ГОСТ Р 50929—96

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРЕМИКСЫ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В

Издание официальное

БЗ 6—96/247

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Акционерным обществом открытого типа «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (АООТ «ВНИИКП»)
Нижегородским государственным техническим университетом

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 4 «Комбикорма, БВД, премиксы»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 июля 1996 г. № 488

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 1996

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Отбор проб 3
4 Определение витамина B_1 3
5 Определение витамина B_2 7
6 Определение витаминов B_1 и B_2 высокоэффективной жидкостной хроматографией 9
7 Определение холинхлорида 14
8 Определение витамина B_5 17
9 Определение витамина B_5 высокоэффективной жидкостной хроматографией 21
10 Требования техники безопасности 30
Приложение А Хроматограмма экстракта из премикса . . . 31
Приложение Б Хроматограмма смеси витаминов B_1 и B_2 . . . 32
Приложение В Хроматограмма экстракта витамина B_5 из премикса 33
Приложение Г Хроматограммы растворов витамина B_5 34
Приложение Д Библиография 35

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов группы В

Premixes. Methods for determination of vitamin B complex

Дата введения 1997—01—01

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий стандарт распространяется на премиксы и устанавливает методы определения витаминов B_1, B_2, холинхлорида, B_5 химическими методами и высокоэффективной жидкостной хроматографией.

2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 61—75 Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 246—76 Гидросульфит натрия технический. Технические условия

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 2603—79 Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4109—79 Бром. Технические условия

ГОСТ 4139—75 Калий роданистый. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Натрий серно-кислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4201—79 Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4206—75 Калий железосинеродистый. Технические условия

ГОСТ 4234—77 Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4530—76 Кальций углекислый. Технические условия

ГОСТ 6016—77 Спирт изобутиловый. Технические условия

ГОСТ 6217—74 Уголь активный древесный дробленый. Технические условия

ГОСТ 6552—80 Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9337—79 Натрий фосфорнокислый 12-водный. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0—80. Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19908—90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

ГОСТ 24104—88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25664—83 Метол (4-метиламинофенол сульфат). Технические условия

ГОСТ 26573.0—85. Премиксы. Технические условия

ГОСТ 27067—86 Аммоний роданистый. Технические условия

ГОСТ 29227—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29228—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 29251—91 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29252—91 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 2. Бюретки без времени ожидания

3 ОТБОР ПРОБ

Отбор проб по ГОСТ 13496.0

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_1

Сущность метода заключается в извлечении витамина B_1 (тиамина) из навески анализируемого продукта раствором серной кислоты, окислении его раствором железосинеродистого калия в тиохром, экстракции окисленной формы из водной фазы изобутиловым спиртом и измерении интенсивности флуоресценции.

4.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Флуорометр Квант-7, ФАНК-1

Аппарат для встряхивания жидкости типа АВУ-1

Колбы мерные 2-50(100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные типа В по ГОСТ 25336.

Пробирки П-1(2)-25-0,2 по ГОСТ 1770.

Шкаф сушильный с терморегулятором, обеспечивающий постоянство температуры (105±2) °С.

Воронки делительные типа ВД вместимостью 100 см³ по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1-100ТХС по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-1(2), 6(7)-1(2)-5(10) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-25(50, 100) по ГОСТ 1770.

Фильтры обеззоленные (красная лента) по нормативному документу [3].

Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 0,1 моль/дм³.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор в соотношении 1:1 (по объему) и раствор молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³.

Калий хлористый по ГОСТ 4234.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 10 %.

Спирт изобутиловый по ГОСТ 6016.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Калий железосинеродистый (красная кровяная соль) по ГОСТ 4206, раствор с массовой долей 1 %.

Хининсульфат или хининхлорид по нормативным документам [9, 10].

Тиминбромид или тиаминхлорид по нормативным документам [16, 17].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

4.2 Подготовка к испытанию

4.2.1 *Приготовление окислительной смеси*

1 см³ свежеприготовленного раствора железосинеродистого калия смешивают с 49 см³ раствора гидроокиси натрия.

Смесь готовят в день проведения анализа.

4.2.2 *Приготовление основного стандартного раствора из хининсульфата*

10 мг хининсульфата растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в растворе серной кислоты и доводят этой кислотой объем до метки. Раствор хранится не более 1 года в склянке из темного стекла.

4.2.3 *Приготовление рабочего стандартного раствора хининсульфата*

Рабочий стандартный раствор готовят непосредственно перед анализом. Для этого 1 см³ основного стандартного раствора (4.2.2) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки раствором серной кислоты.

Концентрация хининсульфата — 1 мкг/см³.

4.2.4 *Приготовление основного стандартного раствора из тиаминбромида*

Взвешивают 10 мг кристаллического тиаминбромида, предварительно высушенного в сушильном шкафу в течение 2—3 ч при температуре 100—105 °С, растворяют его в мерной колбе вместимостью 100 см³ в растворе соляной кислоты молярной концентрации

$c(HCl)$ = 0,01 моль/дм³ и доводят этой кислотой объем до метки. Раствор содержит 100 мг тиамина в 1 см³.

Раствор хранят не более 1 мес в склянке из темного стекла в прохладном месте.

4.2.5 *Приготовление рабочего стандартного раствора тиаминбромида*

Рабочий стандартный раствор готовят непосредственно перед анализом.

1 см³ основного стандартного раствора тиаминбромида (4.2.4) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

Концентрация рабочего стандартного раствора тиаминбромида — 1 мкг/см³.

4.2.6 Контроль за содержанием витамина B_1 в стандартном растворе проводят по 6.2.4.

4.3 Проведение испытания

Навеску премикса массой 5 г, взвешенную с погрешностью не более 0,002 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 5 г хлористого калия и приливают 70 см³ серной кислоты. Затем колбу с реактивами встряхивают на аппарате в течение 10 мин, доводят объем в колбе до метки раствором серной кислоты, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбросив первую порцию фильтрата. Переносят 2 см³ фильтрата в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят до метки раствором серной кислоты. Отбирают 20 см³ разбавленного фильтрата и переносят в делительную воронку, куда приливают 20 см³ изобутилового спирта, тщательно перемешивают в течение 2 мин. После расслоения верхний слой сливают, а нижний — переносят в градуированную пробирку и доводят до объема 20 см³ раствором серной кислоты, перемешивают.

Из пробирки берут 8 см³ раствора в делительную воронку, приливают 6 см³ окислительной смеси (4.2.1), перемешивают, добавляют 20 см³ изобутилового спирта и встряхивают 2 мин. После расслоения нижний водный слой отбрасывают, а верхний (спиртовый) — фильтруют через обезжоленный фильтр (красная лента), пропуская через слой безводного сернокислого натрия (4—5 г) в флуорометрическую пробирку и флуорометрируют.

Для окисления стандартного раствора берут 8 см³ рабочего стандартного раствора тиамина и проводят дальнейшую его обработку, как с испытуемой пробой.

Для гашения флуоресценции в испытуемом и стандартном растворах к ним добавляют по 1—2 капли раствора соляной кислоты в соотношении 1:1 (по объему), перемешивают и измеряют остаточную флуоресценцию.

Если в качестве стандартного раствора используют раствор хининсульфата (или хининхлорида), то его не окисляют и не гасят, так как он имеет одно и то же значение по флуорометру, равное 72.

По стандартному раствору хининхлорида (хининсульфата) настраивают (по инструкции) прибор на деление прибора 80.

4.4. Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_1 X в премиксе, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot V \cdot V_2 \cdot C}{(F - F_1)\, m \cdot V_1 \cdot V_3},$$

где A — показание флуорометра для испытуемого раствора до гашения;

A_1 — показание флуорометра для испытуемого раствора после гашения;

V — первоначальный объем раствора, см³;

V_1, V_2 — разведения, см³;

C — масса витамина в стандартном растворе, мкг;

F — показания флуорометра для стандартного раствора до гашения;

F_1 — показания флуорометра для стандартного раствора после гашения;

m — масса навески, г;

V_3 — объем испытуемого раствора, взятый на испытание, см³.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ расхождения не должны превышать 15 %.

Примечание — При использовании в качестве стандартного раствора хининсульфата (хининхлорида) в расчетную формулу вместо выражения $(F-F_1)$ подставляют цифру 72.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_2

Сущность метода заключается в извлечении витамина B_2 (рибофлавина) из навески путем кислотного гидролиза и измерении интенсивности флуоресценции.

5.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Флуорометр Квант-7, ФАНК-1

pH-метр по нормативному документу [8]

Баня водяная.

Центрифуга ОПН-8

Фильтры обеззоленные (синяя лента) по нормативному документу [3].

Колбы мерные 2-50(100, 1000)-1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-1, 6(7)-1(2)-25 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-100 по ГОСТ 1770.

Кислота уксусная по ГОСТ 61.

Витамин B_2 по нормативному документу [11].

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор с массовой долей 5 % и раствор молярной концентрации c (HCl) = 0,1 моль/дм^3.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 15 %.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 4201.

Натрия гидросульфит по ГОСТ 246.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

5.2 Подготовка к испытанию

5.2.1 *Приготовление основного стандартного раствора витамина B_2*

40 мг витамина B_2 растворяют в дистиллированной воде, подкисленной 10 см^3 ледяной уксусной кислоты, при нагревании до 50 °С в мерной колбе вместимостью 1000 см^3. Доводят объем до метки дистиллированной водой. В 1 см^3 раствора содержится 40 мкг рибофлавина.

Раствор хранят в прохладном, темном месте в склянке из темного стекла не более 2 мес.

5.2.2 *Приготовление рабочего стандартного раствора рибофлавина*

1 см^3 основного стандартного раствора рибофлавина переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой, подкисленной раствором соляной кислоты с массовой долей 5 % до pH 5,5—6,0.

В 1 см^3 раствора содержится 0,4 мкг рибофлавина.

Раствор готовят перед употреблением.

5.2.3 Контроль за содержанием витамина B_2 в стандартном растворе проводят по 6.2.4.

5.3 Проведение испытания

Навеску премикса массой 2—5 г, взвешенную с погрешностью не более 0,002 г помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, приливают 75 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,1 моль/дм^3, смывая частицы премикса со стенок колбы. Колбу помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. Содержимое колбы периодически перемешивают.

После охлаждения колбы pH раствора доводят до значения 5,5—6,0 раствором гидроокиси натрия. Затем объем в колбе доводят дистиллированной водой до метки, хорошо перемешивают и центрифугируют в течение 15 мин при 8000 об/мин.

Из полученного фильтрата готовят раствор с нужным разведением (например, 1 см^3 фильтрата разводят в мерной колбе вместимостью 50 см^3) и определяют интенсивность флуоресценции, помещая в одну флуорометрическую пробирку 12—15 см^3 испытуемого раствора, в другую — такое же количество рабочего стандартного раствора. Затем в эти же пробирки добавляют 2—3 раза по 0,1 г двууглекислого натрия и по 0,1 г гидросульфита натрия или 4—6 капель раствора гидроокиси натрия. Содержимое пробирок осторожно перемешивают, фильтруют, если раствор мутный, и снова измеряют интенсивность флуоресценции на приборе.

5.4 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_2 X в премиксе, г/т, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot C \cdot V \cdot V_2}{(F - F_1) \cdot m \cdot V_1},$$

где A — показания флуорометра для испытуемого раствора до гашения флуоресценции;

A_1 — показания флуорометра для испытуемого раствора после гашения флуоресценции;

C — содержание витамина B_2 в рабочем стандартном растворе, мкг/см³;

V — первоначальный объем раствора, см³;

V_2 — окончательный объем разведения, см³;

F — показания флуорометра для стандартного раствора до гашения флуоресценции;

F_1 — показания флуорометра для стандартного раствора после гашения флуоресценции;

m — масса навески, г;

V_1 — объем раствора, взятый для разведения, см³.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности $P = 0,95$ расхождения не должны превышать 15 %.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ B_1 И B_2 ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Сущность метода заключается в экстракции витаминов B_1 (тиамина) и B_2 (рибофлавина) из навески раствором соляной кислоты и определении их на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором с использованием обращенно-фазного режима элюирования.

Метод применим в диапазоне содержания витамина B_1 от 0,05 до 0,5 г/кг в премиксе, витамина B_2 — от 0,1 до 2 г/кг в премиксе.

6.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный с фотометрическим детектором и систематической погрешностью измерений не выше 10 %. Допускается использовать хроматографы «Цвет-306», «Цвет-3006 со спектрофотометрическим детектором» и «Милихром».

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная высотой 150 мм и диаметром 4 мм с числом теоретических тарелок не менее 2000, заполненная сорбентом «Силасорб С-18» или «Сепарон С-18».

Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 (спектральный диапазон 186—1100 нм).

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Линейка измерительная металлическая по ГОСТ 427.

Секундомер механический по нормативному документу [15]

Сорбент «Силасорб С-18» зернением 7 мкм.

pH-метр по нормативному документу [8]

Мешалка магнитная ММ-5.

Центрифуга лабораторная ЦЭ-2 с числом оборотов 6000 в мин.

Иономер ЭБ-74 со стеклянным электродом ЭСЛ-62-07.

Микрошприц МШ-10 или микропипетка МП-2.

Колбы конические со шлифом вместимостью 100 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2-25(50, 100, 200)-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронка ВФ-1-56(75)ХС или ВФ-2-75(110)ХС со стеклянным фильтром ПОР 100 по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные 6(7)-1(2)-10 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Ацетонитрил по нормативному документу [7]

Натрия октилсульфонат, хроматографически чистый (изготовление Германия, фирма Pylver)

Триэтиламин, перегнанный по нормативному документу [4]

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, концентрированная и раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0,01$ моль/$дм^3$.

Витамин B_2 по нормативному документу [11]

Витамин B_1 по нормативным документам [16, 17]

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

6.2 Подготовка к испытанию

6.2.1 *Приготовление элюента*

Для приготовления 1 $дм^3$ элюента смешивают 120 $см^3$ ацетонитрила с 880 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 2,5 $см^3$ триэтиламина, 0,5 г октилсульфоната натрия и приливают ортофосфорную кислоту до pH 7,6 по pH-метру. Полученную смесь фильтруют через стеклянный фильтр для удаления механических примесей.

Срок хранения элюента не более 1 мес.

6.2.2 *Приготовление раствора-экстрагента*

К 1 дм³ дистиллированной воды прибавляют 0,8 см³ концентрированной (37 %-ной) соляной кислоты, pH раствора 2±0,2.

6.2.3 *Приготовление основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2*

Для приготовления основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2 берут навески 0,1 г тиаминхлорида и 0,01 г рибофлавина. Навеску тиаминхлорида растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³, а рибофлавина — в мерной колбе вместимостью 200 см³, при нагревании до температуры 70—80 °С и доводят дистиллированной водой до метки. Полученные растворы содержат в 1 см³ 1 мг витамина B_1 и 0,05 мг витамина B_2 соответственно.

Срок хранения основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2 — не более 2 недель в холодильнике.

6.2.4 *Контроль за содержанием витаминов B_1 и B_2 в основных стандартных растворах*

Контроль за содержанием витаминов в основных стандартных растворах осуществляют спектрофотометрически по значениям молярных коэффициентов светопоглощения.

Для этого основные стандартные растворы разбавляют дистиллированной водой в 50 раз и измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре в кювете толщиной поглощающего свет слоя 1 см.

Массовую концентрацию витаминов B_1 и B_2 c рассчитывают по формуле

$$c = \frac{50\,D}{E \cdot l},$$

где D — оптическая плотность;

E — молярный коэффициент;

l — толщина слоя раствора, 1 см.

Массовую концентрацию витаминов B_1 c_1 и B_2 c_2, мг/см³, рассчитывают соответственно по формулам:

$$c_1 = \frac{50\,D}{205},$$

$$c_2 = \frac{50\,D}{324},$$

где 205 — молярный коэффициент светопоглощения тиаминхлорида при рабочей длине волны 268 нм;

324 — молярный коэффициент светопоглощения рибофлавина при рабочей длине волны 445 нм.

6.2.5 *Приготовление рабочего стандартного раствора витаминов B_1 и B_2*

Из основных стандартных растворов готовят рабочие стандартные растворы с содержанием витаминов B_1 — 0,02 мг и B_2 — 0,025 мг в 1 см³.

Для этого в мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 1 см³ основного стандартного раствора тиаминхлорида (6.2.3) и 25 см³ основного стандартного раствора рибофлавина (6.2.3), доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор готовят в день испытаний.

6.3 Проведение испытания

6.3.1 *Экстракция витаминов B_1 и B_2*

Навеску премикса массой 1 г, взвешенную с погрешностью не более 0,002 г, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 см³ и приливают 10 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³. Колбу ставят на магнитную мешалку с включением нагрева. Перемешивание и нагрев осуществляют в течение 10 мин. Полученную суспензию переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5000— 6000 об/мин в течение 3 мин. Центрифугат сливают в мерную колбу вместимостью 25 см³. Коническую колбу с остатком раствора смывают небольшим количеством (около 5 см³) раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³, сливают раствор в центрифужную пробирку и снова центрифугируют. Центрифугат соединяют с первым в той же мерной колбе. Промывание центрифугированием повторяют 3—4 раза, каждый раз сливая промывные воды в ту же колбу. После этого раствор в мерной колбе доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют или дополнительно центрифугируют для очищения от механических примесей и взвешенных частиц. Приготовленный раствор используют для хроматографического анализа.

6.3.2 *Хроматографирование*

Хроматографирование осуществляют в следующих условиях. Разделение проводят на колонке 4 × 150 мм, заполненной сорбентом (6.2.4).

Подвижная фаза — элюент (6.2.1).

Рабочая длина волны спектрофотометрического детектора хроматографа 254 нм. Скорость элюирования — 1,2 см^3/мин. Время удерживания для витамина B_1 составляет 6 мин, а для витамина B_2 — 8 мин. Объем загрузки анализируемого раствора — 10 мкдм^3. Для насыщения колонки в начале работы производится 3—5 загрузок, отмечая высоты пиков. При достижении постоянной высоты можно приступить к испытаниям. Анализируемые растворы хроматографируют каждый по три раза в одинаковых условиях. В этих же условиях хроматографируют рабочие стандартные растворы витаминов B_1 и B_2.

Измеряют высоты пиков, как расстояние от вершины пика до линии проведенной в основании пика (приложение А, рисунок А.1 и приложение Б, рисунок Б.1).

6.4 Обработка результатов испытания

Содержание витаминов B_1 и B_2 X_1 и X_2 в премиксе, г/т, вычисляют по формуле

$$X_1\,(X_2) = \frac{h_x\, c_{cm}\, V_x}{h_{cm}\, m},$$

где h_x — высота пика витамина на хроматограммах экстракта из премикса, мм;

c_{cm} — массовая концентрация витамина в рабочем стандартном растворе, мг/см^3;

V_x — объем премикса с экстрактом, см^3;

h_{cm} — высота пика витамина на хроматограммах рабочего стандартного раствора, мм;

m — масса навески премикса, г.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лаборатори-

ях при доверительной вероятности $P = 0,95$ расхождения не должны превышать 15 %.

7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛИНХЛОРИДА

Сущность метода заключается в экстракции холинхлорида дистиллированной водой, образовании в присутствии трехзамещенного фосфата натрия комплекса рейнеката холинхлорида и измерении интенсивности окраски его ацетоновых растворов спектрофотометрически.

7.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Фотоэлектроколориметр - ФЭК-56М, КФК или спектрофотометр типа СФ-26.

Насос вакуумный по ГОСТ 25336.

Центрифуга ОПН-8.

Колбы конические вместимостью 50—100 см³ по ГОСТ 25336.

Эксикатор вакуумный по ГОСТ 25336.

Стаканы химические вместимостью 200- 250 см³ по ГОСТ 25336.

Баня водяная.

Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 100 и 250 см³ по ГОСТ 25336.

Воронка ВФО-40-ПОР-16 (Шотта № 2) по ГОСТ 25336.

Аппарат для встряхивания жидкости типа АВУ-1.

Колбы мерные 2-25(100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 4(5)-1(2)-2, 6(7)-1(2)-5(10, 25) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндр мерный 1(2,3, 4)-100 по ГОСТ 1770.

Фильтры обеззоленные (синяя лента) по нормативному документу [3].

Холинхлорид кристаллический по нормативному документу [18].

Спирт этиловый по ГОСТ 18300.

Натрий фосфорнокислый 12-водный по ГОСТ 9337, раствор с массовой долей 0,1 %.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Спирт изопропиловый по нормативному документу [1].

Рейнекат аммония по нормативному документу [5]

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

7.2 Подготовка к испытанию

7.2.1 *Приготовление осаждающего реактива*

2 г рейнеката аммония растворяют в 100 см³ этилового спирта в конической колбе при нагревании на водяной бане при температуре (40±2) °С в течение 20 мин. После охлаждения раствор фильтруют через обеззоленный складчатый фильтр. Раствор готовят в день определения.

7.2.2 *Приготовление стандартного раствора холинхлорида*

0,1 г кристаллического холинхлорида высушивают до постоянной массы в вакуум-эксикаторе и растворяют его в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³. Доводят до метки дистиллированной водой. Стандартный раствор содержит 1 мг холинхлорида в 1 см³.

Допускается приготовление стандартного раствора из 70 %-ного раствора холинхлорида с пересчетом на 100 %-ную активность.

7.2.3 *Построение градуировочного графика*

В 5 конических колб вместимостью 50 см³ помещают 1, 2, 5, 7, 10 см³ стандартного раствора холинхлорида соответственно добавляют 10 см³ раствора фосфата натрия и 5 см³ раствора рейнеката аммония и далее проводят все испытания по 7.2.4. Интенсивность окрашенных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или спектрофотометре при длине волны 526 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно ацетона и на основании его показаний строят градуировочный график.

7.2.4 *Проведение испытания*

Навеску премикса массой 1—5 г, взвешенную с погрешностью не более 0,002 г, вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, приливают 50 см³ дистиллированной воды, нагревают до 80 °С и встряхивают на аппарате 15 мин. Охлаждают колбу, объем доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют через обеззоленный складчатый фильтр в стакан. Отбирают 5—20 см³ фильтрата в колбу с притертой пробкой, приливают 10 см³ раствора фосфорнокислого натрия и 5 см³ раствора рейнеката аммония. Колбу с содержимым встряхивают и оставляют на 2 ч при температуре 4 °С. После выпадения кристаллов холинхлорида раствор фильтруют на воронке Шотта № 2 с асбестовым слоем, используя вакуумный насос. Кристаллы, оставшиеся на фильт-

ре, промывают 4—5 порциями (по 5 см³) охлажденного изопропилового спирта (спирт хранится в холодильнике до полного использования). Меняют колбу и растворяют кристаллы ацетоном, приливая его в три приема по 7 см³, каждый раз осторожно размешивая верхний асбестовый слой с осадком.

Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу вместимостью 25 см³. Объем доводят в колбе ацетоном до метки. Интенсивность окрашенных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или спектрофотометре при длине волны 526 нм в кюветах толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно ацетона.

7.3 Обработка результатов испытания

Содержание 70 %-ного холинхлорида X в премиксе, г/т, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{K\,1{,}43\,V}{m \cdot V_1},$$

где K — масса холинхлорида, найденная по градуировочному графику, мм;

1,43 — коэффициент пересчета на 70 %-ный раствор холинхлорида;

V — общий объем экстракта, см³;

m — масса навески, г;

V_1 — объем раствора, взятый на проведение анализа, см³.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ расхождения не должны превышать 15 %.

8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_5

Сущность метода заключается в кислотном гидролизе связанных форм витамина B_5 (никотиновой кислоты), очистке гидролизата, получении окрашенного раствора и колориметрическом определении в сравнении со стандартным раствором.

8.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Фотоэлектроколориметр типа ФЭК-56, КФК или спектрофотометр типа СФ-26 или аналогичные с диапазоном длин волн 400—440 нм.

Баня водяная.

Баня ледяная.

Воронка Бюхнера № 3 или № 4 по ГОСТ 9147.

Палочки стеклянные.

Стакан химический вместимостью 1 и 2 $дм^3$ по ГОСТ 25336.

Склянки из темного стекла.

Колбы конические вместимостью 250 $дм^3$ по ГОСТ 25336.

Бюретка 1—2—25 по ГОСТ 29251 и ГОСТ 29252.

Фильтры обеззоленные (красная и синяя ленты) по нормативному документу [3].

Колбы мерные 2-100(500, 1000)-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Пипетки 1(2, 4, 5)-1(2)-1(2), 6(7)-1(2)-5(10, 25) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Пробирки с притертой пробкой вместимостью 15 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Цилиндры мерные 1(2, 3, 4)-50(100, 500) по ГОСТ 1770.

Бром по ГОСТ 4109.

Калий роданистый по ГОСТ 4139 или аммоний роданистый по ГОСТ 27067, растворы с массовыми долями 1 и 10 %.

Кальций углекислый по ГОСТ 4530.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0{,}5$ моль/$дм^3$ (0,5 н.).

Кислота серная по ГОСТ 4204, растворы с молярными концентрациями $c(^1/_2\ H_2SO_4)=2$ моль/$дм^3$ и $c(^1/_2\ H_2SO_4)=10$ моль/$дм^3$.

Витамин B_5 по нормативному документу [12].

Метол по ГОСТ 25664, раствор с массовой долей 6 %.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, растворы молярных концентра-

ций c (NaOH) = 4 моль/дм^3 и c (NaOH) = 10 моль/дм^3.

Спирт этиловый по ГОСТ 18300.

Уголь активный по ГОСТ 6217.

Фенолфталеин по нормативному документу [6]

Цинк сернокислый по ГОСТ 4174, раствор с массовой долей 80 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. и ч. д. а.

8.2 Подготовка к испытанию

8.2.1 *Перекристаллизация метола*

500 см^3 раствора серной кислоты молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 0,1 моль/дм^3 нагревают до кипения, добавляют 100 г метола и снова доводят до кипения. Если раствор сильно окрашен, к нему добавляют 10 г активного угля. Кипящий раствор быстро фильтруют через предварительно нагретую (кипящей водой) воронку Бюхнера, фильтрат переносят в большой химический стакан, приливают 0,7 дм^3 этилового спирта (96°), размешивают, помещают в ледяную баню и оставляют на несколько часов в темном месте.

Выпавшие в осадок кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают на фильтре 2—3 раза этиловым спиртом, порциями по 30—40 см^3 и высушивают на воздухе в темном месте.

Подготовленный метол хранят в склянке из темного стекла в холодильнике до полного использования.

8.2.2 *Приготовление раствора метола*

Навеску перекристаллизированного метола массой (8±0,002) г вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки раствором соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = = 0,5 моль/дм^3. Раствор готовят перед употреблением.

8.2.3 *Приготовление бромной воды*

В темную склянку с притертой пробкой 100 см^3 дистиллированной воды, добавляют в вытяжном шкафу 4—5 см^3 брома, хорошо встряхивают и оставляют на 1—3 сут для лучшего насыщения воды бромом. Бромную воду охлаждают в емкости со льдом в течение 30 мин.

8.2.4 *Приготовление роданбромидного раствора*

К 30 см^3 охлажденной бромной воды по каплям прибавляют раствор роданистого калия или роданистого аммония с массовой долей 10 % до светло-желтого окрашивания. Затем по каплям прибавляют

эти же растворы с массовой долей 1 % до полного обесцвечивания бромной воды. К обесцвеченному раствору постепенно, небольшими порциями, по 20—50 мг, добавляют углекислый кальций до прекращения выделения пузырьков газа.

Раствор фильтруют от осадка через обеззоленный фильтр с синей лентой в склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят на холоде. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

8.2.5 *Приготовление основного стандартного раствора витамина B_5*

(500±0,002) мг витамина B_5 помещают в мерную колбу вместимостью 500 см³, добавляют 200 см³ дистиллированной воды, 5 см³ раствора серной кислоты молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4)=10 моль/дм³ и после растворения кристаллов доводят объем дистиллированной водой до метки.

В 1 см³ раствора содержится 1000 мкг витамина B_5.

Раствор годен к употреблению в течение 6 мес при хранении в холодильнике.

8.2.6 *Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_5*

5 см³ основного стандартного раствора витамина B_5 разводят дистиллированной водой в колбе вместимостью 1 дм³, доводят до метки этой же водой и тщательно перемешивают. В 1 см³ раствора содержится 5 мкг витамина B_5. Раствор готовят в день проведения анализа.

8.3 Проведение испытания

Навеску массой 5 г, взвешенную с погрешностью не более 0,002 г, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, смывая горлышко колбы 60—65 см³ раствора серной кислоты молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 2 моль/дм³. Содержимое перемешивают и колбу помещают в кипящую водяную баню на 40 мин, периодически перемешивая содержимое. По окончании гидролиза колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят объем дистиллированной водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 5—10 см³ фильтрата.

Отбирают 10—20 см³ фильтрата в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Затем 25 см³ полученного раствора помещают в цилиндр вместимостью 50 см³, добавляют 1—2 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют,

внося по каплям раствор гидроокиси натрия молярной концентрации c (NaOH) = 10 моль/дм^3 до получения слабо-розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 2 моль/дм^3, добавляя по каплям до исчезновения розового окрашивания. Раствор охлаждают, добавляют 2 см^3 раствора сернокислого цинка и 1—2 капли этилового спирта (для устранения пены).

Из пипетки по каплям добавляют раствор гидроокиси натрия молярной концентрацией c(NaOH) = 4 моль/дм^3, одновременно перемешивая палочкой до образования осадка и появления бледно-розового окрашивания раствора. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 2 моль/дм^3 (до исчезновения розового окрашивания) и оставляют стоять в течение 10 мин, периодически перемешивая. Палочку вынимают, обмывают над цилиндром дистиллированной водой и доводят объем до 50 см^3, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

Цветную реакцию проводят в восьми пробирках с притертыми пробками: в одну пробирку вносят 5 см^3 дистиллированной воды (контроль на реактивы, B_1); в три пробирки вносят по 5 см^3 рабочего стандартного раствора, B; в четыре пробирки вносят по 5 см^3 полученного фильтрата, из них 2 пробирки, с испытуемым раствором A; две — поправка на аминореагирующие вещества, A_1.

Все пробирки, кроме A_1, помещают на 5 мин в водяную баню при температуре (50±2) °С. После этого в 2 пробирки (A_1) вносят по 2 см^3 дистиллированной воды, а во все остальные пробирки — по 2 см^3 роданбромидного раствора из бюретки в вытяжном шкафу. Пробирки закрывают пробками, перемешивают и помещают в баню при той же температуре на 10 мин. По истечении этого времени пробирки вынимают, охлаждают водой до комнатной температуры и ставят на 10 мин в темное место. Затем в каждую пробирку приливают по 3 см^3 раствора метола, перемешивают и оставляют на 1 ч в темном месте при комнатной температуре. По истечении этого времени растворы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, если они мутные, и колориметрируют на фотоэлектроколориметре (синий светофильтр) или спектрофотометре при длине волны 400 –440 нм в кювете толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно дистиллированной воды.

8.4 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_5 X в премиксе, г/т, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{(A - A_1)\ V\ V_2\ V_4\ C}{(B - B_1)\ m\ V_1\ V_3\ V_5},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора (среднее из двух параллельных определений);

A_1 — оптическая плотность раствора - поправки на аминореагирующие вещества (среднее из двух параллельных определений);

V — объем гидролизата, см³;

V_2 — объем разведения, см³;

V_4 — объем раствора после обработки сернокислым цинком, см³;

C — масса витамина B_5 в измеряемом стандартном растворе, мкг;

B — оптическая плотность стандартного раствора (среднее из трех параллельных определений);

B_1 — оптическая плотность раствора — контроль на реактивы;

m — масса навески премикса, г;

V_1 — объем, взятый на дополнительное разведение, см³;

V_3 — объем гидролизата, взятый на обработку сернокислым цинком, см³;

V_5 — объем раствора, взятый для проведения цветной реакции, см³.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые, расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях, при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ расхождения не должны превышать 15 %.

9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_5 ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

9.1 Определение витамина B_5 с применением жидкостного микроколоночного хромато-

графа отечественного производства марки «Милихром».

Сущность метода заключается в экстракции витамина В5 (никотиновой кислоты) из навески премикса раствором соляной кислоты и последующем определении его содержания в испытуемом растворе с помощью хроматографа «Милихром».

9.1.1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром» со спектрофотометрическим детектором (спектральный диапазон от 190 до 360 нм).

Колонка хроматографическая размером 2 × 120 мм с числом теоретических тарелок не менее 4000, заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб С18, Силасорб SPHC 18, Сепарон С18.

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Колбы конические КН-100, КН-200 по ГОСТ 19908.

Баня водяная с терморегулятором.

Пипетки 2-1(2)-1, 2-1(2)-5, 2-1(2)-10 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Колбы мерные 2-50-1(2), 2-100-1(2), 2-200-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронка ВФ-1-40-ПОР 16-ХС по ГОСТ 25336.

Воронка 71 по ГОСТ 19908.

Стакан ВН-50, ВН-200 по ГОСТ 19908.

pH-метр по нормативному документу [8]

Цилиндр мерный 2-50, 2-100 по ГОСТ 1770.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 40 %.

Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 5 моль/дм^3.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, с массовой долей 95 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации c (HCl) = 0,1 моль/дм^3.

Витамин B_5 по нормативному документу [12].

Фенолфталеин по нормативному документу [6].

Триметиламин по нормативному документу [2].

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

9.1.2 *Подготовка к испытанию*

9.1.2.1 Приготовление элюента для хроматографии

Трехкомпонентный элюент готовят смешиванием уксусной кислоты, дистиллированной воды и триметиламина в объемном соотношении 3:95:2. Для этого в мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят пипеткой 15 см^3 концентрированной уксусной кислоты, затем цилиндром вносят 100 см^3 дистиллированной воды и перемешивают. Добавляют 10 см^3 триметиламина, перемешивают, доводят до метки дистиллированной водой и снова тщательно перемешивают. Приготовленный раствор фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16 и помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой. Полученный элюент хранят не более 1 мес в холодильнике.

9.1.2.2 Подготовка хроматографической колонки

Через колонку пропускают элюент в количестве 20—30 свободных объемов колонки, т. е. два полных шприца насоса хроматографа при расходе элюента сначала 50 мкдм^3/мин, а затем 100 мкдм^3/мин. Промывку колонки заканчивают при получении стабильной нулевой линии.

После стабилизации колонки проводят ее насыщение витамином B_5. Для этого выполняют 7—10 анализов более концентрированного градуировочного раствора витамина B_5. Насыщение колонки прекращают, когда расхождение между последовательными определениями не превышает 3,0 %.

9.1.2.3 Приготовление раствора серной кислоты молярной концентрации c ($^1/_2$ H_2SO_4) = 5 моль/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 30—40 см^3 дистиллированной воды и добавляют 14,2 см^3 концентрированной серной кислоты. Осторожно перемешивают и добавляют еще 35—40 см^3 дистиллированной воды. Когда раствор остынет до комнатной температуры, осторожно доводят объем дистиллированной водой до метки.

9.1.2.4 Построение градуировочного графика

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,1 г витамина B_5 и приливают 70 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,1 моль/дм^3. Колбу помещают в водяную баню и нагревают в течение 10 мин при температуре 75 °С. Затем охлаждают и содержимое количественно переносят в химический стакан вместимостью 200 см^3. Добавляют 1—2 капли 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина, раствор гидроокиси натрия с массовой долей 40 % до

образования розового окрашивания, избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации $c(^1/_2\ H_2SO_4) =$ $= 5$ моль/дм^3. Раствор фильтруют через бумажный фильтр с синей полосой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой. Получают основной стандартный раствор витамина B_5 массовой концентрации 1 мг/см^3. Из этого раствора готовят рабочие растворы, содержащие 0,4; 0,8; 1,0, 1,5; 2,0; 3,0 мг витамина B_5 в 50 см^3. Для этого соответственно 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 и 3,0 см^3 основного раствора помещают в 6 мерных колб вместимостью 50 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

Рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе при следующих условиях:

хроматографическая колонка 2 × 120 мм;

сорбент — Силасорб С 18, Силасорб SPH С 18, Сепарон С 18;

трехкомпонентный элюент на основе уксусной кислоты;

объем пробы — 6 мкдм^3;

длина волны — 260 нм;

скорость подачи элюента — 80—100 мкдм^3/ мин;

постоянная времени — 0,2 с.

Удерживаемый объем пика витамина В5 — 560—580 мкдм^3 (может меняться в зависимости от длины колонки и плотности ее заполнения. Каждый раствор хроматографируют 2 раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 150—200 мкдм^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Значение средних высот хроматографических пиков (в единицах оптической плотности с. о. п.) откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс — количество витамина в 50 см^3 раствора.

Градуировочный график строят так же, откладывая по оси ординат средние высоты хроматографических пиков, выраженные в единицах длины (миллиметрах).

Построение градуировочного графика можно заменить расчетом коэффициентов наклона K, мг/с. о. п., по формуле

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n},$$

где K_i — коэффициент наклона градуировочного графика для i-го градуировочного раствора, мг/е. о. п.;

n — количество точек, по которым строится градуировочный график.

Значение коэффициента наклона градуировочного графика K, мг/е. о. п. или мг/мм, вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{C_i}{h_i},$$

где C_i — содержание витамина в соответствующем i-м градуировочном растворе,

h_i — высота i-го хроматографического пика, е. о. п. или мм.

9.1.2.5 Проверка градуировочного графика

Градуировочный график контролируют не реже 1 раза в неделю. Для этого 1—2 рабочих раствора витамина следует анализировать, как указано в 9.1.2.4.

Отклонение полученных результатов от измеренных в момент построения градуировочного графика a, %, определяют по формуле

$$a = \frac{h_1 - h_2}{h_1} \times 100,$$

где h_1, h_2 — высота хроматографического пика, определенная при построении градуировочного графика и в момент проверки соответственно, е. о. п. или мм.

При отклонении результатов более чем на 5 % строят новый градуировочный график.

Градуировочные растворы хранят в холодильнике в стеклянной посуде с притертой пробкой. Срок годности растворов не более 1 мес.

9.1.3 *Проведение кислотного гидролиза*

Навеску премикса массой 1—5 г, взятую с погрешностью не более 0,001 г, помещают в коническую колбу вместимостью 100 см³ и добавляют 3 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрации с (HCl) = 0,1 моль/дм³. Колбу нагревают на водяной бане при температуре (75±1) °С в течение 10 мин, охлаждают, содержимое колбы количественно переносят в химический стакан вместимостью 200 см³. Добавляют 1—2 капли спиртового раствора фенолфталеина с массовой

долей 1 % и раствор гидроокиси натрия с массовой долей 40 % до образования розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации $c(^1/_2\ H_2SO_4) = 5$ моль/дм^3. После 10-минутного выдерживания раствор фильтруют через обеззоленный фильтр с синей лентой в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

9.1.4 *Хроматографирование*

Полученный экстракт хроматографируют, как в 9.1.2.4. Для определения содержания витамина B_5 в премиксах проводят 2 параллельных анализа, начиная со взятия навески. Каждый экстракт хроматографируют два раза, находят среднеарифметическое значение высоты пиков в единицах оптической плотности или миллиметрах и по градуировочному графику определяют содержание витамина в миллиграммах, приложение В, рисунок В.1.

9.1.5 *Обработка результатов испытания*

Содержание витамина B_5 X в премиксе, мг/кг, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C}{m},$$

где C — содержание витамина, найденное по градуировочному графику, мг;

m — навеска премикса, г.

При использовании коэффициента наклона K вместо градуировочного графика содержание витамина B_5 в премиксе, мг/г, вычисляют по формуле

$$X = \frac{K\,A}{m},$$

где K — коэффициент наклона градуировочного графика, мг/е. о. п.;

A — высота хроматографического пика, е. о. п.;

m — масса навески премикса, г.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности $P = 0,95$ расхождения не должны превышать 15 %.

9.2 Определение витамина B_5 с применением жидкостных хроматографов импортного производства

Сущность метода заключается в экстракции витамина B_5 из навески премикса раствором соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³ и хроматографическом анализе его содержания в испытуемом растворе с использованием жидкостного хроматографа со спектрофотометрическим детектором.

Метод применим в диапазоне содержания витамина B_5 от 0,2 до 4 г/кг премикса.

9.2.1 *Аппаратура, материалы и реактивы*

Хроматограф жидкостный с фотометрическим детектором при спектральном диапазоне от 200 до 300 нм. Возможно использование детектора при постоянной длине волны 254 нм.

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная высотой 150—200 мм и диаметром 2,6—4,6 мм с числом теоретических тарелок не менее 3000 на 1 м, заполненная сорбентом «Силосорб С-18» или «Сепарон С-18» с зернением 7,5 мкм.

Весы лабораторные не ниже 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Центрифуга лабораторная ЦЭ-2 с числом оборотов 6000 в минуту.

Колбы мерные 2-50(100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Иономер ЭВ-74 со стеклянным электродом ЭСЛ-63-07.

Пипетка 4-1(2)-1 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Ацетонитрил по нормативному документу [7]

Тетрабутиламмоний хлористый по нормативному документу [14]

Тетрабутиламмоний бромистый по нормативному документу [13]

Витамин B_5 по нормативному документу [12]

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Примечания

1 Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

9.2.2 *Подготовка к испытанию*

9.2.2.1 Приготовление элюента для хроматографии

В колбе вместимостью 1 дм³ смешивают 120 см³ ацетонитрила с 880 см³ дистиллированной воды, добавляют (2±0,002) г хлористого (бромистого) тетрабутиламмония. Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр для удаления механических примесей и помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой.

Полученный раствор можно хранить в течение 1 мес.

9.2.2.2 Приготовление раствора экстрагента

Для экстракции витамина B_5 используют раствор соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³, который готовят прибавлением к 1 дм³ дистиллированной воды 0,6 см³ концентрированной 37 %-ной соляной кислоты. Значение pH должно быть 2±0,2.

9.2.2.3 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_5

Навеску витамина B_5 массой 0,1 г взвешенную с погрешностью не более 0,002 г, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³ и доводят до метки этой же водой. Полученный раствор содержит 1 мг витамина B_5 в 1 см³.

Раствор хранят в холодильнике до полного использования.

9.2.2.4 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_5

Рабочий стандартный раствор никотиновой кислоты готовят в зависимости от предполагаемого содержания ее в премиксе по таблице 1. Рабочий стандартный раствор готовят в день проведения контроля.

Таблица 1

Концентрация рабочего стандартного раствора, мг/см³	Количество основного стандартного раствора, необходимое для разбавления, см³	Вместимость мерной колбы для разведения, см³	Предполагаемое содержание витамина B_5 в 1 кг премикса, г
0,04	2	50	2—3
0,02	1	50	1—2
0,01	1	100	Менее 1

9.2.3 *Проведение испытания*

9.2.3.1 Экстрагирование

Навеску премикса массой 1 г, взвешенную с погрешностью не более 0,002 г, помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, приливают $^{2}/_{3}$ объема раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 моль/дм³, перемешивают и оставляют стоять в течение 20 мин, несколько раз при этом перемешивая, после чего доводят до метки тем же раствором. Полученную суспензию перемешивают и часть отливают в центрифужную пробирку, центрифугируют в течение 5 мин при 6000 об/мин. Полученный центрифугат используют для хроматографического анализа.

9.2.3.2 Хроматографирование

Хроматографирование осуществляют при следующих условиях: колонка, заполненная сорбентом, подвижная фаза — элюент по 9.2.2.1, рабочая длина волны спектрофотометрического детектора 262 нм (или 254 нм), скорость элюирования — 1,5 см³/мин, температура — комнатная. При данных условиях проводят 3—5 загрузок стандартного раствора по 5 мкдм³, отмечая время выхода пика витамина B_5 в секундах и высоту пика относительно базисной линии. При достижении постоянной высоты можно приступать к контролю. Загружают по 3 раза в одинаковых условиях 5—10 мкдм³ стандартного раствора витамина массовой концентрации 0,01—0,04 мг в 1 см³ в зависимости от состава премикса (10 мкдм³ раствора массовой концентрации 0,01—0,02 мг/см³ или 5 мкдм³ раствора массовой концентрации 0,04 мг/см³) и экстракт премикса после центрифугирования. По времени выхода определяют пик витамина B_5 в экстракте и измеряют высоту пика, как расстояние от вершины пика до линии проведенной в основании пика (приложение Г рисунок Г.1). Измеряя и сравнивая высоты пиков на хроматограммах, вычисляют содержание витамина B_5 в премиксах.

9.2.3.3 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_5 X в премиксе, г/кг, вычисляют по формуле

$$X = \frac{c_{ст} h_x V}{h_{ст} m},$$

где $c_{ст}$ — концентрация витамина B_5 в рабочем стандартном растворе, мг/см³;

h_x — высота пика витамина B_5 на хроматограмме испытуемого раствора, мм;

V — общий объем экстракта, см^3;

$h_{ст}$ — высота пика витамина B_5 на хроматограмме рабочего стандартного раствора, мм;

m — масса навески, г.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности $P = 0,95$ расхождения не должны превышать 15 %.

10 ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

10.1 Работы с концентрированными кислотами, щелочами и др. летучими веществами должны проводиться в вытяжном шкафу.

10.2 Необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с электроприборами.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

ХРОМАТОГРАММА ЭКСТРАКТА ИЗ ПРЕМИКСА

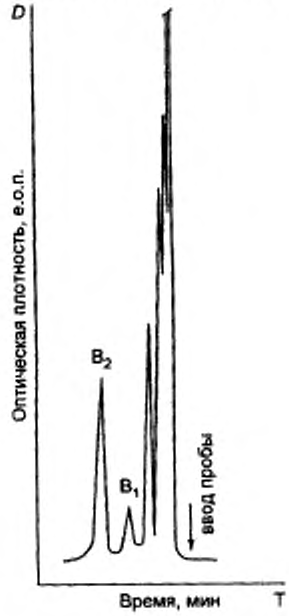


Рисунок А.1 —
Хроматограмма
экстракта из премикса

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

ХРОМАТОГРАММА СМЕСИ ВИТАМИНОВ B_1 И B_2

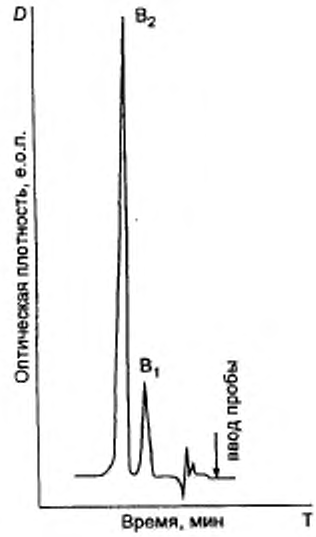


Рисунок Б.1 — Хроматограмма смеси витаминов B_1 и B_2

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(справочное)

ХРОМАТОГРАММА ЭКСТРАКТА ВИТАМИНА B_5 ИЗ ПРЕМИКСА

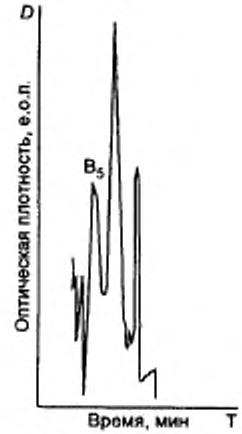


Рисунок В.1 — Хроматограмма экстракта витамина B_5 из премикса

ПРИЛОЖЕНИЕ Г
(справочное)

ХРОМАТОГРАММЫ РАСТВОРОВ ВИТАМИНА B_5

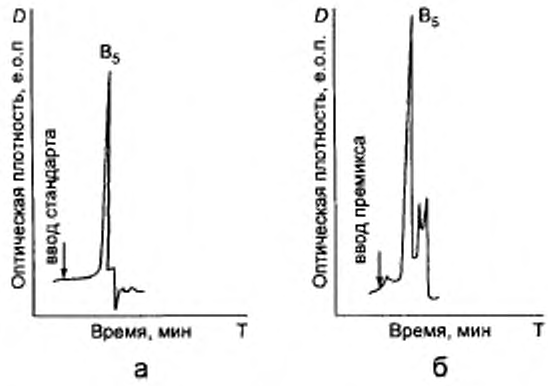


Рисунок Г.1 — Хроматограммы: *а* — стандартного раствора; *б* — экстракта из премикса

ПРИЛОЖЕНИЕ Д
(информационное)

БИБЛИОГРАФИЯ

[1] ТУ 6—09—402—87 2 пропанол (изопропиловый спирт) химически чистый
[2] ТУ 6—09—11—2021—87 Триметиламин
[3] ТУ 6—09—1678—86 Фильтры обеззоленные (белая, красная, синяя ленты)
[4] МРТУ 6—09—2437—65 Триэтиламин
[5] ТУ 6—09—08—944—83 Рейнекат аммония
[6] ТУ 6—09—53—60—87 Фенолфталеин (индикатор)
[7] ТУ 6—09—06—1092—83 Ацетонитрил. Технические условия
[8] ТУ 25—7416—0171—88 pH-метр типа pH-155
[9] ГФ СССР—X ст. 149 Хининсульфат
[10] ГФ СССР—X ст. 147 Хинингидрохлорид
[11] ГФ СССР—X ст. 585 Рибофлавин (витамин B_2)
[12] ГФ СССР—X ст. 19 Никотиновая кислота (витамин B_1)
[13] МРТУ 6—09—105—62 Тетрабутиламмоний бромистый
[14] МРТУ 6—09—5351—68 Тетрабутиламмоний хлористый
[15] ТУ 25—1894.003—90 Секундомер СОС ПР-2А-3—000
[16] ГФ СССР—X ст. 673 Тиаминбромид
[17] ГФ СССР—X ст. 674 Тиаминхлорид
[18] ГФ X ст. 42—1997—93 Холинхлорид

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120.19 С19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: премикс, метод, контроль, витамины, экстракция, флуоресценция, хроматограмма

Редактор *Т. П. Шашина*
Технический редактор *Н. С. Гришанова*
Корректор *Е. Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *В. И. Матюшенко*

Изд. лиц № 021007 от 10.08.95. Сдано в набор 15.08.96. Подписано в печать 11.10.96.
Усл. п. л. 2,33. Уч.-изд. л. 2,05. Тираж 258 экз. С 3901. Зак. 1238.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Калужской типографии стандартов на ПЭВМ.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256.
ПЛР № 040138

gost.e-ecolog.ru