

## Методика измерений массовой концентрации (процентного содержания) водорастворимых витаминов (С, В1, В2, В3 (РР), В5, В6, В7, В9, В12) и витамина К3 в витаминных препаратах и премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

ЕСА-МИ-4-01-01-17

Сергей Хатунцев, химик-исследователь  
Ольга Виноградова, к.х.н.  
начальник отдела исследований и разработок,  
ООО «ЕСА Сервис», Санкт-Петербург

28.09.2017

Agilent 1260 Infinity II

### Введение

Состав витаминных обогатительных смесей (премиксов и витаминных препаратов) строго регламентирован и должен тщательно контролироваться, т. к. уровень содержания витаминов является важным показателем качества кормов. Контроль содержания витаминов необходимо проводить как при первоначальной проверке соответствия готовой продукции заявляемым характеристикам, так и при подтверждении постоянства состава премиксов и витаминных концентратов в ходе хранения. Современное состояние методической базы не позволяет выполнять контроль полного перечня необходимых показателей, отражающих качество продукции: существующие официальные методы обеспечивают определение ограниченного числа витаминов и элементов [1]. Разработка и введение современных эффективных подходов к контролю качества

кормовых добавок, в этом контексте, является актуальной задачей и служит первой ступенью для формирования сбалансированного и безопасного рациона кормления домашних животных и птиц.

Учитывая актуальность задачи, компания ЕСА Сервис разработала методику измерений массовых концентраций (процентного содержания) расширенного перечня витаминов группы В (В1, В2, В3/РР, В5, В6, В7, В9, В12), а также витаминов С и К3 в витаминных препаратах и премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

### Показатели точности методики и диапазоны линейности

Витамины	Диапазон линейности, мг/кг	Значение относительной погрешности измерений, %	
		Витаминные препараты	Премиксы
Тиамин (В1)	0,01 – 100	6	18
Рибофлавин (В2)	0,005 – 10	6	15
Никотинамид (РР / В3)	0,03 – 300	6	15
Никотиновая кислота (РР / В3)	0,2 – 200	6	15
Пантотеновая кислота (В5)	0,2 – 200	6	18
Пиридоксин (В6)	0,02 – 100	6	15
Биотин (В7)	0,2 – 100	10	20
Фолиевая кислота (В9)	0,006 – 100	6	18
Цианокоболамин (В12)	30 – 100	10	
	0,2 – 30		25
Аскорбиновая кислота (С)	0,03 – 200	8	25
К3 (в форме менадиона)	50 – 5000	8	15

Таблица1. Показатели точности методики и диапазоны линейности.

## Экспериментальная часть

### Оборудование и расходные материалы

- ВЭЖХ-система с многоволновым УФ-детектором или диодно-матричным детектором, например, Agilent 1260 Infinity II, оснащенная градиентным четырехканальным насосом со встроенным проточным вакуумным дегазатором, термостатом колонок и автодозатором. Противодавление в системе не должно превышать 270 бар при потоке 0,45 см<sup>3</sup>/мин.
- Колонка обращеннофазная ВЭЖХ с сорбентом C18 структуры ядро-оболочка (кат. № 693975-302, InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0x150 мм, 2,7 мкм) с предколоной (кат. № 823750-911, Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3x5 мм, 2,7 мкм, 3 шт./уп.) и префильтром со сменными фритами (кат. № 5067-1551).
- Вакуумный коллектор для проведения твердофазной очистки с использованием картриджей для твердофазной экстракции под разряжением, например, VacElut 20, производства фирмы Agilent (кат. № 12234104).
- Картриджи для твердофазной экстракции Bond Elut C18, 500 мг, 3 мл, производства фирмы Agilent, кат. номер 12102028.

### Образцы

Разработку процедуры и анализ проводили на примере проб витаминных концентратов и премиксов, отобранных с технологической линии действующего завода.

### Реактивы

- Вода деионизованная по ГОСТ Р 52501-2005.
- Ацетонитрил, 0 сорт, осч, например, по ТУ 2634-002-80529938-2015.
- Гексан, осч, ТУ 6-09-3375-78.
- Кислота фосфорная 80 – 90 %, хч, СТП ТУ КОМП 2-308-2011.
- Гидроксид натрия, хч, ГОСТ 4328-77.
- Карбонат натрия, хч, ГОСТ 4332-7.
- Кислота щавелевая, 0,5-водная, осч, СТП ТУ КОМП 3-104-2009.
- Пиросульфит натрия (метабисульфит натрия), CAS 7681-57-4, импортный, не менее 95 %.
- Трилон Б (двухводная динатриевая соль этилендиамина-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты), ч, ГОСТ 10652-73.
- Цианокобальмин (витамин В12) с содержанием основного вещества не менее 99,0 %, например, производства Supelco, кат. № 47869.
- Биотин (витамин В7) с содержанием основного вещества не менее 99,0 %, например, производства Sigma-Aldrich, кат. № В4501.
- Менадион (витамин К) с содержанием основного вещества не менее 99,0 %, например, производства Supelco, кат. № 47775.
- Тиамин гидрохлорид (витамин В1) с содержанием основного вещества не менее 99,0 %, например, производства Sigma-Aldrich, кат. № Т4625.
- Никотинамид (витамин РР) с содержанием основного вещества не менее 99,50 %, например, производства Sigma-Aldrich, кат. № 72340.
- Никотиновая кислота (витамин РР) с содержанием основного вещества не менее 98,0 %, например, производства ООО «НеваРеактив», кат. № EL-59676.
- Кислота аскорбиновая (витамин С) с содержанием основного вещества не менее 99,0 %, например, производства ООО «НеваРеактив», кат. № EL-50817.
- Пиридоксин гидрохлорид (витамин В6) с содержанием основного вещества не менее 99,90 %, например, производства ООО «НеваРеактив», кат. № EL-58560.
- Пантотеновая кислота (витамин В5) с содержанием основного

вещества не менее 99,60 %, например, производства ООО «НеваРеактив», кат. № EL-137086.

- Фолиевая кислота (витамин В9) с содержанием основного вещества не менее 97,0 %, например, производства Sigma-Aldrich, кат. № F7876.
- Рибофлавин (витамин В2) с содержанием основного вещества не менее 99,0 %, например, производства ООО «НеваРеактив», кат. № EL-83885

Примечание: в некоторых источниках никотинамид и никотиновая кислота называются витамином В5, а пантотенат кальция и пантотеновая кислота витамином В3.



Agilent 1260 Infinity II

### Результаты и их обсуждение

Важным параметром, вносящим вклад в достоверность проводимого анализа, является получение представительной пробы для объектов исследования.

Согласно требованиям методики отбор проб проводится в соответствии с существующими нормативными документами [2]. При поступлении средней пробы в лабораторию перед проведением анализа необходимо определить ее влажность [3], поскольку этот показатель нестабилен в течение времени и может вносить существенный вклад в результат измерений. Процедура методики измерений позволяет учитывать показатель влажности в финальных расчетах. Важным фактором является тщательная гомогенизация исследуемого образца с использованием соответствующих измельчительных систем.

Для подготовленной лабораторной пробы витаминного препарата или премикса согласно требованиям методики измерений отбираются две параллельные аналитические навески, для которых проводят процедуру подготовки проб и последующий анализ.

Учитывая различную природу определяемых витаминов, а также различия в матрице (наполнителях) для объектов исследования, разработанная методика включает четыре отдельные процедуры анализа в зависимости от вида витамина и типа анализируемого образца. Процедуры отличаются как способом подготовки проб, так и режимами хроматографического измерения.

Подготовку проб выполняют посредством жидкостной экстракции аналитической навески премикса или витаминного препарата с последующим центрифугированием. Экстракция (растворение) витаминных препаратов не требует сложной процедуры и проводится при комнатной температуре. Разработанная методика учитывает особенности экстракции витаминных препаратов, содержащих в качестве наполнителя зерновую муку и карбонат кальция, а также необходимость контроля pH при экстракции витаминов В2 и В9.

Для премиксов подготовка проб является более длительным и трудоемким процессом: для витаминов группы В необходимо нагревание до 60 – 70 °С, кроме того, необходимо учитывать чувствительность к свету витаминов В12 и С. В методике для различных групп витаминов приведен оптимальный состав экстрагирующих растворов, которые позволяют реализовать экстракцию в кислой и нейтральной средах, а также экстракцию органическими растворителями для витамина К3.

Учитывая невысокое содержание витамина В12 в

премиксах, в процедуру подготовки проб была введена стадия твердофазной очистки экстракта на картридже с сорбентом С18.

Это позволяет избавиться от матричных примесей и дополнительно сконцентрировать витамин В12, что в результате помогает достичь хорошей чувствительности для данного аналита.

Использованные режимы хроматографического анализа в зависимости от природы образца и аналита приведены в таблице 2.

	Процедура 1	Процедура 2	Процедура 3	Процедура 4
Объект	витаминовые препараты, премиксы	премиксы	витаминовые препараты, премиксы	витаминовые препараты, премиксы
Перечень витаминов	В1, В2, РР/В3, В5, В6, В7, В9, (В12)*	В12	С	К3
Режим элюирования	градиентный**	изократический		
Компонент А	50 мМ фосфатный буфер, рН=7,00 с добавкой ацетонитрила 1 %	смесь ацетонитрила и деионизованной воды в соотношении 15:85 (об. %)	50 мМ фосфатный буфер, рН=2,1	смесь ацетонитрила и деионизованной воды в соотношении 40:60 (об. %)
Компонент В	ацетонитрил	—	—	—
Длина волны детектирования, нм	205	361	245	254

Таблица 2. Режимы хроматографического анализа.

\*Примечание — Процедура 1 используется для измерения содержания витамина В12 только в витаминных препаратах.

\*\*Примечание — Программа изменения состава элюента приведена в таблице 3.

Время, мин	Объемная доля компонента, %	
	А	В
0 – 2,7	100	0
2,7 – 3,7	96	4
3,7 – 7,4	90	10
7,4 – 8,4	82	18
8,4 – 10,5	82	18
10,5 – 11,0	100	0
11,0 – 22,0	100	0

Таблица 3. Программа изменения состава элюента для Процедуры 1.

Примеры хроматограмм реальных анализируемых образцов витаминных препаратов и премиксов представлены на рисунках 1 – 3.

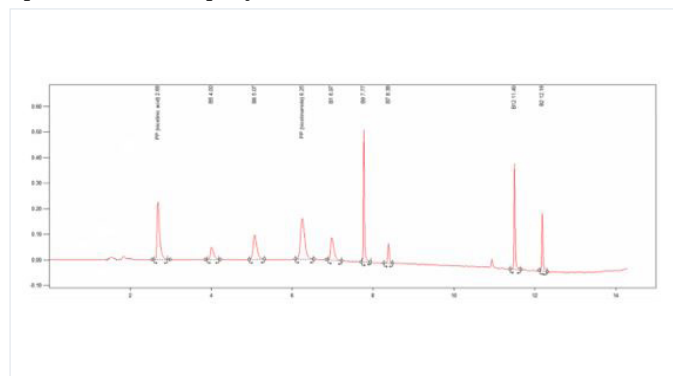


Рис. 1. Хроматограмма градуировочного раствора витаминов группы В с номинальной концентрацией витаминов 10 мг/см<sup>3</sup>. Порядок выхода: В3 никотиновая кислота, В5, В6, В3 никотинамид, В1, В9, В7, В12, В2.

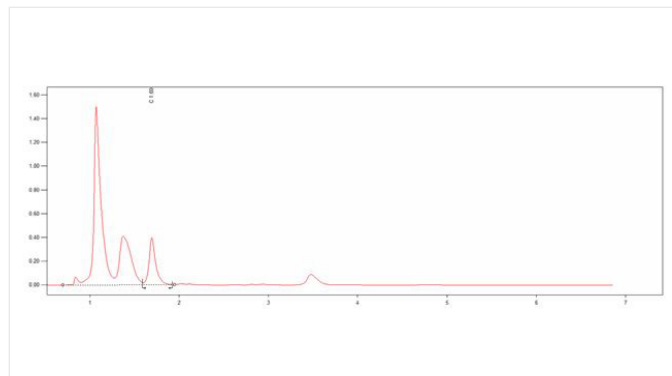


Рис. 2. Хроматограмма витамина С в экстракте реального образца премикса.

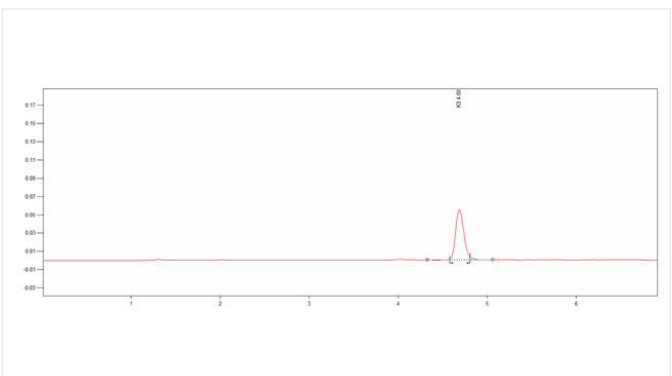


Рис. 3. Хроматограмма витамина К3 в экстракте реального образца премикса.

Идентификацию пиков витаминов на полученных хроматограммах проводят по абсолютным временам удерживания. Расчет массовых концентраций (процентного содержания) витаминов выполняют с использованием метода абсолютной градуировки по ранее определенной градуировочной характеристике.

При расчете концентрации витаминов в образце премиксов необходимо учитывать степень выделения витамина, которая отличается для каждого вида премикса. В связи с этим, степень выделения рекомендуется определять для каждого объекта исследования перед началом работ — при внедрении методики в лаборатории. Процедура определения степени выделения и рекомендации относительно контроля этого параметра приведены в тексте методики. В ходе разработки методики экспериментальные значения степени выделения для исследованных образцов составляли 70 – 100 %.

Для обеспечения точности и правильности измерений методика предписывает ряд процедур для контроля сходимости результатов для двух параллельных аналитических проб и контроля стабильности градуировочной характеристики.

## Заключение

Представляемый метод предлагает процедуру, обеспечивающую комплексный подход к определению содержания наиболее важных водорастворимых витаминов и витамина К3 в витаминных обогатительных препаратах. Метод основан на использовании эффективного оборудования и современных подходах к подготовке проб. Предлагаемая методика не только включает описание экспериментальной процедуры, но и указания по организации процесса анализа в лаборатории для обеспечения требований по внутреннему контролю качества измерений.

## Список литературы

1. ГОСТ 52356-2005 Премиксы. Номенклатура показателей.
2. ГОСТ 13496.0-80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб.
3. ГОСТ 13496.3-92 (ИСО 6496-83) Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения влаги.