

## **Mogućnost određivanja vitamina B<sub>12</sub> u vitaminskim predsmesama i dodacima hrani za životinje metodom AAS**

Željko Mihaljev, \* Milica Živkov-Baloš, Sandra Jakšić

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

### **Kratak sadržaj**

Zbog važnih metaboličkih funkcija i nemogućnosti dovoljnog sintetisanja u samom organizmu domaćih životinja, a naročito nepreživara, posebna pažnja posvećuje se dodavanju vitamina B<sub>12</sub> u smeše za ishranu životinja. Potrebe za ovim vitaminom obezbeđuju se iz vitaminskih predsmesa, te je stoga i utvrđivanje količine vitamina B<sub>12</sub> u predmetnim uzorcima od izuzetnog značaja. Određivanje sadržaja vitamina B<sub>12</sub> standardnim hemijskim metodama zahteva njegovo izdvajanje i prečišćavanje. U ovom radu sadržaj vitamina B<sub>12</sub> u predsmesama sa visokim sadržajem različitih vitamina određen je indirektno, merenjem nivoa kobalta metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije. Iz izmerenog sadržaja kobalta, izračunat je sadržaj vitamina B<sub>12</sub>. Dobijeni rezultati pokazuju da je u uzorcima preparata čistog vitamina B<sub>12</sub> (kao dodatka hrani za životinje) koeficijent odstupanja izmerenih od očekivanih vrednosti manji od 2%. U vitaminskim predsmesama vitamina B grupe i vitaminskim predsmesama vitamina B grupe i ostalih vitamina (A, D, E i dr.) izmerene vrednosti su se razlikovale od deklariranih za manje od 5%. Dobijeni rezultati ukazuju da je određivanje vitamina B<sub>12</sub>, merenjem sadržaja kobalta metodom AAS, obzirom na brzinu, tačnost i jednostavnost izvođenja, prihvatljiva metoda za ispitivanje vrste uzoraka hrane za životinje.

Ključne reči: vitamin B<sub>12</sub>, kobalt, određivanje, dodaci, predsmese

---

\* zeljko@niv.ns.ac.yu

## **Possibility of determining vitamin B<sub>12</sub> in vitamin premixes and feed additives using AAS method**

Željko Mihaljev, Milica Živkov-Baloš, Sandra Jakšić  
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

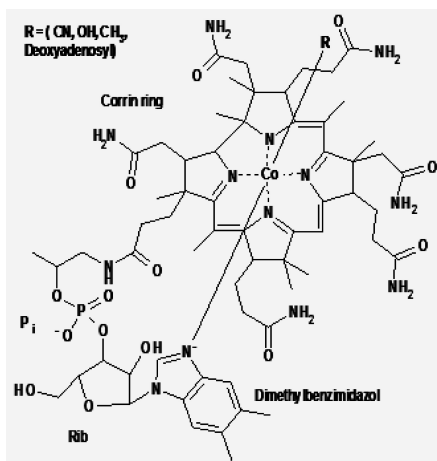
### **Abstract**

Since vitamin B<sub>12</sub> has important metabolic functions, but is unable sufficiently to synthesize into organisms of domestic animals (especially non-ruminants), special attention is given to adding B<sub>12</sub> into feed. The needs for this vitamin are provided through vitamin premixes, so determining the quantity of B<sub>12</sub> in the samples is of utmost importance. When standard chemical methods are applied extraction and purification are required. In this paper is described a method where the content of B<sub>12</sub> in premix with high level of different vitamins is determined through an indirect method: measuring the level of cobalt using atomic absorption spectrophotometry. The content of B<sub>12</sub> was determined from the content of cobalt. The obtained results show that in the samples of pure B<sub>12</sub> vitamin (used as an additive to feed) the measured values were lesser than 2% comparing to the expected values. In vitamin premixes the measured values of group B and vitamin premixes of vitamin B group and other (A, D, E) vitamins, the measured values differed from those given on the declaration, and the difference was lesser than 5%. The obtained results point that determining vitamin B<sub>12</sub> by measuring cobalt content using AAS method is a fast, accurate and simple method that can be applied in examining all the feed samples.

Key words: vitamin B<sub>12</sub>, cobalt, determination, additives, premix

### **UVOD**

Vitamin B<sub>12</sub> je, po svojoj hemijskoj strukturi, jedan od najsloženijih vitamina. Molekul B<sub>12</sub> se sastoji iz četiri redukovana pirolna prstena koji su međusobno povezani, dok je u središtu kobalt kovalentno vezan za četiri vodonikova atoma (slika 1). Prisustvo kobalta je važno za biološku aktivnost, a po njemu se naziva još i cijanokobalamin.



Slika 1. Hemijska struktura vitamina B<sub>12</sub>

Vitamin B<sub>12</sub> ima važnu ulogu u različitim metaboličkim procesima. Neophodan je za sintezu crvenih krvnih zrnaca, pravilno funkcionisanje nervnog sistema, rast i razvoj. Ima važnu ulogu u metabolizmu proteina, jer je uključen u sintezu nekoliko aminokiselina (BASF, 2001). Kod preživala ima značaj kao koenzim u iskorišćavanju propionske kiseline u rumenu. Kod živine nedostatak vitamina B<sub>12</sub> dovodi do povećanja embrionalne smrtnosti i smrtnosti izležanih pilića. Duža izloženost hipovitaminozi vodi nižoj proizvodnji jaja (Jovanović i sar., 2001). Preživari imaju mogućnost mikrobiološke sinteze vitamina u buragu ukoliko je u ishrani prisutan kobalt. Kod svinja, živine i drugih životinja sa jednim želucem, biosinteza vitamina B<sub>12</sub> se odvija u poslednjem delu tankog creva, cekumu i debelom crevu, a apsorbuje se samo količina iz tankog creva, što zadovoljava samo deo potreba ovih životinja (BASF, 2001).

Zbog važnih metaboličkih funkcija i nemogućnosti dovoljnog sintetisanja u samom organizmu domaćih životinja, a naročito nepreživala, posebna pažnja posvećuje se dodavanju vitamina B<sub>12</sub> u smeše za ishranu životinja. Ovi dodaci predstavljaju smeše različitih vitamina i minerala i kao takvi predstavljaju izuzetno kompleksan matriks u analitičkoj hemiji. Danas su razvijene različite mikrobiološke (Mattila i sar., 2001) i hemijske metode za određivanje vitamina B<sub>12</sub> u različitim vrstama uzoraka. Analitičke tehnike koje se mogu koristiti su: spektrofotometrija (Morelli, 1995; Pawar i sar. 2001), hemiluminescencija (Zhou i sar., 1991), kapilarna elektroforeza (Lambert i sar., 1992), tečna hromatografija visoke efikasnosti sa UV (Kozhanova i sar., 2002; Zafra-Gomez i sar., 2006), elektrohemijska metoda (Marszall i sar., 2005), plamena atomska apsorpciona spektrometrija (Vinas i sar., 1996), fluorescentna detekcija (Li i sar., 2000), masena detekcija sa indukovano-kuplovanom plazmom (Szpunar i sar., 1999; Chen i Jiang, 2008) i atomska apsorpciona spektrofotometrija (Akatsuka i sar. 1989).

## MATERIJAL I METODE RADA

Svi ispitani uzorci preparata čistog vitamina B<sub>12</sub> (n=4), premiksi vitamina B-kompleksa: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> (n=3) kao i premiksi vitamina B-kompleksa u smeši sa ostalim vitaminima (A, D<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>, E, Biotin, Holin hlorid, Ca-pantotenat, folna kiselina i dr.) (za živinu n=3; za svinje n=4; za goveda n=2), proizvedeni su od strane renomiranih svetskih proizvođača ove vrste dodataka hrani za životinje.

Za određivanje kobalta uzorci su pripremani metodom „suvog spaljivanja” - zagrevanjem uzoraka, žarenjem na 540°C i razaranjem dobijenog pepela pomoću razblažene HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posle žarenja dobijeni pepeo je rastvaran u 10% HCl i razblažen demineralizovanom vodom do odgovarajuće zapremine. Sadržaj kobalta određen je metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije na instrumentu Varian SpectrAA-10 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Na osnovu izmerenog sadržaja kobalta i poznavanja tačne relativne molekulske mase vitamina B<sub>12</sub>, može se posredno utvrditi količina vitamina B<sub>12</sub> u ispitivanom uzorku.

## REZULTATI ISPITIVANJA

Tabela 1. Sadržaj vitamina B<sub>12</sub> u čistim preparatima, premiksima sa vitaminima B-kompleksa i smešama vitamina B-kompleksa i ostalih vitamina

Broj uzorka	Vrsta uzorka	Deklarisana vrednost za vitamin B <sub>12</sub> [mg · kg <sup>-1</sup> ]	Izmerena vrednost za vitamin B <sub>12</sub> [mg · kg <sup>-1</sup> ] $\bar{x}_{sr} \pm SD$	Koeficijent odstupanja izmerenih od deklariranih vrednosti [%]
1.	Vitamin B <sub>12</sub>	10 000 (n=4)	10 119 ± 567 (SE = 5,6 %)	+ 1,19
2.	Kompleks B vitamina	700,0 (n=3)	686,7 ± 4,2 (SE = 0,6 %)	- 1,90
3.	Predsmeša B-vitamina i ostalih vitamina za živinu	98,0 (n=3)	102,5 ± 6,7 (SE = 6,5 %)	+ 4,6
4.	Predsmeša B-vitamina i ostalih vitamina za svinje	130,0 (n=4)	133,4 ± 6,9 (SE = 5,2 %)	+ 2,6
5.	Predsmeša B-vitamina i ostalih vitamina za goveda	200,0 (n=2)	205,8 ± 1,2 (SE = 0,6 %)	+ 2,9

## DISKUSIJA

Dobijene vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub> u analiziranim vrstama uzoraka upoređene su sa vrednostima datim u njihovim deklaracijama. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 može se zaključiti da je u čistim preparatima (*feed grade*) sa veoma visokom tačnošću utvrđen sadržaj vitamina B<sub>12</sub>, jer odstupanje izmerenih od deklariranih vrednosti iznosi ~1% (1,19%). U uzorcima kompleksa B-vitamina takođe je sa visokom tačnošću utvrđen sadržaj vitamina B<sub>12</sub> - odstupanje izmerenih od deklariranih vrednosti je ~2% (1,90%). U složenijim matriksima, tipa predsmeša

B-vitamina i ostalih vitamina, tačnost određivanja je nešto niža, i iznosi do ~5%. Koeficijent odstupanja izmerenih od deklariranih vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub> najniži je kod predsmesa kompleksa B-vitamina i ostalih vitamina namenjenih za ishranu svinja i iznosi ~3% (2,6%). U vitaminskim predsmesama za ishranu goveda koeficijent odstupanja izmerenih od deklariranih vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub> iznosio je takođe ~3% (2,9%). Najniža tačnost određivanja, tj. najviši koeficijent odstupanja izmerenih od deklariranih vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub>, ~5% (4,6%) postignuta je u vitaminskim predsmesama za ishranu živine.

Iz tabele 1 takođe se može zaključiti da primenjenu metodologiju za utvrđivanje količine vitamina B<sub>12</sub> odlikuje visoki stepen preciznosti, jer se utvrđena ponovljivost na istom analitičkom uzorku od različitih proizvođača, izražena preko relativne standardne greške (SE) kreće u intervalu od 0,6 do 6,5%, u zavisnosti od tipa i nivoa vitamina B<sub>12</sub> u uzorku.

Indirektno određivanje vitamina B<sub>12</sub> metodom AAS - merenjem sadržaja kobalta, primenili su Akatsuka i sar. (1989) i dobili rezultate koji su u saglasnosti sa našim zaključcima. Slične rezultate navode i Pawar i sar. (2001). Oni su preko kobalta određivali vitamin B<sub>12</sub> u farmaceutskim preparatima, metodom AAS i spektrofotometrijom i takođe dobili rezultate koji su u korelaciji sa našim merenjima sadržaja vitamina B<sub>12</sub> u sličnim preparatima.

## ZAKLJUČAK

Dobijeni eksperimentalni rezultati ukazuju da je navedena metoda primenjiva za određivanje vitamina B<sub>12</sub> u uzorcima preparata čistog vitamina B<sub>12</sub>, premiksima vitamina B-kompleksa kao i predsmesama vitamina B-kompleksa i ostalih vitamina. Metoda je veoma selektivna, čak i u veoma kompleksnim i složenim matriksima, pošto se zasniva na detekciji kobalta atomskom apsorpcijom. Obzirom na svoju jednostavnost i brzinu izvođenja, tačnost, preciznost i osetljivost kao i činjenicu da zahteva malu količinu uzorka, može se uspešno koristiti kao alternativna metoda određivanja sadržaja vitamina B<sub>12</sub>.

## LITERATURA

1. Akatsuka K., Atsuya I.: Determination of vitamin B<sub>12</sub> as cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry using the solid sampling technique. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 335, 2, 200-204, 1989.
2. BASF, Technical Information: Animal Nutrition, On feed additives, Ludwigshafen, Germany, 2001.
3. Chen J.H., Jiang S.J.: Determination of cobalamin in nutritive supplements and chlorella fods by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4, 1210-1215, 2008.
4. Jovanović R., Dujić D., Glamočić D.: Ishrana domaćih životinja. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet Novi Sad i Banja Luka, 2001.

5. Kozhanova, L.A., Fedorova, G.A., Baram, G.I.: Determination of water- and fat-soluble vitamins in multivitamin preparations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 57, 1, 40-45, 2002.
6. Lambert D., Adjalla C., Felden F., Benhayoun S., Nicolas J. P., Gueant J.L.: Identification of vitamin B<sub>12</sub> and analogues by high- performance capillary electrophoresis and comparison with high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 608, 1-2, 311-315, 1992.
7. Li, H.B., Chen, F., Jiang, Y.: Determination of vitamin B-12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 891, 2, 243-247, 2000.
8. Marszall M. L., Lebiezinska A., Czarnowski W., Szefer P.: High-performance liquid chromatography method for the determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 91, 98, 1094, 2005.
9. Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.-M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M. and Piironen, V.: Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2343-2348, 2001.
10. Morelli B.: Determination of a quaternary mixture of vitamins B6, B1, and B12 and uridine 5'-triphosphate, by derivative spectrophotometry. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84, 1, 34-37, 1995.
11. Pawar R. B., Padgaonkar S.B., Sawant A.D.: A rapid and sensitive method for the determination of cobalt in pharmaceutical and ink dryer samples. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 60, 4, 328-330, 2001.
12. Szpunar J., Chassaigne A., Makarov R., Lobinski R.: Limitations of high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection for speciation analysis of trace metals in biological samples. *Chemia Analityczna*, 44, 3, 351-362, 1999.
13. Vinas P., Campillo N., Lopez Garsia I., Hernandez Cordoba M.: Speciation of vitamin B-analogues by liquid chromatography with flame atomic absorption spectrometric detection. *Analitica Chimica Acta*, 318, 319, 325, 1996.
14. Zafra-Gomez A., Garballo A., Morales J. C., Garcia-Ayuso L.E.: Simultaneous Determination of Eight Water –Soluble Vitamins in Supplemented Foods by liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54,13, 4531-4536, 2006.
15. Zhou Y.K., Li H., Liu Y., Liang G. Y.: Chemiluminescence determination of vitamin B<sub>12</sub> by a flow-injection method. *Analytica Chimica Acta*, 243, 127-130, 1991.

Primljeno: 01.03.2009.

Odobreno: 03.03.2009.