

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МЕТІОНІНУ В КОРМОВИХ ДОБАВКАХ МЕТОДОМ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак, Р. О. Ривак

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

У статті наведено результати визначення вмісту метіоніну в кормових добавках методом капілярного електрофорезу за допомогою приладу «Капель-105/105М», обладнаного спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера. Впровадження методу є особливо актуальним у зв'язку з постійним поповненням ринку України новими амінокислотними кормовими добавками та збільшенням випадків їх фальсифікації.

Ринок України щорічно поповнюється новими амінокислотними кормовими добавками різних фірм Європи та Азії, які широко застосовуються при виробництві преміксів, білково-вітамінно-амінокислотних добавок та комбікормів для сільськогосподарських тварин та птиці. Це як і багатоконпозиційні амінокислотні кормові добавки, рідкі та порошкоподібні форми з органічними та неорганічними наповнювачами тощо, так і окремі форми амінокислот.

Особливо важливе місце при балансуванні раціонів сільськогосподарських тварин та птиці займає метіонін, який є необхідним у метаболізмі жирів і білків, організм використовує його також для виробництва цистеїну. Метіонін є основним постачальником сульфуру, який запобігає розладам у формуванні волосся, шкіри та нігтів, позитивно впливає на міцність цибулин волосся і підтримує його ріст. Ця незамінна амінокислота сприяє зниженню рівня холестерину, підсилюючи вироблення лецитину печінкою, знижує рівень жирів у печінці, захищає нирки, бере участь у виведення важких металів з організму, регулює утворення аміаку і очищає від нього сечу, що знижує навантаження на сечовий міхур. Разом з таурином метіонін грає істотну роль у синтезі адреналіну, креатину та інших біологічно важливих сполук. Метіонін служить донором метильних груп при синтезі різноманітних біологічно активних речовин, прискорює загоєння ран.

Багатими на метіонін є зернові, горіхи та злакові, однак його біодоступність із кормової сировини не завжди забезпечує необхідну кількість цієї амінокислоти в організмі тварин і птиці, оскільки потреба і використання метіоніну залежать від породи, статі та віку. Всі ці фактори взаємозв'язані з кількістю метіоніну, який необхідний для одержання високих показників росту і продуктивності тварин і птиці.

Зважаючи на широкий вибір кормових добавок метіоніну, виробникам кормів важливо визначитися з якісним продуктом, який зареєстрований в Україні у встановленому порядку та містить задекларовану кількість діючої речовини. Контролювання вмісту метіоніну в кормових добавках продиктоване також і випадками фальсифікації, які почастишали за останні роки на ринку України.

На сьогоднішній день для визначення вмісту метіоніну використовуються хімічні методи досліджень, метод високоефективної рідинної хроматографії, а також метод капілярного електрофорезу, який дозволяє аналізувати іонні та нейтральні компоненти різноманітної природи з високою ефективністю. Традиційно капілярний електрофорез порівнюють з високоефективною рідинною хроматографією, оскільки в обох методах розділення проходить в обмеженому просторі (капілярі або колонці) з участю рухомої рідкої

фази (буферного розчину або елюента) і для реєстрації сигналів використовують подібні принципи детектування і програмної обробки даних.

Перевагами методу капілярного електрофорезу є:

- висока ефективність розділення зразка;
- невеликий об'єм аналізованої проби і буферів, при цьому практично непотрібне застосування високочистих, дорогих органічних розчинників;
- відсутність колонки, сорбента;
- швидкість досліджень.

Метод капілярного електрофорезу з успіхом застосовується для аналізу різноманітних речовин (неорганічних і органічних катіонів і аніонів, амінокислот, вітамінів, барвників, білків тощо) та для технологічного контролю виробництва, входного контролю сировини, аналізу фармацевтичних препаратів і харчових продуктів, в криміналістиці, медицині, біохімії тощо.

Виходячи з вищесказаного в лабораторії контролю кормових добавок і преміксів ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок впроваджено даний метод для контролювання якості амінокислотних кормових добавок, амінокислотних сумішей за вмістом метіоніну.

Матеріали і методи. Для визначення вмісту метіоніну в кормових добавках було застосовано метод капілярного електрофорезу, в основі якого закладено електрокінетичні явища — електроміграція іонів та інших заряджених частинок і електроосмос. Ці явища виникають у розчинах при розташуванні їх в електричному полі, переважно, високої напруги. Якщо розчин знаходиться в тонкому капілярі то електричне поле, яке знаходиться вздовж капіляра, викликає в ньому рух заряджених частинок і пасивний потік рідини, в результаті чого проба розділяється на індивідуальні компоненти, так як параметри електроміграції специфічні для кожного виду заряджених частинок. Дослідження проводили за допомогою системи капілярного електрофорезу “Капель-105/105М” із позитивною полярністю джерела високої напруги (внутрішній діаметр капіляру 50 мкм, повна довжина капіляру 75 см, ефективна довжина 65 см), оснащена спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера.

У період проведення дослідження в приміщенні лабораторії дотримувались наступні умови: температура повітря 25 °С; вологість повітря 68 %; напруга в мережі 220 В; частота перемінного струму (50±1) Гц.

Для проведення досліджень було взято зразки кормових добавок DL-метіоніну 99,0 % та суміші амінокислот (лізину та метіоніну), вміст метіоніну в якій згідно сертифікату якості становив 32 % та проведено наступні роботи: підготовка капіляру до роботи, приготування буферних, градувальних і контрольних розчинів, градування системи капілярного електрофорезу “Капель” і підготовка проб. Аналіз зразків проводили при відповідних параметрах приладу, які наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри приладу “Капель-105/105М”

Вихідні компоненти (в порядку виходу)	Лізину монохлорид
Введення проби	30 мбар, 10 сек
Довжина хвилі, нм	200
Напруга, кВ	25
Температура, °С	30
Ведучий електроліт	Буферний розчин

Результати й обговорення. Для визначення вмісту метіоніну в кормових добавках було побудовано калібрувальний графік та перевірено його стабільність за допомогою контрольного розчину, аналізуючи не менше двох разів в умовах, відповідних аналізу. Встановлено ширину вікна ідентифікації 5 % і на отриманих електрофореграмах перевірено автоматичну ідентифікацію компонентів.

Отримані дані щодо калібрувального графіка та його стабільності наведено на електрофореграмі рис. 1 та табл. 2.

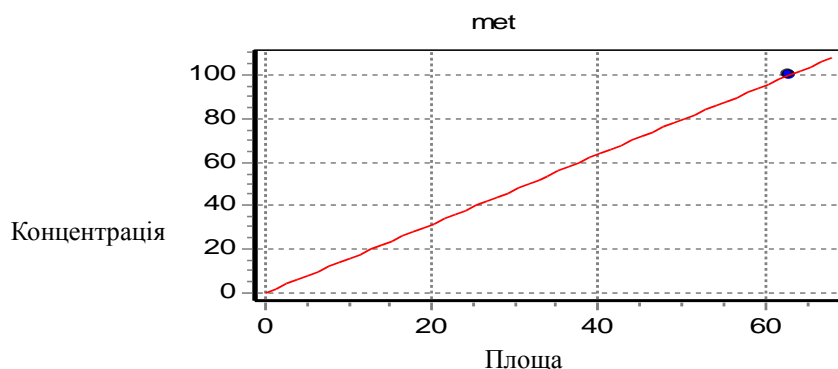


Рис. 1. Калібрувальний графік для визначення метіоніну

Таблиця 2

Дані побудови калібрувального графіка та визначення його стабільності (n=3)

Назва розчину	Час виходу піку, хв.	Висота піку	Площа піку	Концентрація, мг/л	Відхилення, %
Град. р-н № 1	7.162	3.426	62.99	100.8	0,8
Град. р-н № 2	7.210	3.370	68.25	103.4	3,4
Град. р-н № 3	7.200	3.460	66.48	102.6	2,6

Дані таблиці показують, що відхилення між паралелями калібрувального графіку становлять 0,8-3,4 %. Згідно з отриманими валідаційними результатами, стандартне відхилення SD становить 4,79 мг/л, відносне стандартне відхилення RSD — 4,56 %, що задовольняє вимогу не більше 20 % при даному виді досліджень. Оскільки RSD не перевищує 20 %, то метод вважається лінійним та збіжним, а стандартна невизначеність становить 9,58 мг/л, що не перевищує 10 %.

Результати визначення вмісту метіоніну в кормовій добавці DL-метіоніну 99,0 % у вигляді електрофореграми подано на рисунку 2, дані щодо результатів — у таблиці 3.

Вирахувавши середнє значення між паралельними визначеннями, отримаємо 99,3 % вмісту метіоніну в досліджуваній добавці, що на 0,3 % вище, ніж задеклароване значення.

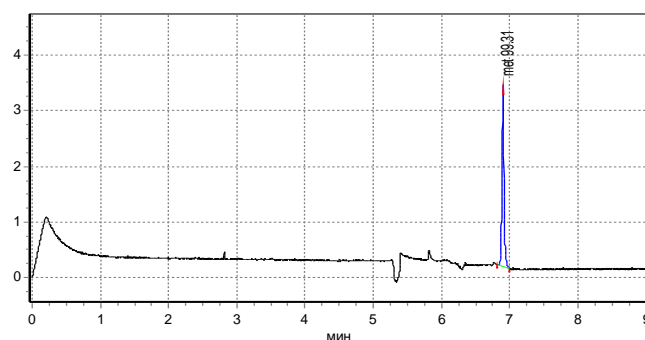


Рис. 2. Електрофореграма результатів умісту метіоніну в кормовій добавці DL-метіоніну 99,0 %

Таблиця 3

Дані щодо результатів визначення вмісту метіоніну в кормовій добавці DL-метіоніну 99,0 % (n=3)

Назва розчину	Час виходу піку, хв.	Площа піку	Концентрація, мг/л	Вміст метіоніну, %
1 паралель	6.903	69.22	99.31	99.31
2 паралель	7.160	69.01	99.75	99.75
3 паралель	7.212	68.23	98.82	98.82

Результати досліджень суміші амінокислот за вмістом метіоніну подано в таблиці 4, електрофореграма отриманих результатів наведена на рисунку 3.

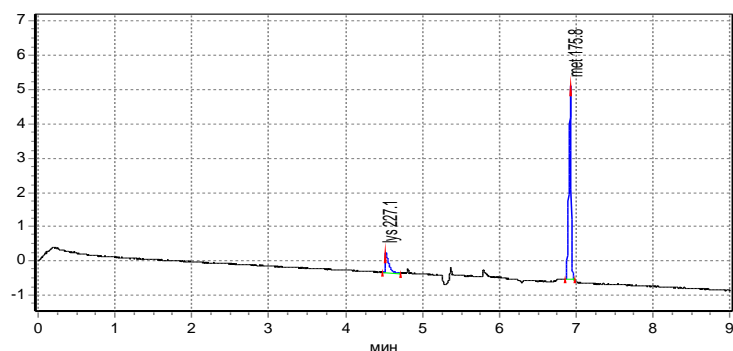


Рис. 3. Електрофореграма результатів умісту метіоніну в суміші амінокислот

Таблиця 4

Дані щодо результатів визначення вмісту метіоніну в суміші амінокислот (n=3)

Назва розчину	Час виходу піку, хв.	Площа піку	Концентрація, мг/л	Вміст метіоніну, %
1 паралель	6.925	116.0	175.8	35,16
2 паралель	7.011	109.8	156.3	31,26
3 паралель	7.210	110.5	168.9	33,78

Середнє арифметичне трьох паралельних визначень становить 33,4 % вмісту метіоніну в досліджуваній кормовій добавці, що на 4,37 % вище задекларованого значення.

При розрахунку відсоткового вмісту метіоніну в амінокислотній суміші спостерігається збільшення відхилення отриманого результату від задекларованого значення, оскільки компонентний склад добавки, наповнювач (матриця) суттєво впливають на час, висоту та площу піку і в кінцевому результаті на масову концентрацію досліджуваної амінокислоти.

ВИСНОВКИ

Отримані результати досліджень свідчать, що метод капілярного електрофорезу на приладі “Капель-105/105М” є достатньо точним та вірогідним у випадку досліджень кормових добавок метіоніну та суміші амінокислот за вмістом метіоніну і коливається в межах 5 % в залежності від виду кормової добавки.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на впровадження та відпрацювання методу капілярного електрофорезу при визначенні вмісту треоніну та триптофану у кормових добавках, а також при визначенні вмісту амінокислот у кормах та кормовій сировині.

DEFINITION THE LYSINE CONTENT IN THE FEED ADDITIVES CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD

T. R. Levytskyj, H. P. Ryvak, R. O. Ryvak

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives

S U M M A R Y

The results of the determination of metionine in the feed additives by capillary electrophoresis using the equipment "Kapel-105/105M" equipped with software for the personal

computer. Implementation of the method is especially important due to the constant replenishment of the Ukrainian market with new amino acid feed additives and increased incidence of fraud.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗИНА В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Т. Р. Левицкий, Г. П. Рыбак, Р. О. Рыбак

Государственный научно-исследовательский институт ветеринарных препаратов
и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты определения содержания метионина в кормовых добавках методом капиллярного электрофореза с использованием оборудования «Капель-105/105М» оснащенным программным обеспечением с использованием персонального компьютера. Внедрение метода особенно актуально в связи с постоянным пополнением рынка Украины новыми аминокислотными кормовыми добавками и учащением случаев их фальсификации.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Комаров Н. В., Каменцев Я. С.* Практическое руководство по использованию системы капиллярного электрофореза «Капель». Санкт-Петербург, 2008. — 208 с.
2. М 04-63-2010 «Кормовые добавки. Методика измерений массовой доли лизина моногидрохлорида, метионина, треонина, триптофана методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105/105М», Санкт-Петербург, 2010. (Свидетельство № 04.04.045/2010 от 14.04.2010 аттестации методики метрологической службой).
3. *Венедиктов А. М., Ионас А. А.* Химические кормовые добавки в животноводстве: Справочная книга. — М.: Колос, 1979. — С. 44–59.
4. *Тараненко Г. А.* Лизин и метионин в кормлении // Животноводство. — 1974. — № 1. — С.43–44.