

Oznaczanie karotenu w paszach

Znaczenie witaminy A w żywieniu zwierząt gospodarskich, a w szczególności rozplodników, samic ciężarnych, krów wysokomlecznych i młodzieży, jest już obecnie należycie doceniane przez zootechników. Poznane i opisane są schorzenia, jakie występują u zwierząt przy niedoborze lub braku witaminy A w paszach, zalecane są także sposoby postępowania celem zapobieżenia hipo- lub awitaminozie A oraz zalecane są sposoby jej leczenia.

Źródłem witaminy A dla zwierząt gospodarskich są i powinny być przede wszystkim pasze produkowane we własnym gospodarstwie. Pasy pochodzenia roślinnego, jak wiadomo, nie zawierają witaminy A, lecz prowitaminę — karoten, który w organizmie zwierzęcym jest przetwarzany na witaminę A. Przez rozszczepienie się cząsteczki karotenu i po przyłączeniu dwóch cząsteczek wody powstają dwie cząsteczki witaminy A.

W celu prawidłowego zaopatrywania zwierząt gospodarskich w ciągu całego roku w witaminę A, konieczne jest poznanie pasz pod względem zawartości witaminy A — karotenu. W licznych paszach zawartość witaminy A i karotenu została określona przy pomocy metod biologicznych i chemicznych i na tej podstawie zestawiono odpowiednie tablice. W dawniejszych tablicach ilość witaminy A lub karotenu w zbadanych paszach zaznaczono krzyżykami (+), w nowszych — zawartość witaminy podana jest w miligramach.

Zawartość karotenu w roślinach waha się znacznie w zależności od gatunku rośliny, okresu wegetacji, warunków wzrostu, stopnia ulistnienia rośliny (liście zawierają znacznie więcej karotenu niż reszta rośliny), intensywności insolacji, opadów itp. Bardzo duże wahania w zawartości karotenu zachodzą w sianie. Ilość karotenu w sianie zależy od sposobów sprzętu, terminu koszenia, długości suszenia, sposobu suszenia, a także od długości i warunków przechowywania siana. Straty karotenu, jakie zachodzą przy nieodpowiednim sprzęcie i przechowywaniu siana, mogą dochodzić do 70—95% w stosunku do materiału wyjściowego, tj. zielonki. Karoten dobrze zachowuje się przy sztucznym suszeniu zielonki.

Zawartość karotenu w kiszonkach zależy od jakości materiału wyjściowego, od długości okresu, jaki upływa od chwili skoszenia zielonki do złożenia jej do zbiornika, od wilgotności masy zakiszanej, od dokładności udeptania zielonki w zbiorniku itp. Karoten dzięki brakowi dostępu powietrza do zbiornika z kiszonką dobrze zachowuje się nawet w ciągu kilku lat.

Karoten znajduje się również w zabarwionych kłębach i korzeniach roślin okopowych (marchwi żółtej i czerwonej, brukwi itp.). W czasie przechowywania okopowych, w zależności od warunków, karoten w różnym stopniu ulega zniszczeniu.

Biorąc pod uwagę różnorodne warunki, w których karoten ulega zniszczeniu oraz przyczyny, od jakich zależy zawartość karotenu w paszach pochodzenia roślinnego, posługiwanie się danymi zawartymi w ułożonych tablicach składu pasz (zwłaszcza pochodzenia obcego) przy normowaniu karotenu dla zwierząt traci zupełnie znaczenie praktyczne. Z tego względu możliwość częstego oznaczania zawartości karotenu w paszach ma w gospodarstwach pierwszorzędne znaczenie praktyczne.

Metoda oznaczania karotenu w paszach powinna być nieskomplikowana, a zarazem dostatecznie dokładna, tak by można było przy jej użyciu łatwo i szybko przeprowadzać analizy w zwykłej pracowni zootechnicznej gospodarstwa.

Mimo że metody biologiczne oznaczania zawartości karotenu w paszach są dokładne, są one jednak czaso- i pracochłonne, wymagają dobrze przygotowanych zwierząt oraz odpowiednio dobranej diety. Z tego powodu metody biologiczne są niedostępne dla szerokiego stosowania w praktyce.

Numery próbek	Roztwór zasadniczy ml	Woda ml	W 1 ml mg karotenu
1	10,0	0,0	0,004160
2	9,5	0,5	0,003952
3	9,0	1,0	0,003744
4	8,5	1,5	0,003536
5	8,0	2,0	0,003328
6	7,5	2,5	0,003120
7	7,0	3,0	0,002912
8	6,5	3,5	0,002704
9	6,0	5,0	0,002496
10	5,5	4,5	0,002288
11	4,0	5,0	0,002080
12	4,5	5,5	0,001872
13	4,0	6,0	0,001664
14	3,5	6,5	0,001456
15	3,0	7,0	0,001248
16	2,5	7,5	0,001040
17	2,0	8,0	0,000832
18	1,5	8,5	0,000624
19	1,0	9,0	0,000416
20	5,5	9,5	0,000208
21	0,4	9,6	0,0001664
22	0,3	9,7	0,0001248
23	0,2	9,8	0,0000832
24	0,1	9,9	0,0000416

Są też liczne metody chemiczne dla oznaczenia zawartości karotenu i witaminy A. Ze względu jednak na brak i kosztowność potrzebnej do tego aparatury oraz na trudność wykonywania analiz metody te również są niedostępne dla szerokiej praktyki.

Długoletnie badania niedawno zmarłego uczonego radzieckiego kandydata nauk biologicznych P. Ch. Popandopuła w celu znalezienia prostej, nieskomplikowanej i stosunkowo dokładnej metody oznaczania karotenu w paszach zostały zakończone pomyślnie. Po licznych sprawdzeniach metoda opracowana przez P. Popandopuła została zalecona w formie instrukcji i jest stosowana w licznych kołchozach i sowchozach Związku Radzieckiego przy oznaczaniu zawartości karotenu w sianie (po sprzęcie i w czasie przechowywania), kiszonce i innych paszach roślinnych.

W celu zapoznania się naszych zootechników z tą łatwą w praktycznym stosowaniu metodą podajemy tutaj sposób jej przeprowadzenia.

Metoda Popandopuła polega na wyekstrahowaniu z badanych pasz pochodzenia roślinnego barwników (chlorofilu,

ksantofilu, karotenu i innych) przy pomocy rozpuszczalników organicznych. Otrzymany ekstrakt poddaje się następnie adsorpcji chromatograficznej z adsorbentami (MgO, Al₂O₃, CaO i innymi). Chlorofil i ksantofil przy tym zostaje zatrzymany przez adsorbent, a karoten przechodzi do przesączu. Następnie żółty przesącz karotenowy kolorymetruje się porównując go z przygotowanym wzorcowym roztworem azobenzenu lub dwuchromianu potasu.

Sposób przeprowadzenia analizy

Próbkę (5—10 g) ze średniej próby badanej paszy suchej (siano, żółta kukurydza itp.) wsypuje się do moździerza porcelanowego i dokładnie rozciera z czystym i wyprażonym piaskiem (około 10 g), a próbkę paszy wilgotnej (np. kiszonki, marchwi itp.) rozciera się dodatkowo z siarczanem sodu (5—10 g). Następnie masę tę roz-

ciera się z około 5 g tlenku glinu¹ (lub $MgO, MgCO_3, CaO$) i całość przenosi do szerokiej szklanej probówki (średnica około 2—2,5 cm, długość 15—20 cm) z wydłużonym i obciętym końcem (patrz rysunek), na dnie której ułożono uprzednio ścielnie watę, a na nią wsypano tlenek glinu (lub jeden ze wskazanych adsorbentów) warstwą grubości około 1,5 do 2 cm. Po przeniesieniu do probówki roztartej paszy zalewa się ją benzyną (lotniczą, o temperaturze wrzenia nie wyższej od 120°C) w takiej ilości, aby stała przykrywała badaną paszę. Po kilku minutach zaczyna przesączać się do kolbki pod probówką żółto zabarwiony ekstrakt karotenowy. Przemywanie paszy benzyną kontynuuje się do całkowitego odbarwienia się kropli ściekających z probówki.

W celu sprawdzenia całkowitego wyekstrahowania karotenu z badanej paszy przelewa się pierwszy przesącz z kolbki do cylindra miarowego, a próbkę paszy zalewa się nową porcją benzyny i sączy. Jeżeli przesącz jest bezbarwny, to należy uważać, że ekstrahowanie karotenu jest ukończone. W przeciwnym razie następny barwny przesącz wlewa się do cylindra miarowego do uprzedniego przesączu. Po ukończeniu ekstrahowania ustala się objętość przesączu i kolorymetruje, porównując ekstrakt ze standardowym roztworem azobenzenu (145 mg azobenzenu rozpuszczonego w 1 litrze 96° alkoholu etylowego; 1 ml tego roztworu odpowiada 0,00235 mg karotenu) lub dwuchromianu potasu (0,072% roztwór wodny $K_2Cr_2O_7$; 1 ml tego roztworu odpowiada 0,00416 mg karotenu).

Przy posługiwaniu się zwykłym kolorymetrem (Dubosq), do porównania zabarwienia bierze się roztwór wzorcowy o wysokości słupka 10 mm, a badany — 8-12 mm. Przy słabym zabarwieniu przesączu zagęszcza się go przez częściowe odparowanie benzyny lub ekstrahowaniu poddaje się nieco większą próbkę paszy.

Obliczanie zawartości karotenu w badanej próbce paszy przeprowadza się w następujący sposób:

$$C = \frac{2,35 \cdot y \cdot h_1}{h \cdot b}$$

gdzie: C = zawartość mg karotenu w 1 kg badanej paszy;

2,35 = współczynnik przy użyciu roztworu azobenzenu;

h_1 = wysokość słupka roztworu wzorcowego w mm;

h = wysokość słupka badanego ekstraktu karotenowego w mm;

y = objętość całego otrzymanego przesączu (ml);

b = ciężar próbki badanej paszy (g).

Przy użyciu roztworu $K_2Cr_2O_7$ zamiast współczynnika 2,35 należy stosować współczynnik 4,16.

Przy kolorymetrowaniu można również posługiwać się podaną niżej barwną skalą kolorymetryczną.

W tym wypadku obliczania dokonuje się według wzoru:

$$C = \frac{K \cdot y \cdot 1000}{b}$$

¹ Zawartość wody w Al_2O_3 nie powinna przekraczać 10—12%.



Aparat do oznaczania karotenu w paszach

gdzie: C = mg karotenu w 1 kg badanej paszy;
 K = mg karotenu określonego według skali kolorymetrycznej;
 y = objętość całego przesączu karotenowego (ml);
 b = ciężar próbki paszy (g).

Skala kolorymetryczna dla określania karotenu w paszach

Roztwór podstawowy: 720 mg $K_2Cr_2O_7$ w 1 litrze wody; 1 ml roztworu podstawowego odpowiada 0,00416 mg karotenu.

Regeneracja używanych odczynników

Regeneracji używanego siarczanu sodu dokonuje się przez wymycie go wodą z mieszaniny z Al_2O_3 , a następnie przez skryształizowanie i wysuszenie w temperaturze 100—105°C.

Regenerację zbadanych roztworów karotenu przeprowadza się w sposób następujący.

Do kolby szklanej nalewa się 10 ml nasyconego roztworu dwuchromianu potasu, następnie dodaje 100—150 ml benzynowego przesączu karotenu i ostrożnie 10 ml stężonego kwasu siarkowego (technicznego). Kolbę korkuje się i dokładnie wstrząsa w ciągu 3—5 minut do całkowitego odbarwienia górnej, żółtej warstwy benzynowej. Po odstaniu, warstwę benzyny zlewa się do innego naczynia i przeemywa kilkakrotnie wodą (do zniknięcia kwaśnej reakcji).

Pozostała w kolbie zielonkawa masa może być użyta do dalszego odbarwienia ekstraktu benzynowego. W tym celu wlewa się nowe porcje zabarwionej karotenem benzyny, wstrząsa i postępuje jak uprzednio.

Regeneracji tlenku glinu dokonuje się przez prażenie go w parownicy porcelanowej umieszczonej na płycie elektrycznej lub też w piecu muflowym aż do całkowitego spalania domieszek organicznych, aż Al_2O_3 stanie się zupełnie biały. Po dokładnym ostudzeniu zawartość wody w nim doprowadza się do 10—12%.

Podana metoda oznaczania zawartości karotenu w paszach, wypróbowana i sprawdzona w Związku Radzieckim, dzięki jej prostocie, mogłaby z powodzeniem znaleźć zastosowanie w naszej praktyce, przyczyniając się w ten sposób do lepszego poznania wartości pokarmowej naszych pasz oraz do umożliwienia prawidłowego normowania żywienia pod względem witaminy A.

Opracował dr M. Chomyszyn

LITERATURA

1. Diewiatnin W. A.: Metody opriedielenija witaminow. Piszczepromizdat, Moskwa.
2. Instrukcja po opriedieleniju karotina w kormach. Wydana przez Wszechzwiązkowy Instytut Naukowo-badawczy Hodowli Zwierząt, Oddział Żywienia
3. Niestierowa E. A.: Chemiczeskije issledowanija pri ocenki pitatielnosti racionow i kormow. Sowietskaja Zoot. nr 5, 1952.
4. Niestierowa E. A. i Bobrow W. I.: Opyt zagotowki witaminного siena w kołchozie imieni Tielmana. Socjalistическоje žiwotnowodstwo, nr 6, 1952.
5. Popandopuło P. Ch.: Metodika opriedielenija karotina w kormach. Trudy WIŻ, tom 16, 1949.
6. Popandopuło P. Ch.: Witamin A i jego rol w žiwotnowodstwie. Sielchoz-giz, Moskwa, 1952.