

КОНТРОЛЬ ВМІСТУ МАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ У СИЛОСАХ І СІНАЖАХ МЕТОДОМ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Г. П. Ривак, канд. с.-г. наук

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

У статті обґрунтовано проблему контролювання силосів і сінажів за вмістом масляної кислоти, а також необхідність впровадження нових альтернативних, більш точних методів визначення цього показника, як індикатора псування консервованих кормів. Описано принцип методу капілярного електрофорезу, калібрування системи і хід визначення масляної кислоти в силосах і сінажах. Подано результати досліджень зразків силосів та сінажів з різним терміном зберігання і якістю силосування за показником вмісту масляної кислоти. Також, проведено оцінювання (валідацію) методу з метою його застосування при контролюванні якості консервованих кормів за вмістом масляної кислоти.

Ключові слова: МАСЛЯНА КИСЛОТА, СИЛОС, СІНАЖ, МЕТОД КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ, СТАНДАРТНИЙ ЗРАЗОК.

У реалізації важливої проблеми отримання якісної і безпечної продукції тваринництва вирішальним фактором є рівень повноцінної годівлі, який визначається кількістю енергії, протеїну, широким спектром біологічно активних речовин, які поступають в організм, їх збалансованість між собою з врахуванням видових та статевих-вікових особливостей сільськогосподарських тварин, таких, як велика та дрібна рогата худоба.

Найбільш технологічним і економічним типом їх годівлі є сіно-силосно-сінажний. Силос і сінаж – консервовані корми, мають високу поживну цінність, містять біологічно активні речовини та органічні кислоти, які стимулюють апетит тварин, дозволяють нормалізувати процеси травлення, покращити технологічні властивості і отримувати високі надой молока хорошої якості, особливо у зимовий період [1].

За такого типу годівлі дуже важливо згодувувати якісні консервовані корми, отримані правильним консервуванням і зберіганням, з прогнозованим протіканням у них процесів молочно-кислого бродіння, збереженням своїх смакових і поживних характеристик.

Розвиток несприятливої мікрофлори, гнильних і маслянокислих процесів у кормах, знижують їх якість, призводять до псування, погіршення смакових, поживних якостей, а також до поганого споживання корму і проблем зі здоров'ям у тварин.

Маслянокислі бактерії розвиваються лише в анаеробних умовах, коли силосується волога і/або забруднена трав'яна маса, а процес маслянокислого бродіння постійно продовжується за недостатнього окислення. За сприятливих умов для своєї життєдіяльності, маслянокислі бактерії можуть бути особливо небезпечним конкурентом молочнокислих бактерій, розщеплюючи не тільки цукор, а й молочну кислоту, тим самим знижуючи її консервуючу здатність. Ці бактерії зброджують цукри, крохмаль та молочну кислоту до масляної й низки побічних продуктів – оцтового альдегіду, вуглекислого газу, водню, а білки — до аміаку та амінів, тому силос і сінаж набувають запаху тухлих яєць, сірки, що погіршує смакові якості і споживання таких кормів [2].

Масляна кислота – це своєрідний індикатор псування консервованих кормів, особливо, відносно розпаду білка, і хоча вона нешкідлива для організму тварин, але її наявність надає неприємного запаху і свідчить про небажаний процес силосування. У добротних кормах

масляна кислота повинна бути відсутня [3].

В Україні нормативними документами на силос і сінаж, а саме ДСТУ 4782 [4] і ДСТУ 4684 [5], встановлено максимально допустимий вміст масляної кислоти 0,1-0,3 %, за якого ці корми вважаються якісними і дозволені до застосування в годівлі сільськогосподарських тварин.

Однак, постає питання визначення вмісту масляної кислоти у силосах і сінажах, з метою контролювання їх якості, безпечності та повноцінного використання.

На сьогоднішній день найчастіше використовують титриметричний метод визначення масляної кислоти в силосі та сінажі, який базується на титруванні екстракту зразка 0,1 н розчином гідрооксиду барію та утворенні маслянокислого бариту, який випадає в осад. У нормативних документах на ці продукти зазначено доволі трудомісткий титриметричний метод Леппера-Флига, який складається з етапів знецукрювання, переводу зв'язаних кислот у вільні, шляхом відгонки та лужного титрування. Також, часто застосовують газохроматографічний метод визначення масляної кислоти.

У лабораторії контролю кормових добавок і преміксів ДНДКІ ветрепаратів та кормових добавок впроваджено визначення вмісту масляної кислоти в силосі та сінажі методом капілярного електрофорезу із застосуванням системи капілярного електрофорезу «Капель-105М». Цей метод є швидким у реалізації, не потребує дорогих реактивів, специфічних хроматографічних колонок та може застосовуватися, як альтернативний для даних випробувань [6].

Матеріали і методи. Метод базується на екстракції масляної кислоти із силосів/сінажів бідистильованою водою, необхідних розведеннях і кількісному визначенні її методом капілярного електрофорезу. Детектування масляної кислоти проводять за довжини хвилі 190 нм [7]. Діапазон визначення масляної кислоти становить від 0,05 до 50 % включно.

Для проведення випробувань було взято по 5 зразків силосів і сінажів з різних господарств і різного терміну зберігання. Зразки готували відповідно з методикою випробувань.

У процесі досліджень було здійснено такі процедури: підготовка капіляра до роботи, приготування буферних, калібрувальних і контрольних розчинів, калібрування системи капілярного електрофорезу «Капель-105М» і підготовка проб.

Калібрування системи проводили за допомогою калібрувальних і контрольного розчинів з використанням стандартного зразка бутирату натрію, виробництва фірми "Aldrich".

Аналізування зразків силосів і сінажів, проводили за відповідних параметрів приладу (табл. 1).

Таблиця 1

Умови проведення аналізу приладом «Капель-105М»

Схема аналізу	Умови досліджень
Довжина хвилі, нм	190
Температура, °С	20
Введення проби	30 мбар, 15 с
Напруга, кВ	Мінус 17
Час, хв	5 — 6
Довжина хвилі, нм	190

Результати й обговорення. Для калібрування системи капілярного електрофорезу було побудовано калібрувальний графік, реєструючи по дві електрофореграми для кожного розчину з концентрацією 100,0; 50,0; 10,0 мг/дм³ в умовах, відповідних аналізу.

Діапазони калібрування системи співпадають із діапазонами лінійності калібрувальної характеристики і складають: для масляної кислоти 10-100 мг/дм³. Перевірено стабільність

калібрувального графіку за допомогою контрольного розчину, встановлено ширину вікна ідентифікації 5 % і на отриманих електрофореграмах перевірено автоматичну ідентифікацію компоненту.

Електрофореграму калібрувального розчину з концентрацією 100 мг/дм³ масляної кислоти наведено на рис. 1.

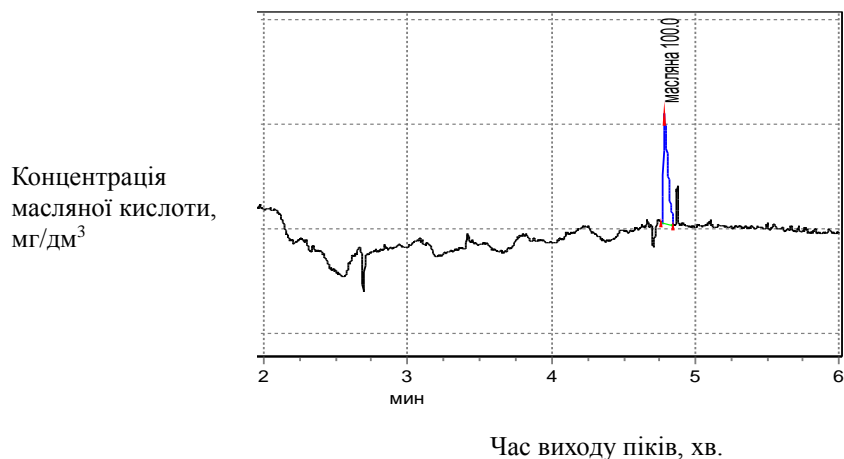


Рис. 1. Електрофореграма стандартного розчину масляної кислоти 100,0 мг/дм³

Аналізуючи час виходу піків калібрувальних розчинів з концентраціями 100,0; 50,0; 10,0 мг/дм³, можна зробити висновок, що він співпадає для досліджуваного компонента, незалежно від його концентрації і становить 4,4-4,9 хв. Висота і площа піків знижується прямопропорційно до заданої концентрації калібрувальних розчинів, що свідчить про прийнятність калібрувальних характеристик. При цьому значення відхилень у кожній точці калібрувальної характеристики не перевищують 10 %, а коефіцієнт кореляції більший 0,99.

Для силосу і сінажу при його натуральній вологості маса наважки складала 1000 мг. Зразки попередньо подрібнювали за допомогою млинка лабораторного. Проби досліджували без розведення ($Q_1 = 1$). Отримані водневі витяжки аналізували в день приготування.

У відповідних умовах було проведено аналіз взятих для досліджень зразків силосів і сінажів, отримано результати у вигляді електрофореграм, одну з яких подано на рис. 2.

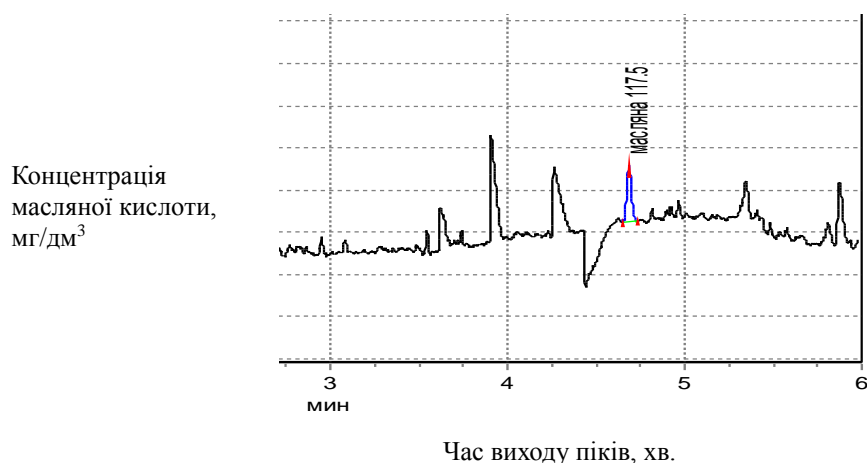


Рис. 2. Електрофореграма визначення вмісту масляної кислоти у дослідженому зразку сінажу

Використавши програмне забезпечення, на отриманих електрофореграмах зразків ідентифіковано пік масляної кислоти, який співпадає за часом міграції з ідентичним в

контрольному зразку. Показники, які характеризують отримані електрофореграми, наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати вмісту масляної кислоти у зразках силосів і сінажів, отримані методом капілярного електрофорезу

Назва зразка	Час виходу піків, хв.	Висота	Площа	Концентрація, мг/дм ³	Уміст масляної кислоти, %
Сінаж 1	4,692	0,372	9,443	44,17	0,66 ± 0,09
Сінаж 2	4,793	1,154	18,35	85,82	0,90 ± 0,13
Сінаж 3	4,687	1,331	25,13	117,5	1,90 ± 0,27
Сінаж 4	4,480	1,654	32,33	151,2	2,47 ± 0,45
Сінаж 5	4,633	1,810	84,24	394,1	5,11 ± 0,96
Силос 1	4,615	0,292	7,748	23,21	0,38 ± 0,08
Силос 2	4,744	1,383	22,55	109,7	1,57 ± 0,32
Силос 3	4,888	1,229	30,27	141,6	2,50 ± 0,37
Силос 4	4,828	1,697	42,96	201,0	3,41 ± 0,65
Силос 5	4,930	4,233	109,3	511,1	6,82 ± 1,02

Уміст масляної кислоти результатів двох паралельних визначень розраховано за відповідною формулою, з урахуванням маси зразка, взятого для аналізу, об'єму отриманого екстракту та додаткового розведення (за необхідності).

Проаналізувавши отримані результати, можна зробити висновок, що час міграції масляної кислоти у дослідних зразках співпадає з аналогічним у калібрувальних і контрольному розчинах, їх концентрація, висота їх піків та площа знаходились у межах діапазону вимірювання за даним методом.

На стадії відпрацювання методу та ідентифікації масляної кислоти у дослідних зразках, було застосовано метод добавок. Для цього у відфільтровану водну витяжку, вносили добавку стандартного зразка в концентрації 50-150 % від попереднього визначення. Збільшення висоти відповідного піку підтвердило правильність ідентифікації за відповідного часу міграції та в межах діапазону лінійності калібрувальної характеристики. Впроваджена методика дозволяє аналізувати зразки консервованих кормів із різною концентрацією масляної кислоти у діапазоні від 0,05 до 50 % включно.

У процесі впровадження методики було проведено її валідацію та розрахунок невизначеності, отримані результати подано в таблиці 3.

Таблиця 3

Бюджет невизначеності методу капілярного електрофорезу для визначення масляної кислоти у концентрованих кормах

Джерело невизначеності	Оцінка типу	Стандартна відносна невизначеність, %
Прецизійність визначення в умовах повторності* u_r	A	7,8
Маса проби u_m	B	0,6
Об'єм підготовленої проби u_v	B	1,2
Коефіцієнт розведення проби u_{Q1}	B	----
Коефіцієнт додаткового розведення проби u_{Q2}	B	1,5
Зразки для калібрування системи капілярного електрофорезу u_{r0}	B	2,5
Калібрування системи капілярного електрофорезу u_{gr}	A	5
Сумарна стандартна відносна невизначеність u_c , %		9,8
Розширена відносна невизначеність ($U_{від}$) при $k=2$, %		19,6
Розширена відносна невизначеність ($U_{від}$) при $k=2$ (прийнято), %		20

Значення меж відтворюваності R для ймовірності P = 0,95 становить 28,0 %, межа

повторності (відносна значення допустимої розбіжності між двома результатами паралельних визначень) $r = 22,0 \%$.

Отже, отримані нами результати досліджень задовольняють вимоги атестованої методики і є прийнятними при дотриманні рекомендованих значень об'ємів розчинів і розведень проб, залежно від їх виду та вмісту досліджуваного показника.

ВИСНОВКИ

1. Отримані результати досліджень свідчать, що метод капілярного електрофорезу, проведений за допомогою приладу «Капель-105М» є відтворюваним, достатньо точним та вірогідним у випадку досліджень силосів і сінажів за вмістом масляної кислоти. Калібрувальні характеристики задовольняють умови для даного методу досліджень, а саме: коефіцієнт кореляції більший 0,99, а значення відхилень у кожній точці не перевищує 10 %.

2. Застосований метод добавок для ідентифікації масляної кислоти дозволив краще ідентифікувати цей компонент з відповідними висотою, площею і концентрацією, а також часом міграції піків.

3. Прецизійність визначення в умовах повторності становить 7,8 %, а розширена відносна невизначеність ($U_{\text{від}}$) при $k=2$ – 20,0 %.

4. Отже, метод капілярного електрофорезу може застосовуватися для контролювання вмісту масляної кислоти у силосах і сінажах.

Перспективи досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на впровадження та відпрацювання методу капілярного електрофорезу для одночасного визначення вмісту органічних кислот у концентрованих кормах.

CONTROL OF CONTENT OF BUTYRIC ACID IN SILAGE AND SOILAGE METHOD OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS

H. P. Ryvak

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

S U M M A R Y

The article substantiates the problem of controlling silage and soilage in the content of butyric acid, as well as the necessity of introducing new alternative, more precise methods for determining this indicator as an indicator of the deterioration of canned feed. The principle of the method of capillary electrophoresis, calibration of the system and the course of determination of butyric acid in silage and soilage are described. The results of researches of samples of silage and soilage with different shelf life and quality of silage on the index of butyric acid content are presented. Also, the evaluation (validation) of the method was carried out with a view to its application in controlling the quality of these feeds in terms of the content of butyric acid.

Keywords: BUTYRIC ACID, SILAGE, SOILAGE, METHOD OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS, STANDARD SAMPLES.

КОНТРОЛЬ СОДЕРЖАНИЯ МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В СИЛОСАХ И СЕНАЖАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Г. П. Рывак

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 обоснована проблема контроля силосов и сенажей по содержанию масляной кислоты, а также необходимость внедрения новых альтернативных, более точных методов определения этого показателя, как индикатора порчи консервированных кормов. Описаны принцип метода капиллярного электрофореза, калибровки системы и ход определения масляной кислоты в силосах и сенажах. Представлены результаты исследований образцов силосов и сенажей с разным сроком хранения и качеством силосования по показателю содержания масляной кислоты. Также, проведена оценка (валидация) метода с целью его применения при контроле качества консервированных кормов по содержанию масляной кислоты.

Ключевые слова: МАСЛЯНАЯ КИСЛОТА, СИЛОС, СЕНАЖ, МЕТОД КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА, СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Технологія виробництва продукції тваринництва. За ред. О. Т. Бусенка. – К.: Вища освіта, 2005. – 496 с.
2. *Дмитроченко А. П.* Кормление сельськохозяйственных животных/ А.П. Дмитроченко, П.Д. Пшеничний. – [2-е изд.] – К.: Колос, 1975. – 480 с.
3. Корми: довідкова книга / Киреев В. Н., Щеглов В. В., Ігловіков В. Г. та ін. – М.: Колос, 1997.
4. ДСТУ 4782:2007 Силос. Технічні умови // Наказ Держспоживстандарту від 18.05.2007 р. № 104. – 18 с.
5. ДСТУ 4684:2006 Сінаж. Технічні умови // Наказ Держспоживстандарту від 07.09.2006 № 273. – 18 с.
6. *Комарова Н. В., Каменцев Я. С.* Практическое руководство по использованию системы капиллярного электрофореза «Капель». Санкт-Петербург, 2008. – 208 с.
7. М 04-74-2012 «Корма и кормовые добавки. Методика измерений массовой доли органических кислот и их солей методом капиллярного электрофореза с использование системы капиллярного электрофореза «Капель-105» и «Капель-105М», Санкт-Петербург, 2012. (Свидетельство № 04.04.081/01.00035/2012 от 08.06.2012 аттестации методики метрологической службой).

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