂ n'était pas apte à servir d'étalon pour déterminer l'activité en Vitamine D des aliments pour animaux de basse-cour. On ne disposait pas à cette époque de Vitamine D₃ cristallisée, qui ne possède pas cet inconvénient, mais cette substance a maintenant été préparée en quantité suffisante pour permettre son adoption comme étalon international.

Il convient d'observer, toutefois, que lorsqu'il s'agit d'aliments pour animaux de basse-cour, qui risquent de ne pas contenir seulement de la Vitamine D₃, l'activité en Vitamine D de ces aliments, exprimée en unités internationales, ne peut être déterminée que par des essais effectués sur ces animaux.

1. Étalon international

Le Sous-comité recommande que la préparation de Vitamine D₃ cristallisée, telle qu'elle est définie ci-dessous, actuellement détenue par le National Institute for Medical Research de Londres, soit adoptée comme étalon international de Vitamine D.

Ce nouvel étalon remplacera la solution actuelle d'ergostérol irradié. Cette solution sera maintenue seulement à titre de préparation de référence *, et non pas en tant qu'étalon international. Des échantillons de la préparation-étalon de 1931 pourront être obtenus sur demande.

2. Définition de l'Unité

L'unité internationale de Vitamine D, dont le Sous-comité recommande l'adoption, est l'activité en Vitamine D de 0,025 μ g de la préparation-étalon internationale de Vitamine D₃ cristallisée.

3. Mode de distribution

Il est recommandé que le lot de 14 g. de Vitamine D₃ cristallisée, actuellement détenu en atmosphère d'azote et à -5° C. par le National Institute for Medical Research de Londres, soit réparti en ampoules de telle façon que chaque ampoule contienne environ la quantité requise pour une distribution semestrielle. Pour chacune de ces distributions le contenu d'une ampoule sera dissous dans une huile végétale appropriée (voir ci-dessous), de façon à obtenir une solution dont 1 mg. contiendra 0,025 μ g (1 U.I.).

* Le Sous-comité a conservé l'étalon original non en tant qu'étalon international proprement dit, mais comme préparation de référence pour la raison suivante :

L'étalon de Vitamine D₃ cristallisée n'a pas été contrôlé assez longtemps pour permettre d'en garantir la stabilité. L'ancien étalon, qui est demeuré stable pendant plusieurs années, pourrait s'avérer utile au cas où des difficultés se présenteraient pour l'utilisation de la préparation de Vitamine D₃.

4. Propriétés de l'étalon de Vitamine D

La Vitamine D₃ (C₂₇H₄₃ OH) recristallisée, immédiatement après avoir été extraite de l'ampoule, possédait les caractères suivants :

Point de fusion 87° - 89° C. (corr.)

$$\left[\alpha \right]_D^{20^\circ} = + 110^\circ \text{ (ethanol)}$$

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 265 \text{ m}\mu = 490$ (ethanol) correspondant à un coefficient d'extinction moléculaire de 18.800.

Il convient de relever que la détermination des constantes physiques de cette substance doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement de l'échantillon.

5. Solvant pour l'étalon de Vitamine D

Une huile destinée à servir de solvant pour la préparation de la Vitamine D₃ ne doit pas contenir au total plus de 32 parties par million de peroxydes (G.R. Greenbank et G.E. Holm, Industr. Engng. Chem., 1934, 26, 243; C.H. Lea, Dept. Sci. Industr. Res., Food Investigation Spec. Rep. No. 46, 1938, H.M.S.O., London) et 0,01 % d'hydroquinone y sera ajouté.

II. VITAMINE A

Préambule

Il a toujours été admis que le carotène- β n'était pas un étalon de référence idéal pour identifier la Vitamine A; cependant, on ne disposait pas de préparation de Vitamine A satisfaisante en 1934 au moment où la dernière Conférence a adopté le carotène- β .

Divers esters de Vitamine A ont été préparés au cours des dernières années. De ces esters c'est l'acétate de Vitamine A qui s'est révélé le plus approprié pour servir d'étalon au lieu du carotène- β . Il est désirable, cependant, de conserver la préparation-étalon de carotène- β en tant qu'étalon de Provitamine A.

1. Etalon international

Le Sous-comité recommande que l'étalon international de Vitamine A soit constitué par de l'acétate de Vitamine A cristallisé ayant les caractères spécifiés ci-dessous.

2. Définition de l'Unité

Le Sous-comité recommande que l'unité internationale corresponde à l'activité de 0,344 μg de la préparation-étalon d'acétate de Vitamine A cristallisé, équivalent à 0,3 μg de Vitamine A-alcool.

3. Mode de distribution

Il est recommandé que la préparation-étalon internationale soit distribuée sous forme de solution dans une huile végétale appropriée (voir ci-dessous), de façon à obtenir une solution dont 0,1 mg. contiendra 0,344 μg (1 U.I.) d'acétate de Vitamine A.

4. Propriétés de la préparation-étalon de Vitamine A

L'acétate de Vitamine A pure, cristallisé trans a les caractères suivants : ($\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$)

Point de fusion $57,8^\circ - 59,0^\circ \text{ C.}$ (corr.)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 325 μg = 1525 (isopropanol) ce qui correspond à un coefficient d'extinction moléculaire de 50.000.

5. Solvant de l'étalon de Vitamine A

Une huile destinée à servir de solvant pour l'acétate de Vitamine A est une huile ne contenant pas moins de 0,1 % de tocophérol, mais dont le nombre total de peroxydes ne dépassera pas 32 parties par million (G.R. Greenbank and G.E. Holm, Industr. Engng. Chem., 1934, 26, 243; C.H. Lea, Dept. Sci. Industr. Res., Food Investigation Spec. Rep. No. 46, 1938). Il est recommandé qu'un échantillon de l'huile utilisée pour la solution puisse être obtenu sur demande.

6. Facteur de conversion des résultats des mesures spectrophotométriques en unités internationales

Le Sous-comité recommande que l'unité internationale corresponde à l'activité de 0,344 μg d'acétate de Vitamine A. Cette quantité équivaut à 0,3 μg de Vitamine A-alcool.

Les titrages biologiques à grande échelle effectués sur des rats pour le Medical Research Council de Londres et pour la Commission de la Pharmacopée des Etats-Unis montrent que cette nouvelle définition de l'unité assure la continuité avec l'unité constituée par 0,6 μg de la préparation-étalon internationale de carotène- β en vigueur depuis 1934.

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 325 μM = 1750 pour la Vitamine A-alcool.

Etant donné que 0,3 μ g de Vitamine A-alcool équivaut à l'unité internationale et que 1750 est la valeur du coefficient d'absorption, il s'ensuit que le coefficient de conversion se trouve être de 1900 :

$$\left(\frac{10^6}{0,3 \times 1750} = 1900 \right)$$

Et, étant donné que 0,344 μ g d'acétate de Vitamine A correspond à la valeur de l'unité internationale, et que

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 325 \text{ m}\mu = 1525,$$

il s'ensuit que le coefficient de conversion est de 1900 :

$$\left(\frac{10^6}{0,344 \times 1525} = 1900 \right)$$

7. Conditions d'utilisation du Coefficient de Conversion

Le facteur de conversion de 1600 recommandé en 1934 était destiné à être utilisé pour des mesures spectrophotométriques qui à cette époque ne pouvaient être corrigées de façon appropriée pour éliminer l'absorption accessoire.

Le nouveau coefficient de conversion de 1900 ne peut être utilisé sans précautions, étant donné qu'il y a très peu de produits à titrer qui ne présentent pas d'absorption accessoire dans le spectre ultra-violet, y compris la région significative de 325 à 328 m μ . Il est cependant nécessaire :

1. de préciser les conditions dans lesquelles le coefficient est utilisable;
2. d'indiquer comment, en principe, on peut apporter un correctif pour tenir compte de l'absorption accessoire. Ces conditions sont les suivantes :
 - a) le maximum d'absorption doit se trouver dans la bande 325 à 328 m μ ;
 - b) la forme de la courbe doit correspondre étroitement à celle de l'étalon international établie dans les mêmes conditions et compensée par une solution de l'huile de dilution. Il ne doit pas y avoir entre les intensités d'absorption de l'échantillon et de l'étalon un écart de plus de 0,02; des courbes d'absorption de la Vitamine A-alcool et de l'acétate Vitamine A, exprimées comme ci-dessus, peuvent être trouvées dans l'étude de Morton et Stubbs, Biochem. J., 1948, 42, 195.

Pour effectuer la correction prévue sous le point 2, les courbes d'absorption qui ne remplissent pas les conditions ci-dessus, peuvent être corrigées pour éliminer l'absorption accessoire par la méthode géométrique (R.A. Morton et A.L. Stubbs, *The Analyst*, 1946, 71, 348), sous réserve que le maximum d'absorption ne soit pas déplacé par rapport à la longueur d'onde caractéristique.

Si le maximum de la courbe d'absorption se trouve en dehors de la bande de longueur d'onde indiquée, il est nécessaire de purifier le produit avant l'analyse spectrophotométrique. Par exemple, la fraction non-saponifiable de l'huile de foie de morue (*The Soc. of Public Analysts, The Analyst* 1933, 58, 203; *The Assoc. Official Agric. Chem., Methods of Analysis* (6ème édition), 1945, p. 504) donne habituellement des courbes spectrophotométriques normales; l'huile de foie de baleine donne habituellement une fraction normale utilisable spectrophotométriquement après chromatographie (Gridgeman, Gibson et Savidge, *The Analyst*, 1948, 73, 662); et un grand nombre d'huiles de foie de poisson présentent une fraction qui possède une courbe normale après dissolution fractionnée (A. Chevallier et P. Dubouloz, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, 18, 703). La destruction sélective par réaction photochimique de la Vitamine A a également été utilisée avec succès (A. Chevallier et S. Manuel, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, 23, 1203; R.H. Neal, C.H. Haurand et F.H. Luckman, *Industr. Engng. Chem. Anal. Ed.*, 1941, 13, 150).

Dans le cas de certains échantillons à très faible teneur, par exemple le sérum sanguin et certaines denrées alimentaires, il peut être commode d'utiliser l'épreuve colorimétrique moins spécifique. Chaque fois que l'on doit avoir recours à une épreuve de ce genre (trichlorure d'antimoine, dichlorohydrine de glycérine) l'expérience doit être réglée d'après la préparation-étalon internationale. Il ne faut pas perdre de vue, cependant, le fait que si la coloration fournie par l'étalon et l'échantillon n'a pas des teintes correspondantes, l'évaluation de l'activité ainsi déterminée peut être fautive.

III. PROVITAMINE A

1. Etalon international

Le Sous-comité recommande que l'échantillon actuel de carotène pur, ayant les propriétés décrites ci-dessous, soit conservé en tant qu'étalon international de Provitamine A.

2. Définition de l'Unité

Le Sous-comité recommande que l'unité de Provitamine A soit l'activité de 0,6 μ g de la préparation-étalon internationale.

3. Mode de distribution

Le Sous-comité recommande que la préparation-étalon internationale soit distribuée sous forme de solution dans une huile végétale appropriée (identique à celle qui est utilisée pour la Vitamine D, voir ci-dessous) de telle façon que 5 mg. contiennent 1 U.I.

4. Propriétés de l'étalon de Provitamine A

La préparation-étalon de carotène- β ($C_{40}H_{56}$) trans a les caractères suivants :

Point de fusion : 180^o C. (corr.)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 465 m μ = 2290 (benzène) ce qui correspond à un coefficient d'extinction moléculaire de 122.700

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 455 m μ = 2440 (cyclohexane) ce qui correspond à un coefficient d'extinction moléculaire de 130.800

5. Solvant de l'étalon de Provitamine A

Une huile destinée à servir de solvant pour la préparation de la Provitamine A ne doit pas contenir au total plus de 32 parties par million de peroxydes (G.R. Greenbank et G.E. Holm, Industr. Engng. Chem., 1934, 26, 243; C.H. Lea, Dept. Sci. Industr. Res., Food Investigation Spec. Rep. No. 46, 1938, H.M.S.O., Londres), et 0,01 % d'hydroquinone y sera ajouté.

6. Utilisation de l'étalon de Provitamine A

L'existence de deux étalons impose désormais l'utilisation des unités respectives pour exprimer l'activité en Vitamine A et Provitamine A des aliments ou d'autres substances qui ne contiennent que l'une de ces formes.

Il faut se souvenir que lorsque la préparation-étalon de Provitamine A est utilisée dans des titrages biologiques, les résultats dépendent de la combinaison de deux facteurs :

- a) teneur en Provitamine A de la solution en cause;
- b) réponse de l'animal à cette teneur.

D'autre part, si la préparation-étalon est utilisée pour l'application de méthodes de comparaison chimiques ou physiques, la mesure

portera seulement sur la teneur en Provitamine A. Le résultat ne sera probant à proprement parler qu'en l'absence de forme de Provitamine A autre que le carotène- β .

IV. TITRAGE DE LA TENEUR EN VITAMINES DES ALIMENTS

Le Sous-comité estime que la valeur et l'utilité des étalons internationaux de Vitamines seraient plus grande si l'Organisation Mondiale de la Santé et la FAO proposaient des méthodes appropriées pour le titrage des différentes Vitamines dans les aliments et en recommandaient l'emploi généralisé.