	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10080.1 – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a neutrálně detergentního vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF)	Vydání	1
		Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU NEUTRÁLNĚ DETERGENTNÍ VLÁKNINY (NDF) A NEUTRÁLNĚ DETERGENTNÍ VLÁKNINY PO ÚPRAVĚ VZORKU AMYLÁZOU (aNDF)

1 Rozsah a účel

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny a neutrálně detergentní vlákniny po úpravě vzorku amylázou v krmivech.

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

2 Princip

Postup pro stanovení neutrálně detergentní vlákniny (NDF) je vhodný především pro objemná krmiva, u kterých se nevyskytuje škrobnatá složka. Neutrálně detergentní vláknina se v tomto případě stanoví jako zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv (celulóza, hemicelulóza a lignin) vážkově po hydrolyze vzorku v prostředí neutrálního roztoku laurylsulfátu sodného.

Pro ostatní krmiva se používá modifikovaný postup s úpravou vzorku alfa-amylázou. Působením neutrálně detergentního činidla společně s alfa-amylázou dojde u krmiv k odstranění snadno rozpustných proteinů, tuků, cukrů, škrobů a pektinů a jako obsah aNDF se stanoví zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv (celulóza, hemicelulóza a lignin) a nerozpustné dusíkaté látky z živočišných komponent.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak

- 1 Chelaton III (sodná sůl kyseliny etylediaminotetraoctové), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$.
- 2 Tetraboritan sodný, dekahydrát, $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$.
- 3 Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.
- 4 Laurylsulfát sodný, $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$.
- 5 Etylenglykol, $HOCH_2CH_2OH$.
- 6 Hydroxid sodný, (NaOH), koncentrovaný roztok.

Příprava: Ve 100 ml vody (12) se za stálého míchání postupně rozpustí (30 – 40) g NaOH.

- 7 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná 35%, $\rho(HCl) = 1,18 \text{ g/ml}$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10080.1 – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a neutrálně detergentního vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF)	Vydání	1
		Revize	2

8 Neutrálně-detergentní činidlo.

Příprava:

Roztok A: Ve 150 ml vody se rozpustí 14,6 g Chelatonu III (1) a 6,8 g tetraboritanu sodného (2).

Roztok B: Ve 100 ml vody se po ohřátí rozpustí 11,5 g hydrogenfosforečnanu sodného (3).

Roztoky A a B se smíchají a doplní vodou na objem přibližně 700 ml. Za stálého míchání a mírného zahřívání se v roztoku rozpustí 30 g laurylsulfátu sodného (4), přidá 10 ml etylenglykolu (5) pro snížení pění a objem se upraví na přibližně 950 ml. Takto upravený roztok se nechá stát do druhého dne, pak se upraví pH roztokem NaOH (6) nebo HCl (7) na hodnotu 6,9 až 7,1 a doplní na objem 1000 ml. Činidlo je stálé, sraženina vzniklá při delším stání se odstraní rozmícháním či mírným zahřáním.

9 Aceton, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

10 1-oktanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$.

11 Diethylether, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$.

12 Voda (deionizovaná, destilovaná nebo demineralizovaná).

13 Siřičitan sodný bezvodý, Na_2SO_3 .

14 Alfa-amyláza, standardizovaná, teplotně stabilní. Ve formě roztoku nebo extraktu asi 1 g lyofilizovaného enzymového prášku ve 100 ml vody.

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).

6 Varné baňky, objem 500 ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10080.1 – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a neutrálně detergentního vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF)	Vydání	1
		Revize	2

5 Postup

5.1 Manuální metoda pro stanovení NDF

Do varné baňky se zábrusem o objemu 500 ml se naváží 1 g vzorku krmiva (m_0) s přesností 0,001 g, přidá se 0,5 g siřičitanu sodného (13) a 100 ml neutrálně detergentního činidla (8). Obsah se promíchá, během 5 min se přivede pod zpětným chladičem k mírnému varu a vaří se 1 h. Po uvedené době se ještě horký obsah filtruje přes filtrační kelímek. Zbytek na filtru se dokonale promyje horkou vodou (12) vždy až do úplného odsátí kapaliny a potom 2 × asi 10 ml acetonu (9). Po odpaření acetonu se kelímek suší minimálně 6 h v sušárně při $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Po vychladnutí v exsikátoru a zvážení (m_1) se kelímek vloží do muflové pece a spaluje se při $500\text{ °C} \pm 20\text{ °C}$ po dobu 5 h. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek opět zváží (m_2).

5.2 Instrumentální metoda pro stanovení NDF

Do filtračního kelímku se naváží 1 g vzorku krmiva (m_0) s přesností 0,001 g. Kelímek se umístí do horké jednotky hydrolyzačního přístroje, přidá se 0,5 g siřičitanu sodného (13) a 100 ml neutrálně detergentního činidla (8), obsah se přivede pod zpětným chladičem k varu a vaří se 1 h. Potom se var přeruší, obsah kapaliny se za použití sníženého tlaku odpustí přes filtrační kelímek a pevný podíl se dokonale promyje 5 × horkou vodou (12) vždy až do úplného odsátí kapaliny. Potom se filtrační kelímek vyjme a umístí do studené jednotky extrakčního přístroje, kde se za použití sníženého tlaku promyje 2 × asi 10 ml acetonu (9). Po odpaření acetonu se kelímek vysuší minimálně 6 h v sušárně při $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Po vychladnutí v exsikátoru a zvážení (m_1) se kelímek vloží do muflové pece a spaluje se při $500\text{ °C} \pm 20\text{ °C}$ po dobu 5 h. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek opět zváží (m_2).


5.3 Manuální metoda pro stanovení aNDF

5.3.1 Navážka a odtučnění

Vzorky s obsahem tuku nad 5 % se předběžně odtuční. Do filtračního kelímku se naváží 1 g vzorku krmiva (m_0) s přesností 0,001 g, přidá se 10 ml až 20 ml acetonu (9), nechá se volně protékat po dobu nejméně 5 min, během této doby se obsah kelímku 3 × promíchá. Tento postup se opakuje 4 ×, pak se aceton pomocí vakua odsaje, kelímek se vzorkem se nechá stát volně na vzduchu, aby se odpařily stopy acetonu. Pak se jeho obsah přemístí do varné baňky. Stejný kelímek se pak použije při filtraci po hydrolyze neutrálně detergentním činidlem (8).

5.3.2 Hydrolyza neutrálně detergentním činidlem

Do varné baňky se zábrusem s navážkou vzorku se přidá $0,5\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ siřičitanu sodného (13) a postupně se přidá za stálého míchání 50 ml $\pm 5\text{ ml}$ neutrálně detergentního činidla (8). Míchání je nutné hlavně u škrobnatých krmiv, která mohou ulpět na dně baňky. Promíchaný obsah baňky se uvede během 5 min k mírnému varu, přidá se 2 ml standardizovaného amylázového roztoku (14), částičky vzorku ulpělé na stěnách nebo na dně se převedou zpět

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10080.1 – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a neutrálně detergentního vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF)	Vydání	1
		Revize	2

do suspenze a vaří se 1 h pod zpětným chladičem. Rychlost varu by měla být taková, aby se částičky suspenze ještě dostatečně dynamicky pohybovaly, ale aby je nadměrné pění nevytlačilo na stěny baňky. Pokud se tak stane, je nutno opláchnout stěny minimálním množstvím neutrálně detergentního činidla.

5.3.3 Filtrace

Po uvedené době se ohřívání přeruší a obsah v baňce se nechá krátce usadit. Pokud jsou na povrchu suspenze zřetelné kuličky tuku nebo je roztok mléčně zbarvený, indikuje to vysoce tučný materiál, u kterého by se měl použít postup s odtučněním (5.3.1). Ještě horký obsah baňky se filtruje přes filtrační kelímek, který se předtím přehřejší promytím horkou vodou. Při filtraci se nejprve dekatuje horní část 30 ml až 40 ml obsahu baňky, po odsátí přebytku vody se vakuum přeruší, aby se filtrační kelímek neucpal, což by znemožnilo jeho řádné promytí. Uplělé částice na stěnách kelímku se opláchnou vodou, kelímek se naplní do poloviny horkou vodou, přidají se 2 ml roztoku amylázy (14) a obsah filtračního kelímku se promíchá.

Do baňky se zbývající části suspenze se přidají rovněž 2 ml amylázového roztoku (14), který se nechá působit (45 – 60) s za současného míchání, případně stírání částic ze dna a stěn baňky. Amylázový roztok se odstraní a zbytek z baňky se přenesse pomocí 20 ml až 30 ml horké vody na filtrační kelímek, baňka se 2 × opláchnou. Po přenesení se kelímek 3 × naplní horkou vodou, která se nechá působit vždy 3 min a pak se odsaje. V případě obtížné filtrace nebo ucpaní kelímku se použije zpětný tlak filtračního zařízení.

Po odsátí vody se kelímek naplní acetonem (9), obsah se rozmíchá, nechá se stát 3 min až 5 min a postup se opakuje 3 ×. Míchací tyčinka se opláchnou a zbytek ve filtračním kelímku se vysuší pomocí vakua. Pak se kelímek nechá stát 10 min až 60 min, aby se zbytek acetonu odpařil.


5.3.4 Sušení a spálení

Po odpaření acetonu se kelímek suší minimálně 6 h v sušárně při $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Po vychladnutí v exsikátoru a zvažení (m_1) se kelímek vloží do muflové pece a spaluje se 5 h při $500\text{ °C} \pm 20\text{ °C}$. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek opět zváží (m_2).

5.4 Instrumentální metoda pro stanovení aNDF (pro zařízení typu Fibertec).

5.4.1 Navážka a odtučnění

Vzorky s neznámým obsahem tuku nebo s obsahem tuku nad 10 % se předběžně odtuční. Do filtračního kelímku se naváží 0,5 g vzorku krmiva (m_0) s přesností 0,050 g, kelímek se umístí do studené extrakční jednotky a přidá se 10 ml až 20 ml acetonu (9), který se nechá se volně protékat po dobu nejméně 5 min. Během té doby se obsah kelímku 3 × promíchá. Tento postup se opakuje 4 ×, pak se aceton pomocí vakua odsaje, kelímek se vzorkem se nechá stát volně na vzduchu nejméně 10 min, aby se odstranily stopy acetonu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10080.1 – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a neutrálně detergentního vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF)	Vydání	1
		Revize	2

5.4.2 Hydrolýza neutrálně detergentním činidlem

Do filtračních kelímků s navázkou vzorku se přidá $0,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ siřičitanu sodného (13) a kelímky se umístí do horké jednotky hydrolyzačního přístroje. Do každého z nich se přidá $50 \text{ ml} \pm 5 \text{ ml}$ neutrálně detergentního činidla (8) a kelímky se promíchají pomocí zpětného tlaku, což je důležité hlavně u škrobnatých krmiv. Přidá se 2 ml standardizovaného amylázového roztoku (14), k promíchání se opět použije zpětný tlak a během 10 min se přivede k mírnému varu. Vaří se 1 h, v případě pění se stěny trubice opláchnou minimálním množstvím neutrálně detergentního činidla (8) s využitím stříčky se speciálními tryskami.

Pokud po ukončení hydrolýzy jsou na povrchu suspenze zřetelné kuličky tuku nebo je roztok mléčně zbarvený, indikuje to vysoce tučný materiál, u kterého měl být použit postup s odtučněním (5.4.1).


5.4.3 Filtrace

Po ukončení hydrolýzy se činidlo odfiltruje za použití mírného vakua, přidá se 30 ml horké vody a 2 ml standardizovaného amylázového roztoku (14), směs se promíchá pomocí zpětného tlaku přístroje a po 60 s se činidlo odsaje. Přidá se opět 30 ml horké vody, která se po 3 min až 5 min opět odsaje. Pokud je filtrace obtížná, přidají se další 2 ml amylázového roztoku (14). Když je zbytek na filtru průsvitný a filtrace je stále obtížná, upustí se od třetího promývání, v případě ucpání se použije mírný zpětný tlak.

Kelímky se přemístí do studené jednotky, přidá se 10 ml acetonu (9), obsah se promíchá pomocí zpětného tlaku a po 3 min až 5 min se aceton odsaje. To se opakuje 3 ×. Po závěrečném odsátí acetonu se kelímek nechá stát volně na vzduchu nejméně 10 min, aby se odstranily stopy acetonu.

5.4.4 Sušení a spálení

Kelímek se suší minimálně 6 h v sušárně při $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vychladnutí v exsikátoru a zvážení (m_1) se kelímek vloží do muflové pece a spaluje se 5 h při $500 \text{ }^\circ\text{C} \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek opět zváží (m_2).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10080.1 – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a neutrálně detergentního vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF)	Vydání	1
		Revize	2

Poznámky

- 1 *V případě, že roztok detergentního činidla za varu pění, může se přidat několik kapek oktanolu (10).*
- 2 *U materiálů s obsahem dusíkatých látek nad 30 % se volí poloviční navážka, aby rozpouštěcí kapacita detergentu na bílkoviny byla dostatečná.*
- 3 *Obsahuje-li vzorek při stanovení obsahu NDF více než 1 % tuku, odtuční se přímo v hydrolyzační nádobce několikanásobným přidávkem rozpouštědla (9).*
- 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.*
- 5 *Použitím nadměrného podtlaku při odsávání činidla při filtraci u stanovení obsahu aNDF může dojít k vysokému stupni vysušení zbytku na dně kelímku. To by mohlo způsobit jeho ucpání a tím znemožnit řádné promývání.*
- 6 *Zbytek vody před promytím acetonem se neodsává příliš důkladně, protože nadměrně vysušený filtrační koláč by ztěžoval dostatečnou extrakci v acetonu.*

6 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah neutrálně detergentní vlákniny (NDF) nebo neutrálně detergentní vlákniny po úpravě vzorku alfa-amylázou (aNDF) 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).

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

7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 16472 – Krmiva – Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF). Rok vydání 2012.