

ВЛИЯНИЕ ОТБОРА ПРОБ НА ПОЛУЧЕНИЕ ДОСТОВЕРНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕЧЕБНЫХ КОМБИКОРМОВ ПОСЛЕ ГРАНУЛЯЦИИ

Грануляция комбикорма для свиноводческих предприятий представляет собой ключевой этап в производственном процессе, обеспечивающий улучшение питательных свойств и усвояемости корма. Этот процесс позволяет создать гранулы с более высокой плотностью и однородностью, что способствует лучшему перевариванию и усвоению питательных веществ. Исследования показывают, что использование гранулированных кормов приводит к увеличению прироста живой массы и улучшению конверсии корма по сравнению с рассыпными аналогами.

Добавление препаратов с антибиотиками в гранулированные корма осуществляется с целью лечения заболеваний, наиболее часто встречающихся при откорме свиней. Контроль концентрации антибиотиков в комбикормах после грануляции является необходимым для предотвращения риска развития антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

Долгосрочное применение антибиотиков может привести к изменению микрофлоры кишечника животных и снижению эффективности антибиотиков, что создает угрозу как для здоровья животных, так и для человека. Поэтому важно проводить регулярный мониторинг остаточного содержания антибиотиков в лечебных комбикормах, чтобы гарантировать их безопасность и соответствие современным требованиям к качеству продукции. Лечебные корма на комбикормовом заводе производят по письменной заявке предприятия.

Снижение активности антибиотиков после грануляции может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, высокая температура, используемая при грануляции, может приводить к термической инактивации антибиотиков, что снижает их эффективность. Во-вторых, взаимодействие антибиотиков с другими компонентами корма может влиять на их активность, изменяя химическую структуру или усвояемость. Таким образом, понимание этих процессов и выбор стабильных антибактериальных действующих веществ (ДВ) в препарате критически важны для обеспечения здоровья животных.



Исследования проводились на базе диагностического центра «Эпсилон-Био» и областного бюджетного учреждения «Курская областная ветеринарная лаборатория». Объекты исследований — пробы гранулированного комбикорма, произведенного на ККЗ предприятий в сфере промышленного свиноводства, а также антибактериальные препараты серий, которые добавлялись в комбикорма.

На первых двух этапах проверяли пробы комбикорма без уточнения подробностей их отбора согласно ГОСТ 13496.0-2016¹. На третьем этапе проводили отбор проб комбикорма совместно со специалистами предприятий согласно методике, описанной ГОСТ 13496.0-2016.

Содержание ДВ антибиотиков в комбикормах определяли методом ВЭЖХ-МС, так как специфичность этого анализа значительно превосходит иммунологические методы и классическую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) при анализе молекул с низким молекулярным весом и обладает значительно более высокой производительностью, чем газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС).

Основными достоинствами метода ВЭЖХ-МС — возможность точного количественного анализа малых молекул, уникальная специфичность и высокая скорость анализа.

Количественный анализ ДВ антибиотиков проводили в соответствии

¹ ГОСТ 13496.0-2016 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб (с поправкой).

с нормативной документацией (НД РФ):

1. ГОСТ 34136-2017² Валидация, акт внедрения 28.03.2019.

2. ГОСТ 34533-2019³ Валидация, акт внедрения 28.03.2019.

3. ГОСТ 31694-2012⁴ Валидация, акт внедрения 28.03.2019.

В условиях ОБУ «Курская областная ветеринарная лаборатория» была проведена валидация данного метода, в которой установлены все метрологические характеристики, позволяющие судить об адекватности результатов определения ДВ антибиотиков в комбикорме. В ходе валидации были установлены критерии правильности и промежуточной прецизионности, подтверждена стабильность результатов измерений, проведенных по вышеуказанной НД.

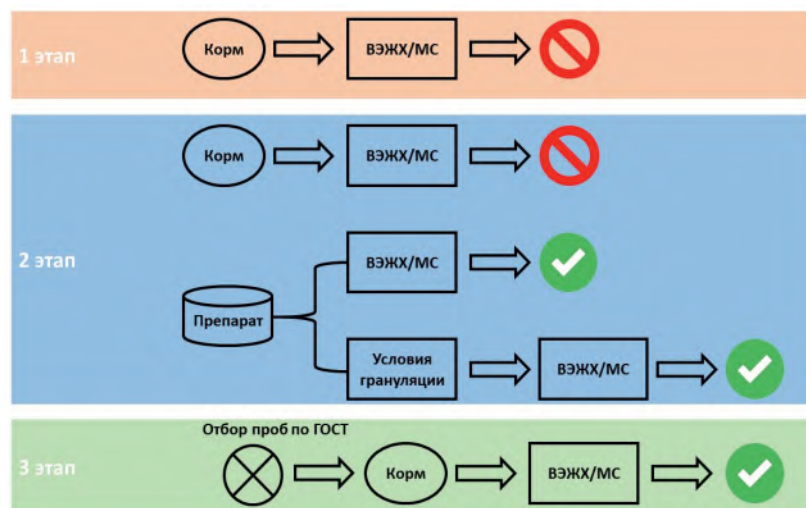
Количественное определение антибиотиков проводили по площадям хроматографических пиков с помощью градуировочной характеристики, полученной при анализе градуировочных растворов в аналогичных условиях.

Средства измерений и программное обеспечение

1. Жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8040 (Shimadzu, Япония) с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором с диапазоном измерений от 10 до 2000 атомных единиц массы (а. е. м.) с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим MS/MS).

2. Колонка Alltima C18, 5 мкм (Alltech, США).

Схема 1. Этапы проведения исследования



Все использованные реактивы были не ниже марки ОСЧ. Сравнение проводили по калибровочной кривой с автоматической обработкой данных с использованием программного обеспечения LabSolutions LCMS / Insight License for TQ.

Исследование проводилось в три этапа (схема 1). На первом этапе были проанализированы комбикорма, поступившие от предприятий — клиентов ООО «Эпсилон-Био». Информация о процессе отбора проб оставалась конфиденциальной. Результаты первого опыта представлены в таблице 1 (опыт 1). Как видно из полученных данных, концентрации ДВ антибиотиков в лечебном гранулированном корме оказались значительно ниже ожидаемых значений, что подчеркивает необходимость проведения дальнейших исследований.

На втором этапе исследовались комбикорма от предприятий-клиентов параллельно с антибактериальными препаратами тех же серий, которые добавляли в комбикорма при грануляции. Информация о процессе отбора проб оставалась конфиденциальной. Результаты второго опыта представлены в таблице 1 (опыт 2). Как видно из полученных данных, концентрации ДВ антибиотиков в гранулированном корме, так же как и в первом опыте, оказались значительно ниже ожидаемых значений.

Для исключения возможности того, что низкая концентрация ДВ антибиотиков в комбикормах была обусловлена разрушением их физико-химических структур в процессе грануляции, была проведена оценка термостабильности ветеринарных препаратов в условиях грануляции

Таблица 1. Результаты опытов по определению содержания действующих веществ антибактериальных препаратов в гранулированных комбикормах

Наименование препарата	Ожидаемый % ДВ антибиотиков, мкг/кг	Опыт 1. Содержание ДВ антибиотиков в гранулированном корме	Опыт 2. Содержание ДВ антибиотиков в гранулированном корме параллельно с определением термостабильности внесенного вещества	Опыт 3. Содержание ДВ антибиотиков в гранулированном корме, отобранном комиссионно по ГОСТ
		% ДВ антибиотиков, мкг/кг	% ДВ антибиотиков, мкг/кг	% ДВ АБ, мкг/кг
Амоксициллин 20% (1,5 кг / 1 т)	300 000	84 799	163 801	298 303
Флорфеникол 4% (2,5 кг / 1 т)	100 000	31 640	58 917	97 869
Доксициклин 20% (1 кг / 1 т)	200 000	148 159	156 739	194 863
Тиамулин 80% (250 г / 1 т)	200 000	169 385	171 485	197 937
Тиамулин 80% (125 г / 1 т)	100 000	71 943	86 358	98 038

² ГОСТ 34136-2017 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевомугутинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

³ ГОСТ 34533-2019 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

⁴ ГОСТ 31694-2012 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

Таблица 2. Результаты опытов по определению концентраций действующих веществ антибактериальных препаратов в условиях гранулирования кормов

Наименование препарата	Условия, созданные в эксперименте с антибиотиков		Содержание ДВ по нормативу, мг/г	% ДВ антибиотиков после создания условий грануляции / проверки термостабильности, мкг/кг
	t обработки паром, °C	экспозиция обработки паром, сек.		
Тиамулин 80%	до нагревания		720,0–880,0	825 857 500
	82	360		812 996 000
	130	30		827 000 500
Флорфеникол 4%	до нагревания		36,0–44,0	42 984 237
	85	90		41 067 432
Доксициклин 20%	до нагревания		180,0–220,0	202 673 381
	82	360		203 854 793
	130	30		201 938 875
Амоксициллин 20%	до нагревания		180,0–220,0	204 328 500
	80	120		201 882 000
	85	90		201 105 000
	90	60		200 115 000

на комбикормовом заводе (ККЗ), в том числе при намеренно завышенных температурных условиях. Результаты предоставлены в таблице 2. Как видно из полученных данных, все препараты не утратили своих физико-химических свойств даже при экстремальных условиях, имитирующих процесс грануляции.

На третьем этапе исследовались комбикорма, отобранные на предприятиях совместно со специалистами «Эпсилон-Био» по методике ГОСТ 13496.0-2016. Результаты третьего опыта представлены в таблице 1 (опыт 3). Как видно из полученных данных, концентрации ДВ антибиотиков в гранулированном корме в данном опыте наиболее соответствуют концентрациям, заявленным в рецептуре.

Исходя из проведенных опытов, следует сделать вывод, что заниженное и неравномерное содержание ДВ% антибиотиков в образцах комбикорма, отобранных после смешивания и прошедших грануляцию, указывает на необходимость особого внимания к процедуре отбора и транспортировки проб (образцы при транспортировке не отбирались и не исследовались), которая должна осуществляться в строгом соответствии с ГОСТ 13496.0-2016. Проводить регулярный мониторинг лечебных гранулированных комбикормов на процент содержания антибактериальных препаратов. Для снижения вероятности значительных погрешностей в исследовании крайне важно соблюдать все правила отбора проб комбикорма.

Правила отбора проб по ГОСТ 13496.0-2016 распространяются

на комбикормовое сырье и комбикормовую продукцию: комбикорма, кормовые смеси, белково(амидо)-витаминно-минеральные концентраты, премиксы:

- отбор проб должны проводить опытные, специально подготовленные работники, которые ознакомлены с рисками и опасностями, связанными с данной продукцией и процессом отбора проб. Они должны провести идентификацию партии, то есть проверить соответствие массы партии, маркировки на упаковке или этикетке (ярлыке, листе-вкладыше) той информации, которая указана в сопроводительных документах;
- от соблюдения методов выделения выборки, отбора точечных проб (количество продукта, отобранное одновременно из одной точки партии) и подготовки пробы для анализа во многом зависят конечные результаты испытаний продукции проверяемой партии;
- пробы должны быть представительными по отношению к проверяемой партии. При отборе и хранении проб должны быть приняты меры, препятствующие изменению их состава и качества;
- если партия неоднородная, ее делят на части, обладающие более близкими свойствами, отбор проб осуществляют от каждой части как от отдельной партии;
- если часть партии повреждена во время транспортирования, то отделяют поврежденную часть, отбор проб от нее осуществляют отдельно;
- отбор проб следует проводить таким образом, чтобы предотвратить попадание в отобранные пробы

пыли, влаги и другого случайного загрязнения;

- отбор проб от партии проводят путем многократного отбора точечных проб из различных мест партии. Точечные пробы объединяют и перемешивают, получая объединенную пробу, из которой путем деления получают лабораторные пробы, предназначенные для проведения испытаний;
- оборудование и вспомогательные материалы для отбора и подготовки проб должны быть чистыми, сухими, без посторонних запахов, простыми, надежными и легкоочищаемыми. Материалы, из которых они изготовлены, не должны оказывать влияния на качество. Рекомендуется использовать нержавеющую сталь (при низкой кислотности проб допускается использовать алюминий). Запрещено использовать медь, сплавы из меди и другие токсичные материалы. В случае применения стеклянных материалов следует соблюдать особые меры предосторожности во избежание попадания стекла в продукт;
- емкости для хранения проб должны быть чистыми, сухими, без посторонних запахов, плотно закрывающимися и изготовленными из химически нейтрального материала. Если пробы предназначены для определения фоточувствительных веществ, например витаминов, то емкости должны быть из темного или светонепроницаемого материала. Запрещено для хранения проб использовать емкости из алюминия, меди, сплавов из меди и других токсичных материалов;

- емкости должны иметь размер, незначительно превышающий размер помещаемой пробы;

- оборудование для отбора проб выбирают в зависимости от места отбора проб, физического состояния и размеров частиц отбираемой продукции, объема отбираемой пробы, размера емкости и т. д.;

- точечные пробы продукции в производственных цехах отбирают с транспортеров, из-под бункеров, весов или технологического оборудования путем пересечения падающей струи через равные промежутки времени. Временные диапазоны отбора точечных проб устанавливают в зависимости от скорости перемещения продукта и объема партии.

Количество отбираемых точечных проб определяют в зависимости от массы партии. Минимальное количество отбираемых точечных проб указано в таблице 3.

С целью образования объединенной пробы все точечные пробы помещают в чистую сухую емкость и тщательно перемешивают совком. Минимальная масса объединенной пробы должна соответствовать массе, указанной в таблице 4.

Объединенную пробу сокращают вручную или механическим способом до получения одной или нескольких лабораторных проб. Каждая лабораторная проба, предназначенная для исследования или хранения на предприятии для повторных исследований (при необходимости), должна быть массой не менее 2 кг, что является минимальным количеством для получения анализируемой пробы и контрольной.

Для сокращения объединенной пробы вручную ее высыпают на чистую гладкую поверхность и разравнивают в виде квадрата двумя



планками со скошенными ребрами. Затем одновременно с двух противоположных сторон продукт подгребают к середине таким образом, чтобы получился валик. После этого продукт захватывают с концов валика и подгребают к середине.

Такое перемешивание продукта повторяют три раза, затем объединенную пробу вновь разравнивают тонким слоем и специальным металлическим устройством или планкой делят по диагонали на четыре приблизительно равных треугольника. Продукт, находящийся в двух противоположных треугольниках, отодвигают в сторону, а в двух оставшихся — соединяют, перемешивают и продолжают таким же образом делить, пока масса оставшейся части не составит 2 кг.

Для сокращения объединенной пробы с помощью механических устройств используют желобковые, конусные или роторные делители.

Выделенные лабораторные пробы помещают в отдельные емкости.

Каждую емкость для проб плотно закрывают и печатают. Если емкость трудно опечатать, она может быть помещена в льняной, хлопчатобумажный или пластиковый мешок, который плотно завязывают и опечатывают.

К емкости либо таре, содержащей лабораторную или контрольную пробу, прикрепляют этикетку, на которую наносят следующую информацию:

- наименование организации, осуществляющей отбор проб, и фамилию лица, проводившего отбор проб;

- место и дату отбора проб;

- наименование и назначение продукта;

- наименование страны-изготовителя, наименование организации — изготовителя продукции, ее адрес;

- номер и размер партии;

- дату выработки продукции;

- массу пробы.

Отбор проб оформляют актом, который составляет и подписывает лицо, проводившее отбор проб. К акту прилагают копии этикеток, прикрепляемых к упаковке либо емкости, или копию товарно-транспортной накладной.

Акт отбора проб должен содержать ту же информацию, что и на этикетках, цель отбора проб, количество и массу лабораторных проб, направляемых в испытательную лабораторию, информацию, касающуюся отступления от методики отбора проб, и другие подробности.

Пробы хранят в условиях, установленных нормативными правовыми актами, действующими на территории государства, принявшего настоящий стандарт, или в нормативной и технической документации на данный продукт, чтобы предотвратить любые изменения пробы.

Срок хранения проб должен соответствовать сроку хранения продукции, указанному в нормативных правовых актах, действующих на территории государства, принявшего настоящий стандарт, или в нормативной и технической документации на данный продукт, но не более шести месяцев с момента отбора проб.

Иванова Н.А., директор
Качалов А.К., ведущий специалист
Диагностический центр «Эпсилон-Био»

Таблица 3. Минимальное количество отбираемых точечных проб комбикормов

Масса партии m , т	Минимальное количество точечных проб
До 2,5 (включительно)	7
Свыше 2,5	$\sqrt{20m}$, но не более 100

Таблица 4. Минимальная масса объединенной пробы

Масса партии m , т	Минимальная масса объединенной пробы, кг
До 1 (включительно)	4
Свыше 1 (до 5)	8
Свыше 5 (до 50)	16
Свыше 50 (до 100)	32
Свыше 100 (до 500)	64