

РЕЗУЛЬТАТИ МОНІТОРИНГУ ВМІСТУ ВІТАМІНУ А В ПРЕМІКСАХ ЗА 2016 – 2017 рр.

*Л. К. Самарська, старший науковий співробітник
С. Л. Гуменюк, старший науковий співробітник
М. І. Березюк, молодший науковий співробітник
О. В. Коробова, канд. біол. наук*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті наведені результати аналізів вмісту вітаміну А в преміксах, згідно із щорічним Планом державного моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів. Проведення моніторингу здійснюється відповідно до положень Закону України «Про ветеринарну медицину» та в рамках державного ветеринарно-санітарного контролю. Дослідження проводили у лабораторії вискоєфективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок впродовж 2016-2017 рр. методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з ультрафіолетовим детектуванням (УФ).

Ключові слова: ВИСКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ПРЕМІКСИ, ВІТАМІН А, МОНІТОРИНГ.

Проведення державного моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів передбачає здійснення послідовності досліджень, згідно із планом, з метою отримання загального уявлення про стан справ стосовно виконання законодавства про безпечність та якість кормів, а як наслідок – здоров'я і благополуччя тварин. Державний моніторинг не є елементом державного контролю дотримання законодавства про безпечність та якість кормів окремими операторами ринку. Виконуючи завдання моніторингу, можна отримати набагато важливішу та інформативнішу узагальнену оцінку стану дотримання законодавства України стосовно безпечності й якості кормів, кормових добавок та преміксів.

Щорічні плани державного моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів розробляють відповідно до Закону України «Про ветеринарну медицину» [1] з урахуванням вимог Директиви Ради Європи від 25.11.1995 № 95/53, Регламенту ЄС № 882/2004 «Про офіційний контроль для гарантування відповідності кормів вимогам законодавства, санітарії та благополуччя тварин».

Результати моніторингу використовують з метою отримання загального уявлення про стан справ щодо дотримання законодавства про корми.

Метою роботи було провести аналітичну оцінку преміксів на відповідність вмісту вітаміну А згідно із планом державного моніторингу [2, 3] та модифікувати методику контролювання вітаміну А відповідно до наявного обладнання.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії вискоєфективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Моніторинг вмісту вітаміну А в преміксах здійснювали, беручи за основу ДСТУ ISO 14565:2004 «Корми для тварин. Визначання вмісту вітаміну А методом рідинної хроматографії вискороздільної здатності» [4]. Аналіз вітаміну А в преміксах протягом 2016-2017 рр. здійснювали, використовуючи хроматографічну колонку фірми Phenomenex, аналогічну до колонки EC Nucleosil® 250×4,0 C 18 фірми Macherey-Nagel, яку застосовували впродовж моніторингу

2014-2015 рр., умови хроматографічного розділення детально описані у публікації [5]. Хроматограма стандартного зразка вітаміну А, отримана на колонці EC Nucleosil® C18 розміром 250×4,0 мм, заповненій сорбентом із розміром частинок 5 мкм представлена на рисунку 1.

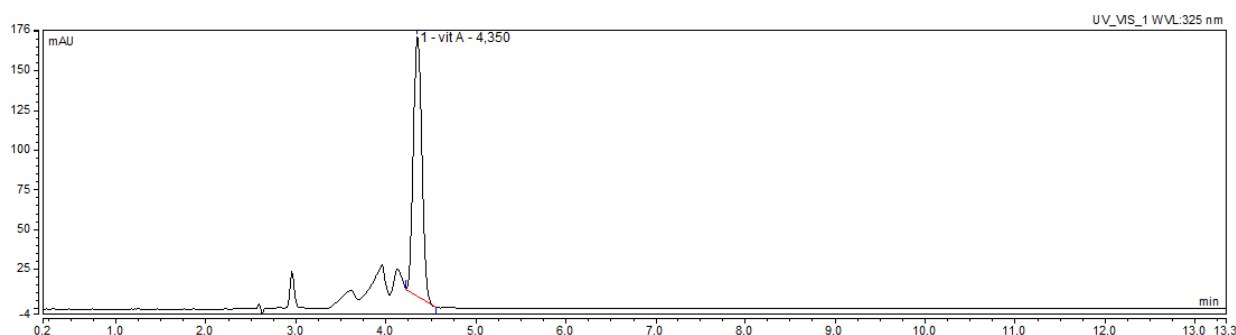


Рис. 1. Хроматограма стандартного зразка вітаміну А, отримана у 2015 році. Колонка EC Nucleosil® C 18 розміром 250×4,0 мм, розмір частинок сорбенту 5 мкм. Умови аналізу описані у публікації [5].

Модифікації окремих етапів аналізу були спрямовані на досягнення ефективніших умов гідролізу, екстракції та хроматографічного розділення. Були внесені зміни у процедуру гідролізу: омилювання преміксу проводили 60 % водним розчином калію гідроксиду протягом не менше, ніж 30 хв. Для зменшення впливу небажаних хімічних реакцій під час гідролізу, зокрема, ізомеризації та розпаду ретинолу застосовували не тільки аскорбінову кислоту, а й 2,6-ди-tert-бутил-4-метилфенол (бутилгідрокситолуол, ВНТ) [6]. Хроматограма стандартного зразка вітаміну А, отримана на колонці Luna® C 18(2) розміром 250×4,6 мм, заповненій сорбентом із розміром частинок 5 мкм фірми Phenomenex представлена на рисунку 2.

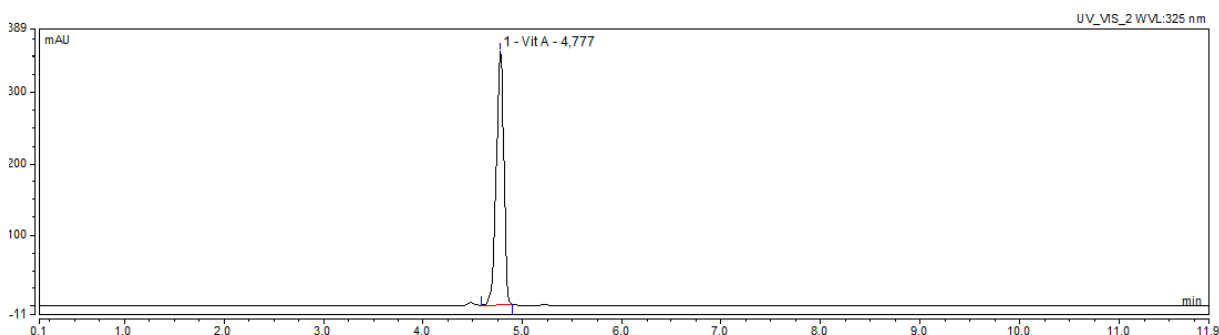


Рис. 2. Хроматограма стандартного зразка вітаміну А, отримана у 2017 році. Колонка Luna® C 18(2) розміром 250×4,6 мм, розмір частинок сорбенту 5 мкм. Гідроліз із використанням ВНТ, умови описані у тексті.

З отриманих хроматограм (рис. 1 і 2) на різних колонках та за різних умов гідролізу видно, що на колонці Luna® C 18(2) із використанням ВНТ при омиленні зразка досягли кращого хроматографічного розділення.

У роботі використовували реактиви кваліфікації HPLC grade: ацетонітрил (ACN) (Lab-Scan, Ірландія), тетрагідрофуран (THF) (MACRON, Німеччина), вода очищена (Crystal B, Adrona, Латвія), сертифікований стандартний зразок вітаміну А, кислота аскорбінова (99,6 %), бутилгідрокситолуол (ВНТ, 2,6-ди-tert-бутил-4-метилфенол), (MERCK, Німеччина), калію гідроксид, ч.д.а. (Чехія).

Екстракцію вітаміну А здійснювали петролейним ефіром із прогідролізованого розчином їдкою калію преміксу у водно-спиртовій суміші. Аналіз вмісту вітаміну А проводили на хроматографічній колонці Luna® 250×4,6 C 18 100 Å фірми Phenomenex (США), за температури 30 °С, в ізократичному режимі мобільної фази суміші ACN : THF у

співвідношенні 9 : 1 (v/v) із швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Детекцію здійснювали на УФ-детекторі за довжини хвилі 325 нм.

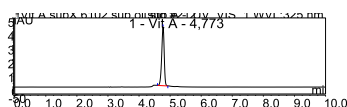
Результати й обговорення. Завданням моніторингу є отримання загальної оцінки стану дотримання законодавства України стосовно безпечності та якості кормів, кормових добавок, преміксів. За 2016-2017 рр. у лабораторії ВЕРХ ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, згідно із планом Державного моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів щодо визначення вітаміну А, було досліджено 16 зразків преміксів та кормових концентратів. Виявлено, що результати 7 серій не відповідали даним у супровідних документах. Це становить 43,8 % від загальної кількості проаналізованих зразків. Результати наведені у таблиці.

Таблиця

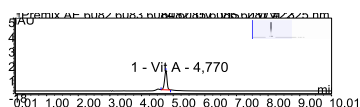
Результати досліджень зразків преміксів за вмістом вітаміну А за період 2016-2017 рр.

Поступлення зразків преміксів, роки	Проаналізовано зразків	Відповідають заявленому у супровідній документації	Не відповідають заявленому у супровідній документації
2016	8	4	4
2017	8	5	3

На рисунку 3 представлено хроматограми вітаміну А, екстрагованого з преміксу (кількість вітаміну А за сертифікатом якості становить 1 200 000 МО/кг), у порівнянні із стандартним зразком вітаміну А відповідної концентрації. З рисунку видно, що час утримування для вітаміну А становить 4,77 хв.



а



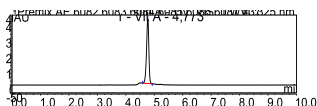
б

Рис. 3. Хроматограми вітаміну А: а – розчин стандартного зразка, б – розчин екстракту досліджуваного преміксу (кількість вітаміну А за сертифікатом якості 1 200 000 МО/кг).

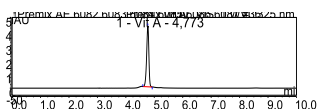
Концентрації вітамінів у зразках обчислювали за площами одержаних піків. Виходячи із розрахункової кількості вітаміну А у наважках преміксу та стандартного зразка, за умов розведення до близьких концентрацій, очікували одержати близькі за площами піки на хроматограмах досліджуваної проби та стандартного зразка. Площа піку розчину екстракту

досліджуваного преміксу, в порівнянні до розчину стандартного зразка вітаміну А становить 41 % від розрахункового значення, що вказує на очікувану невідповідність заявленому вмісту вітаміну А у преміксі.

На рисунку 4 представлено хроматограми вітаміну А із розчину екстракту досліджуваного преміксу (кількість вітаміну А за сертифікатом якості становить - 200 000 МО/кг), у порівнянні із розчином стандартного зразка вітаміну А відповідної концентрації. Площі піків вітаміну А розчину стандартного зразка та розчину екстракту досліджуваного преміксу є приблизно однаковими, що дає підстави очікувати відповідність досліджуваного зразка супровідному сертифікату якості.



а



б

Рис. 4. Хроматограми вітаміну А: а – розчин стандартного зразка, б – розчин екстракту досліджуваного преміксу (кількість вітаміну А за сертифікатом якості 200 000 МО/кг).

Методика була валідована за специфічністю, лінійністю, прецизійністю, точністю та відтворюваністю. Час виходу вітаміну А (ретинолу) в даних умовах становить 4,77 хв. Лінійність кількісного визначення, яка представлена на рис. 5, зберігається у межах від 5 до 200 МО/мл. RSD (relative standard deviation) становить 2 %. Обробку результатів проводили програмним забезпеченням Chromeleon 7.

За умов хроматографування, описаних у публікації ефективність колонки за піком вітаміну А становила 9 200 теоретичних тарілок, а коефіцієнт симетрії – 1,0-1,1, такі дані характеризують придатність хроматографічної системи, як задовільну [7].

Згідно вимог розділу Державної Фармакопеї України «Валідація аналітичних методик і випробувань» у зв'язку із змінами аналітичної методики проведено повторну валідацію. Методику кількісного визначення вітаміну А валідовано за основними параметрами: за специфічністю, лінійністю, точністю та відтворюваністю. Специфічність тесту для ВЕРХ підтверджується співпадінням RT (retention time) піку вітаміну А на хроматографі стандартного зразка та розчину досліджуваної проби у межах ± 2 %. На основі отриманих результатів досліджень можна підсумувати, що змінена методика сприяє більш ефективному гідролізу та покращенню розділення піків на хроматограмах досліджуваних зразків преміксів.

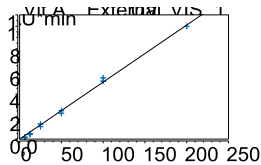


Рис. 5. Градувальний графік залежності площі піку вітаміну А від концентрації в МО/мл в діапазоні концентрацій 5 – 200 МО/мл, коефіцієнт кореляції ($R^2 = 0,9957$).

Описаний підхід до методичного забезпечення аналізів сприяє отриманню об'єктивних результатів моніторингових досліджень, що дає змогу попередити неконтрольоване використання неякісних преміксів і звести до мінімуму негативні наслідки у період годівлі тварин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що валідована у лабораторії методика є ефективною при проведенні досліджень вітаміну А в преміксах.
2. Виявлено, що із 16-ти зразків преміксів, проаналізованих за період 2016–2017 рр., 43,8 % зразків за вмістом вітаміну А не відповідали задекларованим значенням.
3. Результати досліджень, проведених за період 2016–2017 рр., підтверджують ефективність впровадженої методики при контролі преміксів у процесі виробництва, зберігання та обігу.

Перспективи досліджень. Планується подальше проведення досліджень преміксів на відповідність вмісту вітаміну А удосконаленою методикою.

RESULTS OF MONITORING OF VITAMIN A IN PREMIXES FOR THE PERIOD 2016 – 2017

L. Samarska, S. Humenjuk, M. Bereziyk, O. Korobova

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

SUMMARY

The article presents the results of analyzes of the vitamin A content in premixes, according to the annual State Monitoring Plan for feed, feed additives and premixes. The monitoring is carried out in accordance with the provisions of the Law of Ukraine "On Veterinary Medicine" and within the framework of state veterinary and sanitary control. The studies were carried out in the laboratory of high-performance liquid chromatography of the Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives during 2016 - 2017 by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (UV).

Keywords: HIGH PERFORMACE LIQUID CHROMATOGRAPHY, PREMIXES, VITAMIN A, MONITORING.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА А В ПРЕМИКСАХ ЗА 2016 – 2017 гг.

Л. К. Самарская, С. Л. Гуменюк, Н. И. Березюк, О. В. Коробова

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных
препаратов и кормовых добавок
ул.Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты анализов содержания витамина А в премиксах, согласно ежегодного Плана государственного мониторинга кормов, кормовых добавок и премиксов. Проведение мониторинга осуществляется соответственно положениям Закона Украины «О ветеринарной медицине» и в рамках государственного ветеринарно-санитарного контроля. Исследования проводили в лаборатории высокоэффективной жидкостной хроматографии ГНИКИ ветеринарных препаратов и кормовых добавок на протяжении 2016 – 2017 гг. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовой детекцией (УФ).

Ключевые слова: ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ПРЕМИКСЫ, ВИТАМИН А, МОНИТОРИНГ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Закон України «Про ветеринарну медицину» (ВВР), 1992, N 36, с.531.
2. Наказ № 67 від 28.01.2016 р. Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України про затвердження Плану державного моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів на 2016 рік.
3. Наказ № 528 від 27.12.2016 року Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів про затвердження Плану державного моніторингу кормів, кормових добавок та преміксів на 2017 рік.
4. ДСТУ ISO14565:2004 «Корми для тварин. Визначання вмісту вітаміну А методом рідинної хроматографії високороздільної здатності» Київ: Держспоживстандарт України. – 2005.
5. Моніторинг жиророзчинних вітамінів у преміксах за період 2014 – 2015 років / О. Б. Меркулова, Л. К. Самарська, С. Л. Гуменюк, О. В. Коробова // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. – Львів – 2016 – Вип. 17, № 1. – С. 43–49.
6. *Wieliński S.* Wykorzystanie HPLC do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (Simultaneous determination of fat-soluble vitamins by means of HPLC) / *Wieliński S., Olszanowski A.* // *Wiadomości Chemiczne* (55) – 2001 – P.1075-1102.
7. *British Pharmacopoeia.* – 2009.

Рецензент – Т. Р. Левицький, к. с-г. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.