

Metodo HPLC a rilevazione spettrofotometrica UV per la determinazione della vitamina K₃ negli alimenti per animali

1 *Scopo e campo di applicazione*

Il metodo consente la determinazione della vitamina K₃ (menadione) e dei suoi derivati commerciali idrosolubili [menadione sodio-bisolfito (MSB), complesso menadione sodio-bisolfito (MSBC), menadione nicotinamide bisolfito (MNB), menadione pirimidinolo bisolfito (MPB)], negli alimenti per animali e nelle premiscele, con un limite di rilevazione (LOD) di 1,2 mg/kg ed un limite di quantificazione (LOQ) di 3,8 mg/kg.

Il contenuto in vitamina K₃ viene espresso in mg/kg.

AVVERTENZA- l'utilizzo del presente metodo può richiedere l'uso di sostanze pericolose o l'esecuzione di operazioni che comportano un certo rischio. Il presente metodo non ha lo scopo di affrontare tutti i problemi di sicurezza connessi col suo impiego, l'utilizzatore è responsabile della definizione di procedure di sicurezza appropriate e del rispetto della legislazione vigente.

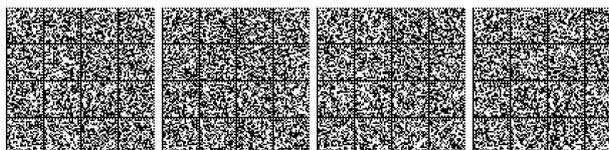
2 *Principio*

Il menadione viene estratto con cloroformio in ambiente basico.

Dopo neutralizzazione, il contenuto di menadione viene determinato per cromatografia liquida ad alta risoluzione in fase diretta (NP-HPLC) utilizzando un rivelatore spettrofotometrico UV.

3 *Reagenti e materiali*

- 3.1 Cloroformio
- 3.2 Soluzione di idrossido di ammonio (ca. 25 % NH₃)
- 3.3 Celite
- 3.4 Solfato di sodio anidro
- 3.5 Miscela celite (3.3)/sodio solfato anidro (3.4) = 3/10
- 3.6 Acido acetico glaciale
- 3.7 1,2-dicloroetano per HPLC
- 3.8 Menadione purissimo
- 3.9 Soluzione standard stock: pesare 25 mg di menadione (3.8) con l'approssimazione di 10⁻⁴g in un matraccio tarato da 100 mL, portare a volume con 100 mL di 1,2-dicloroetano (3.7).
La soluzione, conservata in frigorifero e lontano da fonti luminose, è stabile una settimana.



4 Attrezzature

- 4.1 Vetreteria tarata e graduata
- 4.2 Agitatore meccanico
- 4.3 Filtri di carta rapidi
- 4.4 Evaporatore rotante
- 4.5 Sistema HPLC equipaggiato con rilevatore spettrofotometrico UV-visibile e colonna analitica da 250x4,6 mm (silice 5 μ m) e relativa precolonna

5 Modo di operare

- 5.1 Preparazione del campione
Per la preparazione dell'aliquota da sottoporre ad analisi, procedere come indicato nei metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali di cui al Regolamento (CE) N. 152/2009 della Commissione – Allegato II “ Disposizioni generali relative ai metodi di analisi degli alimenti per animali”– pubblicato nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L.54 del 26 febbraio 2009.
- 5.2 Estrazione del campione:
Pesare un'aliquota (m) da 5 a 10 grammi del campione con l'approssimazione di 0,01g in relazione al contenuto presunto di vitamina K₃. Aggiungere 100 mL di cloroformio (3.1) ed agitare per 5 minuti su agitatore meccanico (4.2). Aggiungere 5 mL della soluzione di idrossido di ammonio (3.2) ed agitare per 3 minuti. Aggiungere 10 g della miscela celite/sodio solfato anidro (3.5). Agitare il tutto per 10 minuti e successivamente neutralizzare con acido acetico (3.6). Agitare e lasciare separare le fasi. Filtrare la fase organica. Portare a secco con evaporatore rotante (4.4) un'aliquota (V_1) dell'estratto cloroformico e riprendere il residuo con un volume noto (V_2) di 1,2-dicloroetano (3.7).

6 Preparazione delle soluzioni di taratura

Diluire aliquote da 0,5-1-2-3-4 mL della soluzione standard stock (3.9) a 50 mL con 1,2-dicloroetano (3.7).

Le soluzioni di lavoro vanno preparate al momento dell'uso.

7 Cromatografia

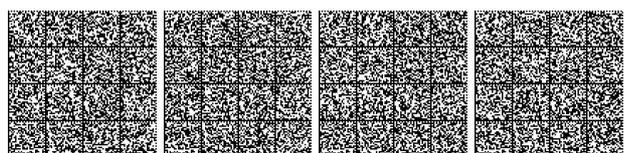
Iniettare aliquote da 50 μ L delle soluzioni standard di lavoro (6) e della soluzione campione (5.2) nel cromatografo nelle seguenti condizioni di lavoro:

fase mobile : 1,2-dicloroetano (3.7);

flusso della fase mobile: 0,8 mL/min;

temperatura della colonna: ambiente;

rilevazione spettrofotometrica a 251 nm.



8 Calcolo dei risultati

Determinare la concentrazione di vitamina K₃ (*c*) in µg/mL nella soluzione campione, interpolando sulla curva di taratura, costruita riportando sulle ascisse i valori delle aree dei picchi corrispondenti alle soluzioni standard e sulle ordinate le relative concentrazioni, il valore dell'area del picco della soluzione campione. Il contenuto di vitamina K₃ del campione espresso in mg/kg si ottiene tenendo conto delle diluizioni effettuate in base alla seguente formula:

$$\text{Contenuto in vitamina K}_3 \text{ in mg/kg} = c \times \frac{V_2}{m \times V_1} \times 100$$

dove:

c = concentrazione in vitamina K₃ (µg/mL) della soluzione campione, ottenuto per interpolazione.

m = massa, in grammi, dell'aliquota del campione sottoposta ad analisi.

*V*₁ = volume in mL dell'aliquota dell'estratto cloroformico di cui al punto 5.2.

*V*₂ = volume in mL di 1,2-dicloroetano utilizzato nella diluizione del residuo portato a secco dell'aliquota di estratto cloroformico di cui al punto 5.2.

Dal contenuto di menadione si risale a quello dei suoi derivati idrosolubili moltiplicando il valore ottenuto per i seguenti fattori *f*.

MSB	<i>f</i> = 1,92
MSBC	<i>f</i> = 3,05
MNB	<i>f</i> = 2,18
MPB	<i>f</i> = 2,22

Note:

- *Si opera sotto cappa, usando guanti e mascherina, lontano da fonti di calore e con luce attenuata.*
- *Qualora i tempi di ritenzione si riducessero sensibilmente, la colonna di silice va rigenerata e si opera seguendo lo schema :*

Miscela I : CHCl₃/CH₃OH = 80/20. Eluire un volume di 50 mL a 0,5 mL/min.

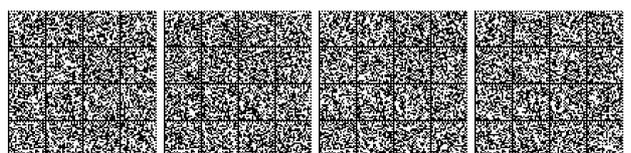
Miscela II : Esano/Etanolo assoluto = 90/10. Eluire un volume di 50 mL a 0,5 mL/min.

Miscela III : 1,2-dicloroetano. Eluire a 0,1mL/min per 1 notte

9 Risultati statistici di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo nel quale 10 Laboratori hanno analizzato due premiscele, due mangimi complementari, quattro mangimi completi a diverse concentrazioni in vitamina K₃.

Su ogni tipologia di prodotto sono state eseguite tre determinazioni.



La seguente tabella riporta i risultati ottenuti:

MATRICE	MANGIME COMPLETO	MANGIME COMPLETO	MANGIME COMPLETO	MANGIME COMPLETO	MANGIME COMPLEMENTARE	MANGIME COMPLEMENTARE	PREMISCELA	PREMISCELA
val ass (mg/kg)	5	10	20	40	90	150	250	500
MEDIA (mg/kg)	5,57	10,27	20,07	39,4	87,3	133,8	271,7	543
recupero	111,40%	102,70%	100,35%	98,50%	97,00%	89,20%	108,68%	108,60%
N LABORATORI	9	9	9	8	9	9	9	9
N MISURE	28	27	27	24	27	27	27	27
sigma r (mg/kg)	0,38	0,52	0,80	1,4	2,7	4,1	8,1	16
sigma R (mg/kg)	0,65	0,97	1,60	3,0	6,3	9,6	19,0	38
r (mg/kg)	1,14	1,72	3,10	2,4	9,9	19,0	31,0	48
R (mg/kg)	1,82	2,82	6,00	6,7	15,9	27,0	70,0	118
CV% r	6,82%	5,06%	3,99%	3,55%	3,09%	3,06%	2,98%	2,95%
CV% R	11,67%	9,44%	7,97%	7,61%	7,22%	7,17%	6,99%	7,00%

Legenda

- val ass (mg/Kg) = valore assegnato
- sigma r = scarto tipo di ripetibilità.
- sigma R = scarto tipo di riproducibilità.
- r = limite di ripetibilità.
- R = limite di riproducibilità.
- CV%_r = coefficiente di variazione percentuale di ripetibilità.
- CV%_R = coefficiente di variazione percentuale di riproducibilità.

10A06002

