

Z á k l a d n í c h e m i c k é r o z b o r y k r m í v
. S t a n o v e n í s u š i n y a v o d y k r m í v a

Stanovení sušiny a vody při 103 °C.

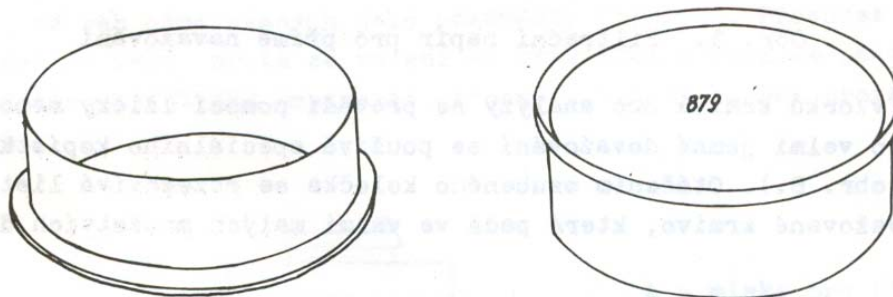
Princip metody:

Sušina krmiva se stanoví jako zbytek krmiva po vysušení vzorku při 103 °C za předepsaných podmínek.

Zkušební pomůcky:

hliníková vysoušečka s víčkem (obr. 9.)

horkovzdušná sušárna odpovídající požadavkům pro dosažení předepsaných teplot



Obr. 9. Hliníková vysoušečka

Pracovní postup:

a) u krmiva suchého nebo předušeného:

do předem vysušené a odvážené hliníkové vysoušečky s víčkem se naváží 5 - 10 g vzorku krmiva s přesností 0,001 g. Otevřená vysoušečka se vloží do vyhřáté

sušárny a vzorek se suší při 103°C po dobu 4 – 6 hodin podle povahy krmiva.

Doba teploty se počítá od dosažení předepsané teploty. Po vysušení se vysoušečka uzavře víčkem a nechá se vychladnout v exikátoru. Po vychladnutí se vysoušečka s krmivem opět zváží.

Výpočet sušiny krmiva

$$x = \frac{b}{a} \cdot 100$$

x - % obsah sušiny,

a - navážka vzorku krmiva v g,

b - hmotnost vysušeného krmiva v g

Poznámka: při výpočtu hmotnosti navážky i vysušeného krmiva je nutno odečítat hmotnost vysoušečky

b) u krmiva vlhkého s obsahem vody nad 15 %:

Krmiva s vyšším obsahem vody je nutno předsušit ve vhodné sušárně při 55 - 60 °C. Krmiva hrubá (zelená píče, siláž, okopaniny) se rychle rozřežou, nakrouhají nebo nastříhají na částice vhodné pro sušení, ale tak, aby nedošlo ke ztrátám šťávy a vysýchání před odvážením navážky. Po dokonalém promíchání se krmivo naváží s přesností 1 g, na předem zvážené lísce, umělohmotné, skleněné či papírové misky a nechá se sušit v sušárně s intenzivním větráním. Aby nedocházelo k úletu částic, chrání se krmivo na lísce či v misce hustou síťovinou. Krmivo se takto suší asi 24 hodin, až se získá zdánlivě suchá hmota. Potom se vzorek nechá asi 24 hodin volně na vzduchu v laboratoři, aby získal rovnovážnou vlhkost laboratoře. Musí se však chránit před zaprášením či dalším rozptýlováním vysušených částic. Potom se vzorek zváží s přesností na 1 g. A dále se vzorek upraví pro chemické analýzy rozemletím. Jemnost mletí je taková, aby krmivo beze zbytku prošlo sítím s kruhovými oky o průměru 1 mm.

Takto upravený vzorek se použije ke stanovení původní sušiny i dalším analýzám.

Výpočet původní sušiny krmiva

$$x = \frac{B \cdot b}{A \cdot a} \cdot 100$$

x - % obsah sušiny

A - navážka vlhkého vzorku k předsušení v g

a - navážka předsušeného vzorku v g

B - hmotnost vzorku po předsušení v g

b - hmotnost vzorku po vysušení při 105 °C v g

Dusíkaté látky

Dusíkaté látky (NL) v krmivu se nejčastěji stanovují **metodou dle KJELDAHLA**, přičemž se dusík násobí faktorem dusíku.

Dusíkaté látka se dělí:

1. Bílkoviny – se stanovují ve dvou fázích a) vysrážení bílkovin metodou dle Barnsteina
b) stanovení dusíku metodou dle Kjeldahla
2. Dusíkaté látky nebílkovinné

Bílkoviny

Bílkoviny (proteiny – z řeckého proteios = prvořadý) jsou základní látkou jakéhokoliv živého systému. Jsou to vysokomolekulární látky složené z 20 aminokyselin.

Bílkoviny jsou polymery stavebních složek - aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy v buněčných organelách, které nazýváme ribosomy.

Bílkoviny obsahují v molekule většinou od 100 do 1000000 aminokyselin, vzájemně provázaných **peptidovými vazbami.** Význačnější roli ve výživě zvířat představuje cca 20 aminokyselin a z nich **10 esenciálních aminokyselin,** které musí zvíře dostat potravou (nedokáže si je syntetizovat v játrech ze složek nebílkovinné povahy transaminací). Příjem bílkovin potravou je nezbytným zdrojem dusíku a síry a esenciálních aminokyselin, které si živočišný organismus není schopen vytvořit endogenně.

Bílkoviny tvoří, vedle vody většinu hmoty živých organismů.

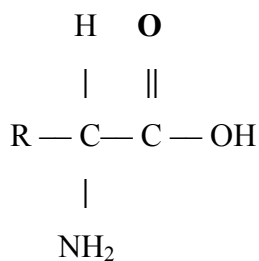
Podle **biologické funkce,** kterou vykonávají se rozlišují na **proteiny strukturální** (tvoří stavební části živočišných pletiv – tkáně a orgány), **katalytické (enzymy), transportní** (umožňující přenos dalších sloučenin-například hemoglobin pro přenos kyslíku), **pohybové** (například svalové aktiny, myozin, aktomyozin), **obranné (imunoglobuliny - protilátky), zásobní (ferritin aj.), regulační (hormony) a konečně výživové (hlavní zdroj dusíku v potravě - aminokyseliny sloužící k výstavbě a obnově tkání).**

Základním stavebním kamenem jsou aminokyseliny

Esenciální (nepostradatelné) – lysin, metionin, treonin, tryptofan, fenylalanin, valin, leucin, isoleucin, arginin, histidin

Non esenciální (postradatelné) – tyrozin, cystin, cystein, alenin, serin, kyselina asparagová, asparagin, kyselina glutamová, glutamin, prolin, hydroxyprolin

Základní vzorec všech aminokyselin



R = organický radikál, kterým se aminokyseliny od sebe odlišují

NH₂ = aminová skupina

COOH = karboxylová skupina

Živočišný organismus je závislý na pravidelném a vyrovnaném přísunu aminokyselin, neboť dokáže vytvářet **zásobu aminokyselin pouze na jeden den a to v játrech**. Tuto jednodenní zásobu aminokyselin nazýváme **aminokyselinový pool**. Zbylé aminokyseliny je organismus nucen odbourat. Zásoby tělesného proteinu a aminokyselin představují vedle aminokyselinového poolu i svaly, dále proteiny a aminokyseliny v krevní plazmě a v trávicí soustavě. Z tohoto důvodu se aminokyseliny konzumované v nadbytku neskladují a jsou degradovány za vzniku urey a ketokyselin, užívaných jako přímý zdroj energie, ke glukoneogézi a přeměně na tuk.

Degradace a resyntéza bílkovin probíhá v těle nepřetržitě. Při resyntéze dochází k ztrátám aminokyselin oxidačními pochody za vzniku metabolických produktů: urey, kreatininu a dalších. Aminový dusík představuje 16 % hmotnosti proteinu. Nejvýznamnější jsou ztráty dusíku močí, dále ve výkalech, potu, odloupaných epitelích, chlupcích, peří. Dusíková bilance je rozdíl mezi přijatým a vyloučeným dusíkem.

Proteosyntéza = proces tvorby bílkovin řetězením aminokyselin

- ribosomy
- endoplasmatické retikulum
- zákon minima
- limitující aminokyselina

Trávení a metabolismus bílkovin

Proces trávení bílkovin je enzymová hydrolyza, která probíhá na několika stupních, z nichž každý v jiné části trávicího ústrojí a reakce jsou katalyzovány jinými enzymy.

První stupeň trávení bílkovin začíná **v žaludku**, kde jsou vystaveny účinku žaludeční šťávy, jejíž pH je 1.5. Jejimi nejdůležitějšími složkami jsou voda, kyselina chlorovodíková a z proteolytických enzymů to jsou především **pepsin a rennin**. Působením pepsinu se dlouhé řetězce aminokyselin naštěpí na kratší úseky, které nazýváme polypeptidy.

Další proces trávení polypeptidů pokračuje **v tenkém střevě**. Zde se uplatňuje pankreatická šťáva (pH 7.5), která obsahuje dva významné proteolytické enzymy – **trypsin a chymotrypsin**. Působením těchto enzymů se polypeptidy štěpí na další kratší úseky oligopeptidy. V tenkém střevě kromě pankreatické šťávy působí také střevní šťáva. Ta obsahuje další specifické proteolytické enzymy, jako jsou **karboxypeptidázy, aminopeptidázy, dipeptidázy**. Uvedené enzymy štěpí oligopeptidy na jednotlivé aminokyseliny.

Aminokyseliny se vstřebávají v tenkém střevě a přecházejí vrátnicovým krevním oběhem do jater nebo do lymfatického oběhu. Nevstřebažené aminokyseliny nebo peptidy jsou dále v tlustém střevě metabolizovány střevní mikroflorou za vzniku produktů hnití (sulfan, indolové deriváty).

Přeměna a odbourávání nadbytečných aminokyselin

Aminokyseliny se mohou také vzájemně přeměňovat, přičemž se po odštěpení amoniaku získá uhlíkatý skelet molekuly, ten se přemění na jiný a ten dává pak s amoniakem jinou aminokyselinu (tento děj není možný u esenciálních aminokyselin). Tento proces se nazývá **transaminace** a je jedním ze tří způsobů odbourávání relativně nadbytečných aminokyselin.

Uhlíkaté skelety aminokyselin se také mohou odbourávat v citrátovém cyklu na oxid uhličitý a vodu, za uvolnění energie. Odbouraný amoniak se v trávicím systému přeměňuje na močovinu a jako součást moče se vyloučí z těla, uhlíkatý zbytek aminokyselin se může využít k syntéze lipidů nebo sacharidů. Takovýto způsob odbourávání aminokyselin označujeme jako **deaminaci (redukční a oxidační)**.

Třetím způsobem odbourávání aminokyselin je **dekarboxylace**, kdy odnětím oxidu uhličitého za pomoci dekarboxyláz se vytváří vysoce biologicky účinné látky, tzv. biogenní aminy:

Lysin – kadaverin, ornitin – putrescin, serin – etanolamin (složka fosfolipidů), cystein – cysteamin (složka koenzymu A), histidin – histamin (tkáňový hormon), tyrosin – tyramin (vliv na kontrakce dělohy), hydroxy-tryptofan – serotonin (tkáňový hormon)

Podle toho, jakým způsobem se aminokyseliny během energetického metabolismu odbourávají, se dělí na tyto skupiny:

- a) **glukogenní** – přeměňují se na glukózu (glycin, alanin, valin, kyselina asparagová a glutamová, serin, treonin, cystein, metionin, prolin, hydroxyprolin, arginin, histidin) a slouží tak k resyntézy glukózy (glukoneogeneze) a to přes látky typu pyruvát, oxalacetát, α – oxoglutarát, sukcinyl – Co A a fumarát.
- b) **ketogení** – přeměňují se na acetyl Co A (leucin)
- c) **smíšené** – mohou se odbourávat oběma mechanismy (isoleucin, lysin, tryptofan, fenylalanin, tyrosin), tzn. že vznikat může jak acetyl Co A, tak i např. sukcinyl Co A nebo fumarát

Dusíkaté látky nebílkovinné povahy

- amidy (sole aminokyselin)
- nízkomolekulární peptidy
- volné aminokyseliny
- nukleové látky (nukleové kyseliny, nukleotidy, nukleosidy, volné purinové a pyrimidinové base)

Energetický obsah je zanedbatelný, významnější z pohledu výživy je obsah dusíku.

Významnou skupinou patřící mezi dusíkaté látky nebílkovinné povahy jsou **dusičnany a dusitany obsažené v zelených a jiných krmivech a synteticky vyrobená močovina a amonné soli (síran amonný).**

Dusičnany a dusitany

Obsah dusičnanů je ovlivněn:

- přehnojováním N ke krmným plodinám
- krmivo se seká brzy po podání velkých dávek hnojivého N
- snížená fotosyntéza
- stáří porostu

Nežádoucí změny způsobené zvýšeným přívodem N do porostu:

- snížení kvality NL (roste nebílkovinný dusík, bílkoviny jsou stejné)
- pokles energetické hodnoty zelené píce, snižuje se obsah BNLV
- v porostu se snižuje zastoupení luskovin a hodnotných bylin
- mírný pokles doживosti
- pro rychlý růst rostlin dochází ke snížení akumulace stopových prvků
- zhoršené zabřezávání

Dusičnany jsou obsaženy především v lodyhách rostlin, hlavně ve spodní části, méně v horních částech rostlina a v listech. Květy, plody a podzemní části rostlin téměř neobsahují.

Krmiva, která mohou obsahovat velké množství dusičnanů – kukuřice, slunečnice, krmná kapusta, chrást cukrovky a řepy. Stářím rostliny obsah dusičnanů klesá.

Močovina a amonné soli (síran amonný)

Za předpokladu, že v krmné dávce přežvýkavců je dostatek lehce využitelných sacharidů, využívá mikroflóra trávicího traktu vzniklý amoniak ke stavbě bílkovin těla

Stanovení dusíkatých látek (NL)

Při rozborech krmiv stanovujeme dusíkaté látky vedle dalších obsažených živin. Jde většinou o stanovení celkového obsahu dusíku. Z pohledu novějších požadavků výživy zvířat není stanovení dusíkatých látek dostačující.

Hodnoty dusíkatých látek v sobě zahrnují i dusíkaté látky nebílkovinné povahy. Určitým zpřesněním je stanovení tzv. čisté bílkoviny. Nejdokonalejší přehled o hodnotě dusíkatých látek dávají však metody, při nichž se stanovuje obsah a zastoupení jednotlivých aminokyselin, zvláště pak aminokyselin esenciálních.

Stanovení dusíkatých látek metodou podle Kjeldahla

Princip metody

Vzorek krmiva se mineralizuje kyselinou sírovou za varu a přítomnosti katalyzátoru. Dusík v krmivu se zmineralizuje na síran amonný, z něhož se v alkalickém prostředí uvolní amoniak, ten se předestiluje s vodní parou do předlohy a titračně se stanoví.

Zkušební pomůcky a chemikálie

- mineralizační Kjeldahlova baňka
- zařízení pro mineralizaci vzorků
- destilační přístroj vhodné konstrukce
- kyselina sírová, koncentrovaná, dusíku prostá
- hydroxid sodný, roztok 33 %

- katalyzátor (1000 g bezvodého síranu draselného, 100 g krystalického síranu měďnatého, 20 g práškového selenu)
- kyselina boritá, roztok 2 %
- kyselina chlorovodíková, odměrný roztok 0,1 N nebo 0,25 N
- kyselina sírová, odměrný roztok 0,1 N nebo 0,25 N
- hydroxid sodný, odměrný roztok 0,1 N nebo 0,25 N
- indikátor: Tachirův směsný
Kongo červen

Pracovní postup:

Naváží se 1,000 gram upraveného vzorku krmiva s přesností na 0,0001 g. Navážka se převede do mineralizační tuby. Ke vzorku v mineralizační tubě se přidá 5 – 10 g katalyzátoru. Potom se přidá 30 ml koncentrované kyseliny sírové. Mírným kroužením se promíchá. Takto

připravená mineralizační tuba se vloží do mineralizační jednotky přístroje Kjelttec. Nasadí se pohlcovač par, který je napojen na vodovodní řad. **Mineralizace vzorku** probíhá cca 2 hodiny při teplotě 400 °C. Mineralizuje se přesně 20 min po okamžiku, kdy obsah baňky se stane čirým a nazelenalým až namodralým. Zmineralizovaný vzorek se nechá vychladnout a do spáleného vzorku se přilije 100 ml destilované vody.

Ve druhé fázi stanovení dusíkatých látek proběhne destilace amoniaku. Tuba s mineralizovaným a naředěným vzorkem se upevní do destilační jednotky přístroje Kjelttec. Vloží se titrační baňka s 20 ml předlohy (kyselina boritá obarvená taschirem do fialova). Pustí se voda do chladiče a vyvíječe páry. Páčkou se 2x nadávkuje 150 ml 33% Na OH. Zapne se vyvíječ páry. Vlastní destilace od začátku varu trvá 5 min. Amoniak uvolněný ze síranu amonného se vodní parou predestiluje do předlohy. Obsah v předloze změní barvu na zelenou. Po ukončení destilace se titrační baňka s predestilovaným amoniakem sejme z přístroje a **obsah baňky se titruje 0,1 N roztokem HCl do šedé barvy.** Spotřeba HCl v ml se zaznamená a na jejím základě se spočte % NL.

Výpočet % dusíkatých látek (NL)

a) Výpočet % dusíku (N)

$$\% N = \frac{14,01 \times (\text{ml titrantu vzorku} - \text{ml titrantu prázdného}) \times 0,1}{\text{navážka (g)} \times 10}$$

ml titrantu vzorku – spotřeba 0,1 N HCl při titraci předlohy analyzovaného vzorku

ml titrantu prázdného - spotřeba 0,1 N HCl při titraci slepého vzorku

0,1 – molarity kyseliny chlorovodíkové pro titraci

b) Výpočet % NL(bílkovin)

% NL (bílkovin) = % N x faktor specifický pro různé produkty

Faktor N pro obilniny a mlýnská krmiva = 5,75

Faktor N pro živočišné moučky = 6,00

Faktor N pro mléko a mléčné výrobky = 6,38

Faktor N pro všechna ostatní krmiva a krmné směsi = 6,25

Faktor dusíku a jeho výpočet vychází ze skutečnosti, že bílkoviny krmiva obsahují v průměru 16% dusíku, tj. $100 : 16 = 6,25$

S t a n o v e n í č i s t ý c h b í l k o v i n p o d l e B a r n s t e i n a

Princíp metody:

Bílkoviny se vysráží mědnatou solí v alkalickém prostředí. Ve sraženině se dusík stanoví podle Kjeldahla.

Zkušební pomůcky a chemikálie:

- stolbova nálevka přetažená mlynářským sítem č.12, nasazená na vodní vývěvu
- odstředivka s kyvetami 100 ml
- síran mědnatý krystalický, roztok 6 %
- hydroxid sodný, roztok 1,25 %
- hexakvanoželezitan draselný, roztok 1 %

ostatní pomůcky jako při stanovení dusíkatých látek podle Kjeldahla.

Pracovní postup:

Naváží se 1 - 2 g vzorku s přesností 0,0001 g v lodičce. Převeďte se kvantitativně do kádinky o objemu 400 ml a přelege se 100 ml destilované vody. Vaří se 2 minuty od začátku varu, potom se přidá 25 ml roztoku síranu mědnatého a pozvolna za stálého míchání, stejné množství roztoku hydroxidu sodného. Kádinka se doplní horkou destilovanou vodou po okraj a sraženina se dekantuje.

Obsah kádinky přefiltrujeme přes řídký bezdusíkatý filtrační papír a sraženinu 3x promyjeme horkou destilovanou vodou. Filtrační papír se sraženinou vložíme do mineralizační tuby a v analýze pokračujeme metodou dle Kjeldahla.

Metodika stanovení neutrálně detergentní vlákniny (NDF) na přístroji ANKOM

Princip metody:

Vzorek rostlinného materiálu je hydrolyzován v neutrálním prostředí (pH 7) roztoku činidla laurylsulfátu sodného. Nehydrolyzovanými zbytky zůstává celulóza, komplex hemicelulóz a lignin.

Vlastní metodika:

Vysušené a šrotované (velikost částic 1 mm) vzorky rostlinného materiálu jsou naváženy v množství 0,5 g (+/- 0,05 g) do filtračních sáčků a provede se hydrolyza neutrálním roztokem. Hydrolyza probíhá 60 minut při teplotě 100 °C + 15 minut na přivedení k varu. Celková doba je tedy 75 minut. Před vložením nosiče s naváženými sáčky do přístroje se v malém množství detergentního činidla rozpustí 20 g siřičitanu sodného (dávka na 24 sáčků) a toto množství se vlije do přístroje. Pak se vloží nosič se sáčky a vše se zalije 2 l detergentního čidla. Po ukončené hydrolyze jsou sáčky 3x promyty horkou destilovanou vodou po dobu 5 minut a po okapání dány na 3 minuty do acetonu a vysušeny. Doba vysoušení je 2 – 3 hodiny při teplotě 105 °C. Vysušené a v exikátoru vychladlé sáčky se zváží a jsou spáleny v předem zvážených porcelánových kelímcích při teplotě 550 °C po dobu min. 2 hodin. Po vychladnutí se kelímky zváží a vypočte se obsah NDF dle vzorce:

$$\text{NDF} = ((w_3 - w_1) - w_4) / w_2 \times 100$$

w_1 – hmotnost sáčku

w_2 – navážka

w_3 – hmotnost sáčku po hydrolyze

w_4 – hmotnost popela

Příprava neutrálního činidla:

Odděleně za tepla se v přiměřeném množství vody rozpustí 37,22 g chelatonu III a 13,62 g tetraboritanu sodného, dále 60 g laurylsulfátu sodného a 20 ml ethylenglykolu a na konec 23,16 g hydrogenfosforečnanu sodného. Po dokonalém rozpuštění se všechny tři objemy smísí dohromady a převedou se do dvoulitrové odměrné baňky a doplní vodou po rysku. Zásobní roztok detergentního činidla je při běžných laboratorních podmínkách stabilní po dobu jednoho měsíce. Má vykazovat hodnotu pH v rozmezí od 6,9 do 7,1. V případě, že pH neodpovídá požadované hodnotě upraví se pomocí roztoku alkalického hydroxidu resp. minerální kyselinou a to před doplněním vodou na konečný objem. Roztok detergentního činidla silně pění a proto je třeba s ním opatrně manipulovat.

Metodika stanovení acido detergentní vlákniny (ADF) na přístroji ANKOM

Princip metody:

Vzorek rostlinného materiálu je hydrolyzován v kyselém prostředí roztoku kyseliny sírové za přidání činidla cetyltrimetylamoniumbromid. Zbytkem po hydrolýze je ligninocelulózový komplex.

Vlastní metodika:

Vysušené a šrotované (velikost částic 1 mm) vzorky rostlinného materiálu jsou naváženy v množství 0,5 g (+/- 0,05 g) do filtračních sáčků a provede se hydrolýza kyselým roztokem 1 N H₂ SO₄ s přidaným detergentním činidlem cetyltrimetylamoniumbromid. Hydrolýza probíhá 60 minut při teplotě 100 °C + 15 minut na přivedení k varu. Celková doba je tedy 75 minut. Po ukončené hydrolýze jsou sáčky 3x promyty horkou destilovanou vodou po dobu 5 minut a po okapání dány na 3 minuty do acetonu a vysušeny. Doba vysoušení je 2 – 3 hodiny při teplotě 105 °C. Vysušené a v exikátoru vychladlé sáčky se zváží a jsou spáleny v předem zvážených porcelánových kelímcích při teplotě 550 °C po dobu min. 2 hodin. Po vychladnutí se kelímky zváží a vypočte se obsah NDF dle vzorce:

$$\text{ADF} = ((w_3 - w_1) - w_4) / w_2 \times 100$$

w₁ – hmotnost sáčku

w₂ – navážka

w₃ – hmotnost sáčku po hydrolýze

w₄ – hmotnost popela

Příprava detergetního činidla:

54 ml koncentrované kyseliny sírové se opatrně smísí s 1,5 litrem destilované vody. V roztoku se za horka rozpustí 40 g cetyltrimetylamoniumbromidu. Vše se převede do 2 litrové odměrné baňky doplní se destilovanou vodou po rysku.

Metodika stanovení acido-detergentního ligninu (ADL) na přístroji ANKOM

Princip metody:

Lignin se stanovuje jako zbytek z lignocelulózového komplexu po oxidaci kyselinou sírovou za studena. Takto stanovený lignin se označuje jako S-lignin

Vlastní metodika:

Ke stanovení ADL jsou použity filtrační sáčky se vzorky, které prošly kyselou hydrolýzou pro stanovení ADF. Horkou vodou propláchnuté vzorky se po okapání vloží do 72 % roztoku kyseliny sírové (720 ml 96 % H₂ SO₄ + 240 ml H₂O) a při pokojové teplotě 20 °C jsou extrahovány po dobu 3 hodin. Na počátku extrakce a potom v intervalu 30 minut je s nimi minimálně 30 zatřesen. Po extrakci se sáčky propláchnou 3x horkou destilovanou vodou v ANKOMU, vždy po dobu 5 minut. pH musí být alespoň 5,5. Propláchnuté vzorky se vysuší. Doba vysoušení je 2 – 3 hodiny při teplotě 105 °C. Vysušené a v exikátoru vychladlé sáčky se zváží a jsou spáleny v předem zvážených porcelánových kelímcích při teplotě 550 °C po dobu min. 2 hodin. Po vychladnutí se kelímky zváží a vypočte se obsah NDF dle vzorce:

$$ADF = ((w_3 - w_1) - w_4) / w_2 \times 100$$

w₁ – hmotnost sáčku

w₂ – navážka

w₃ – hmotnost sáčku po hydrolýze

w₄ – hmotnost popela

Metodika stanovení hrubé vlákniny acidoalkalickou metodou dle

Henneberg - Stohmanna (CF)

na přístroji FIBERTEC a ANKOM

Stanovení vlákniny běžnými analytickými metodami není příliš přesné. Stanovená vláknina je zastoupena celulórou, hemicelulórou, ligninem a pentosany. Přítomnost látek, které inkrustují celulózu je právě zdrojem chyb. Touto chybou je zatížena i dosud nejrozšířenější a nejvíce využívaná metoda stanovení vlákniny, metoda podle Henneberg-Stohmanna. Při rozbořech krmiv se užívá právě této metody. Vedle této se používá i metody Scharrera a Kürschnera zvláště u materiálů s vysokým obsahem ligninu.

Princip metody:

Vlákninou se v tomto případě rozumí zbytek zkoumaného vzorku po povaření v roztoku 1,25 % kyseliny sírové a na to v roztoku 1,25 % hydroxidu draselného (sodného). Od tohoto zbytku se odečte hmotnost popela po spálení.

Vlastní metodika:

V lodičce se naváží 1,000 g vzorku krmiva a kvantitativně se vpraví do frity (Fibertec) nebo do předem zváženého sáčku (Ankom). Frity – 2 ks se umístí do přístroje Fibertec (sáčky – 24 ks se vloží do Ankomu). Přístroje se zapnou, u přístroje Fibertec se pustí voda do chladičů.

K vzorkům se přidá přehřátá 1,25 % kyselina sírová. U přístroje Fibertec se nalije kyselina po střední rýsku (cca 50 ml), u přístroje Ankom se na 24 vzorků přidají 2 litry kyseliny. Kyselina se přivede k varu a od začátku varu se vzorek vaří 30 min. Po skončení varu u přístroje Fibertec topná tělesa vypneme, kyselinu přes frity odsajeme a 3x vzorek propláchneme horkou destilovanou vodou. Po skončení varu u přístroje Ankom vypneme vyhřívání, kyselinu vypustíme a vzorky zalijeme 2 l horké destilované vody. Necháme 5 min máčet a vypustíme. Opakujeme 3x.

Ve druhé fázi k nerozpuštěnému zbytku na dně frity nebo v sáčku přidáme přehřátý 1,25 % hydroxid draselný (Fibertec) nebo sodný (Ankom). U přístroje Fibertec se nalije hydroxid po střední rýsku (cca 50 ml), u přístroje Ankom se na 24 vzorků přidají 2 litry hydroxidu. Hydroxid se přivede k varu a od začátku varu se vzorek vaří 30 min. Po skončení varu u

přístroje Fibertec topná tělesa vypneme, hydroxid přes frity odsajeme a 3x vzorek propláchneme horkou destilovanou vodou. Po skončení varu u přístroje Ankom vypneme vyhřívání, hydroxid vypustíme a vzorky zalijeme 2 l horké destilované vody. Necháme 5 min máčet a vypustíme. Opakujeme 3x.

Zbytek ve fritě nebo sáčku po dvojí hydrolýze v kyselině a v hydroxidu 3x promyjeme acetonem. Frity nebo sáčky vysoušíme 3 hodiny při teplotě 103 °C. Po vysušení a zchladnutí v exikátoru se frity nebo sáčky s nehydrolyzovaným zbytkem zvaží.

Po zvážení se frity vloží do muflové pece, sáčky se prvně vloží do předem zvážených porcelánových kelímků a teprve potom do muflové pece. Spaluje se při teplotě 550 °C do úplného spálení. Zůstatek ve fritě nebo kelímku je popelavě šedý bez přítomnosti barvy černé nebo hnědé. Po spálení a vychladnutí v exikátoru se frity nebo kelímky zvaží a zjistí se obsah popela vázaný na vlákninu. Údaje se vloží do vzorce a spočte s procento hrubé vlákniny.

Výpočet % vlákniny stanovené na Fibertecu

$$\% \text{ vlákniny} = \frac{(a - b) \times 100}{\text{navážka (g)}}$$

a – hmotnost frity s vysušeným nehydrolyzovaným zbytkem (vláknina s popelem)

b – hmotnost frity s popelem

Výpočet % vlákniny stanovené na Ankomu

$$\% \text{ vlákniny} = \frac{(a - b) \times 100}{\text{navážka (g)}}$$

a – hmotnost vysušeného nehydrolyzovaného zbytku (hmotnost sáčku s vysušeným nehydrolyzovaným zbytkem – hmotnost prázdného sáčku)

b – hmotnost popela (hmotnost porcelánového kelímku s popelem – hmotnost prázdného kelímku)

Stanovení tuků extrakcí podle Soxhleta

Tukem se rozumí netěkavé látky vyextrahované za podmínek metod z analyzovaného materiálu relativně nepolárním rozpouštědlem.

Ke stanovení veškerého množství lipidů v příslušném materiálu je nejběžnější metoda Soxhletova. Tato metoda je spolehlivá a vhodná tam, kde v lipidech převažují triacylglyceroly (triglyceridy). Pro stanovení tuku v materiálech, kde je přítomno větší množství polárních fosfolipidů nebo lipoproteinů, je vhodnější použití metod extrakce s chloroformem a metanolem.

U krmiv s vyšším obsahem bílkovin nebo škrobu je část lipidů vázána ve formě nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech nebo je chráněna před extrakcí vrstvičkou polárních složek. V takovýchto případech se doporučuje použít běžných hydrolytických metod, např. kyselinou chlorovodíkovou.

Princip metody:

Vzorek krmiva se za předepsaných podmínek extrahuje petroletherem. Přebytečné rozpouštědlo se odpaří a vysušený tuk se hmotnostně stanoví.

Pracovní postup:

Naváží se 5 g vorku s přesností 0,0001 g přímo do extrakční tuby. Tuba se ucpe tukuprostou vatou. Tuba se vloží do extrakčního přístroje Soxtec. Zvážíme vysušený extrakční kelímek (skleněný, hliníkový) a odměříme do něj 75 ml extrakčního činidla – petrolether. Kelímek s petroletherem vložíme do přístroje. Přístroj zapneme, pustíme vodu do chladiče a zapneme vyhřívání topných těles. Prvních 40 min probíhá extrakce tuků přímo v petroletheru, kdy tubu se vzorkem ponoříme do petroletheru. Odpařený petrolether se kondenzuje v chladiči, protýká tubou, extrahuje tuk a stýká do kelímku. Ve druhé fázi tubu vytáhneme z petroletheru a dalších 40 min ji necháme petroletherem prokapávat. Po 40 min uzavřeme zásobník na petrolether. Zkondenzovaný petrolether již nemůže protýkat do tuby, hromadí se v zásobníku a tím se odděluje od vyextrahovaného tuku. Po oddělení většiny petroletheru se extrakční kelímek s vyextrahovaným tukem a zbytkem petroletheru vyjme z přístroje. Extrakční kelímek vložíme na 3 hod. do sušárny a vysoušíme při teplotě 103 °C. Kelímek pak necháme vychladnout v exikátoru a zvážíme.

Výpočet % tuku stanovené na Soxtecu metodou dle Soxhleta

$$\% \text{ tuku} = \frac{a - b}{\text{navážka (g)}} \times 100$$

a – hmotnost extrakčního kelímku s vysušeným vyextrahovaným tukem

b – hmotnost prázdného extrakčního kelímku

Stanovení popelovin

Jako popeloviny jsou označovány všechny látky krmiva, které zůstanou v popelu po spálení krmiva. V popelu obsažené prvky nazýváme minerálními látkami a jsou představovány anorganickými sloučeninami. I přesto, že většinou jde o prvky původně vázané v organismu nejen ve formě anorganických, ale převážně organických sloučenin, které jsou fyziologicky mnohem účinnější.

Minerální látky obsažené v krmivech se rozdělují do skupin, a to podle obsaženého množství na makro a mikroelementy, jednak podle významu pro živočišný organismus.

Pro účely krmivářských rozborů z hlediska obsahu minerálních komponentů je většinou nutný rozklad organické hmoty. Nejčastějším způsobem je zpopelnění. Stanovením obsahu popelu, respektive stanovením nerozpustného zbytku, tzv. písku, konvenčními metodami se získá pouze hrubá orientace o celkovém množství minerálních látek v daném krmivu.

Poněkud jinak se musí postupovat při stanovení jednotlivých prvků v organické hmotě. Především je nutno volit takový způsob rozložení organické hmoty, aby stanovený prvek pokud možno kvantitativně zůstal obsažen ve zmineralizovaném vzorku.

3.1.5.1. H m o t n o s t n í s t a n o v e n í p o p e l e

Princip metody:

Zvážený vzorek krmiva se zpopelní při teplotě kolem 550 °C v muflové peci. Popel po vychladnutí se zváží.

Pracovní postup:

Porcelánový kelímek nebo miska se vyžihá při teplotě 550 °C a po vychladnutí v exikátoru se zváží s přesností na 0,0001 g. (obr. 15., 16.). Přímo do misky se naváží asi 5 g. Obsah kelímku se opatrně spaluje nad kahanem do zuhelnatění, kdy už se nevyvíjí dým. Potom se kelímek vloží do muflové pece vyhřáté na teplotu 550 °C a vzorek spalujeme za dostatečného přístupu vzduchu až do dokonalého spálení. Získaný popel je popelavě šedý, kyprý, nespečený bez uhlíkatých částic. Doba spalování se liší podle povahy materiálu. Spéká-li se zpopelňovaný materiál, přidá se k popelu barvy šedé po vychladnutí několik kapek dusičnanu amonného, vysuší se, znovu se spaluje v muflové peci. Dokonalosti spálení vzorku krmiva se napomůže ovlhčením popele několika kapkami peroxidu vodíku, nebo etanolu. Po vysušení se popel znovu spaluje v muflové peci.

Spalujeme-li vzorek krmiva v muflové peci přímo, bez předchozího zuhelnění nad kahanem, začínáme se spalováním v muflové peci při teplotě 200 - 250 °C, vzorek pozvolna zuhelnatí a nevzplane. Teprve po zuhelnatění se zvýší teplota spalování na 550 °C.

Po dokonalém spálení a vychladnutí spalovacího kelímku v exikátoru, se zváží kelímek se spáleným zbytkem a vypočítá se obsah popelovin.

Výpočet % obsahu popelovin:

$$\% \text{ popelovin} = \frac{(a - b)}{\text{navážka (g)}} \times 100$$

a – hmotnost kelímku se spáleným popelem
b – hmotnost prázdného vyžihaného kelímku

Stanovení minerálních látek

Při stanovování podílů jednotlivých prvků ve vzorcích krmí je nutno postupovat velmi opatrně, aby při rozkladu organické hmoty zůstal stanovovaný prvek kvantitativně obsažen v mineralizátu. Při stanovování netěkavých prvků se dává přednost zpopelnění organické hmoty. Minerální látky se pak převedou do roztoku kyselinou chlorovodíkovou.

Ke stanovení prvků těkajících se používá rozkladu organické hmoty mokrou cestou minerálními kyselinami.

Pro stanovení jednotlivých iontů v mineralizátu lze využít prakticky všech chemických a především fyzikálně chemických metod, pokud jsou vhodné vzhledem ke koncentraci stanovovaných iontů, případně i obsahu rušících sloučenin. Pro stanovení makroprvků se uplatňují metody titrační (stanovení vápníku, hořčíku, chloridů), metody plamenové fotometrie (stanovení sodíku, draslíku, vápníku), atomové absorpce (stanovení vápníku, hořčíku), případně jiné speciální metody.

Různorodost materiálů krmiv obsahující stopové prvky vyžaduje i různorodost metod stanovení určitého stopového prvku. I když ve většině případů lze pro konečné stanovení určitého stopového prvku použít i ve velmi rozdílných materiálech stejné nebo obdobné techniky. Hlavní rozdíl ve stanovení spočívá v předběžné úpravě vzorku, do níž se vedle mineralizace zahrnuje i separace od rušících ostatních makro i mikroprvků, případně jejich zamaskování. Mnohdy je nutné i zkoncentrování stanovovaného prvku. Proto se pro stanovování jednotlivých stopových prvků užívá speciální metodiky ústící ke změření koncentrace některými běžnými metodami. Avšak dokonalé zvládnutí a správná aplikace různých metod, případně jejich kombinací ke stanovení stopových prvků v biologickém materiálu, vyžaduje delší praxi a značné zkušenosti.

Rozklad organické hmoty

a) Zpopelnění - podle předpokládaného množství stanovovaného prvku se do spalovací misky naváží odpovídající vhodné množství zhomogenizovaného vzorku krmiva. K vzorkům, které se při zpopelnění spékají se přidá činidlo, usnadňující zpopelnění, např. octan hořečnatý, dusčinan hořečnatý apod. Po promíchání se obsah odpaří do sucha. Obsah misky se zuhelní nad plamenem a teprve potom se v muflové peci žihá, při teplotě vhodné pro stanovení jednotlivých prvků (obvykle 450 - 550 °C), až do úplného zpopelnění většiny vzorku.

Po ochladnutí misky s popelem se popel ovlhčí destilovanou vodou, přidá se vhodné množství 10% roztoku kyseliny chlorovodíkové (5 - 10 ml) a nechá se na vroucí vodní lázni nebo na pískové lázni vyluhovat 10 až 20 minut za občasného

promíchání. Kelímek doplníme horkou destilovanou vodou. Obsah kelímku přefiltrujeme přes filtrační papír do 500 ml odměrné baňky. Kelímek minimálně 5x vypláchneme horkou

destilovanou vodou a přefiltrujeme. Popel na filtračním papíru opakovaně promýváme horkou vodou. Přefiltrovat se musí 2/3 objemu odměrné baňky. Obsah vody v odměrné baňce pak upravíme již bez filtračního papíru po rysku.