	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10070.1 – Stanovení obsahu acidodetergentní vlákniny (ADF), acidodetergentního ligninu (ADL) a výpočet obsahu hrubé celulózy	Vydání	1
		Revize	3

STANOVENÍ OBSAHU ACIDODETERGENTNÍ VLÁKNINY (ADF), ACIDODETERGENTNÍHO LIGNINU (ADL) A VÝPOČET OBSAHU HRUBÉ CELULÓZY

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu acidodetergentní vlákniny a acidodetergentního ligninu ve všech typech krmiv.

Jsou uvedeny dva způsoby stanovení – pro manuální provedení a pro instrumentální provedení pomocí automatického hydrolyzačního zařízení.

2 Princip


Acidodetergentní vláknina (ADF) je lignocelulózový zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv, který se stanoví vázkově po kyselé hydrolyze vzorku krmiva v prostředí kyselého roztoku cetyltrimetylamonium bromidu.

Acidodetergentní lignin (ADL) je zbytek hmoty, která zůstane po rozpuštění celulózy a jiných organických látek obsažených v ADF působením 72% H_2SO_4 .

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná 96%.
- 2 Kyselina sírová, H_2SO_4 , 72 %, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 12 \text{ mol/l}$, $\rho = 1,634 \text{ g/cm}^3$.
Příprava: K (300 – 400) ml vody (8) se opatrně přilije za míchání a občasného chlazení 669 ml (1226 g) kyseliny sírové (1). Po ochlazení na 20 °C se doplní vodou na objem 1000 ml.
- 3 Cetyltrimetylamonium bromid (CTAB), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$.
- 4 Aceton, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.
- 5 Acidodetergentní činidlo.
Příprava: K (200 – 300) ml vody (8) se opatrně přilije 27,8 ml kyseliny sírové (1). Doplní se vodou na objem 1000 ml a v tomto roztoku se za mírného zahřívání rozpustí 20,0 g CTAB. Výsledná koncentrace kyseliny sírové v roztoku odpovídá $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol/l}$. Roztok se skladuje za běžných laboratorních podmínek a je stálý.
- 6 1-oktanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$.
- 7 Diethylether, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$.
- 8 Voda (deionizovaná, destilovaná nebo demineralizovaná).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10070.1 – Stanovení obsahu acidodetergentní vlákniny (ADF), acidodetergentního ligninu (ADL) a výpočet obsahu hrubé celulózy	Vydání	1
		Revize	3

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní sušárna s regulovatelnou teplotou pro rozsahy teplot do 150 °C.
- 2 Muflová pec s automatickou regulací teploty pro rozsahy teplot do 650 °C.
- 3 Filtrační kelímek o porositě P2.
- 4 Hydrolyzační přístroj opatřený zařízením pro filtraci skleněnými kelímky za sníženého tlaku a vyhřívacím zařízením (horká jednotka).
- 5 Extrakční přístroj s filtračním zařízením (studená jednotka).


5 Postup stanovení ADF

5.1 Manuální metoda

Do varné baňky se zábrusem o objemu 500 ml se naváží 1 g vzorku krmiva (m_0) s přesností 0,001 g, přidá se 100 ml acidodetergentního činidla (5), obsah se promíchá, během 5 min se přivede pod zpětným chladičem k mírnému varu a vaří se přesně 60 min. Po uvedené době se ještě horký obsah filtruje přes filtrační kelímek. Zbytek na filtru se dokonale promyje horkou vodou (8) vždy až do úplného odsátí kapaliny a pak 2 × asi 10 ml acetonu (4). Po odpaření acetonu se kelímek vysuší minimálně 6 h v sušárně při 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru a zvážení (m_1) se kelímek spaluje 5 h v muflové peci při 525 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek opět zváží (m_2).

5.2 Instrumentální metoda (pro zařízení typu Fibertec)

Do předem vysušeného filtračního kelímku (3) se naváží 1 g vzorku krmiva (m_0) s přesností 0,001 g a kelímek se umístí do horké jednotky hydrolyzačního přístroje. Přidá se 100 ml acidodetergentního činidla (5), obsah se přivede pod zpětným chladičem k varu a vaří se přesně 60 min. Potom se var přeruší, obsah kapaliny se za použití sníženého tlaku odpustí přes filtrační kelímek a pevný podíl se promyje 3 × asi 30 ml horké vody (8), vždy až do úplného odsátí kapaliny. Potom se filtrační kelímek vyjme a umístí do studené jednotky hydrolyzačního přístroje, kde se za použití sníženého tlaku promyje 2 × asi 5 ml acetonu (4). Po odpaření acetonu se kelímek vysuší minimálně 6 h v sušárně při 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru a zvážení (m_1) se kelímek vloží do muflové pece a spaluje se 5 h při 525 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek opět zváží (m_2).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10070.1 – Stanovení obsahu acidodetergentní vlákniny (ADF), acidodetergentního ligninu (ADL) a výpočet obsahu hrubé celulózy	Vydání	1
		Revize	3

6 Postup stanovení ADL

6.1 Manuální metoda


Filtrační kelímek obsahující vlákninu získanou postupem uvedeným v kapitole 5.1 se vloží do vhodné skleněné nádoby s rovným dnem a přelije se malým objemem kyseliny sírové (2), která je ochlazená na 15 °C. Skleněnou tyčinkou se rozruší zbytek (žmolky) na fritě. Pak se kelímek naplní do poloviny kyselinou sírovou (2), promíchá a nechá se 3 h stát. Během této doby se každou hodinu opět promíchá a případně se doplní kyselinou sírovou na původní objem. Po 3 h se kyselina odfiltruje (nejlépe pomocí vakua) a promyje horkou vodou (8) až do negativní reakce, která se zkontroluje pH papírkem. Přitom se spláchnou stěny kelímku včetně skleněné míchací tyčinky. Poté se kelímek suší v sušárně minimálně 3 h při 105 °C a po ochlazení v exsikátoru se vyváží (m_3). Dále se spaluje po dobu 3 h v muflové peci při 525 °C a po ochlazení v exsikátoru se opět vyváží (m_4).

6.2 Instrumentální metoda (pro zařízení typu Fibertec)

Do filtračních kelímků s obsahem vlákniny získaným postupem 5.2 umístěných ve studené jednotce extrakčního přístroje se přidá 25 ml H_2SO_4 (2) ochlazené na 15 °C, promíchá se skleněnou tyčinkou. Nechá se po dobu 3 h stát, každou hodinu se obsah kelímků promíchá. K rozrušení žmolků je možno použít tlakový vzduch zařízení. Po 3 h se kyselina odfiltruje, kelímky se důkladně promyjí horkou vodou a suší v sušárně 2 h při 130 °C nebo 5 h při 105 °C. Po ochlazení v exsikátoru se zváží (m_3). Dále se spalují po dobu 3 h v muflové peci při 525 °C a po ochlazení v exsikátoru se opět vyváží (m_4).

Poznámky

- 1 *V případě, že roztok detergentního činidla za varu pěni, může se přidat několik kapek oktanolu (6).*
- 2 *Obsahuje-li vzorek více než 1 % tuku, odtuční se přímo v hydrolyzační nádobce několikanásobným přidavkem rozpouštědla.*
- 3 *U materiálů s obsahem dusíkatých látek nad 30 % se volí poloviční navážka, aby rozpouštěcí kapacita detergentu na bílkoviny byla dostatečná.*
- 4 *Diethylether (7) a aceton (4) jsou nebezpečné hořlaviny. Při manipulaci s nimi je třeba dodržovat příslušná bezpečnostní pravidla. Diethylether je vhodné použít pro krmiva s vysokým obsahem tuku.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10070.1 – Stanovení obsahu acidodetergentní vlákniny (ADF), acidodetergentního ligninu (ADL) a výpočet obsahu hrubé celulózy	Vydání	1
		Revize	3

7 Výpočet a vyjádření výsledků

7.1 Obsah ADF v % (X) se vypočítá podle vztahu

$$X = 100 \times (m_1 - m_2)/m_0$$

kde

m_1 hmotnost filtračního kelímku s vysušeným hydrolyzačním zbytkem (g),

m_2 hmotnost filtračního kelímku s popelem (g),

m_0 hmotnost navážky vzorku (g)

7.2 Obsah ADL v % (Y) se vypočítá podle vztahu

$$Y = 100 \times (m_3 - m_4)/m_0$$

kde

m_3 je hmotnost filtračního kelímku s vysušeným hydrolyzačním zbytkem (g),

m_4 hmotnost filtračního kelímku s popelem (g),

m_0 hmotnost navážky vzorku (g).

7.3 Obsah hrubé celulózy (Z) ve vzorku (%) se vypočítá podle vztahu

$$Z = ADF - ADL$$

kde

ADF obsah acidodetergentní vlákniny (%),

ADL obsah acidodetergentního ligninu (%).

Výsledky se vyjadřují s přesností nejméně na 0,1 %.

9 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 13906 – Krmiva – Stanovení obsahu acidodetergentní vlákniny (ADF) a acidodetergentního ligninu (ADL).