

- 8.3 Pokud krmivo obsahuje více než 5 % uhličitánů vyjádřených jako uhličitán vápenatý, připojí se filtrační kelímek (4.2) s naváženým vzorkem k zahřívací jednotce (4.1). Vzorek se promyje třikrát 30 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6). Po každém přidání kyseliny se filtruje po minutové prodlevě. Nakonec se promyje 30 ml vody a pokračuje se podle bodu 5.
- 8.4 Pokud se používá přístroj, u kterého je několik filtračních kelímků připojeno k jedné zahřívací jednotce, neprovádí se obě paralelní stanovení u téhož vzorku ve stejné sérii.
- 8.5 Pokud je po varu s kyselinou nebo louhem obtížné roztok přefiltrovat, použije se stlačený vzduch z vypouštěcího ventilu zahřívací jednotky a potom se pokračuje ve filtraci.
- 8.6 Teplota spalování nesmí přesáhnout 500 °C, aby se prodloužila životnost skleněných filtračních kelímků. Během zahřívání a ochlazování nesmí být kelímky vystaveny nadměrnému teplotnímu šoku.

## J. STANOVENÍ OBSAHU CUKRŮ

### 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu redukcujících cukrů a veškerých cukrů po inverzi vyjádřených jako glukóza nebo sacharóza s použitím faktoru 0,95. Je použitelná pro krmné směsi. Pro ostatní krmiva jsou používány zvláštní metody. Je-li to nutné, může být obsah laktózy zjištěn zvlášť a potom zahrnut do celkového výsledku.

### 2. Princip

Cukry se vyextrahují zředěným ethanolem. Extrakt se vyčechí Carrezovými činidly I a II. Ethanol se odstraní a množství cukru před a po inverzi se stanoví metodou podle Luff-Schorla.

### 3. Chemikálie

- 3.1 Ethanol, 40% roztok (v/v), hustota: 0,948 g/ml při 20 °C, neutralizovaný na fenolftalein.
- 3.2 Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.
- 3.3 Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g kyanoželeznanu draselného (ferrokyanidu draselného)  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Doplní se vodou na 100 ml.
- 3.4 Methyloranž, 0,1% roztok (w/v).
- 3.5 Kyselina chlorovodíková 4 mol/l.
- 3.6 Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l.
- 3.7 Roztok hydroxidu sodného, 0,1 mol/l.
- 3.8 Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání se nalije roztok kyseliny citrónové (3.8.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.8.3). Přidá se roztok síranu měďnatého (3.8.1) a doplní se vodou na 1 litr. Nechá se přes noc usadit a pak se přefiltruje.

Zkontroluje se koncentrace takto získaného činidla (Cu – 0,05 mol/l;  $Na_2CO_3$  – 1 mol/l), viz poslední odstavce bodu 5.4. pH tohoto roztoku je přibližně 9,4.

- 3.8.1 Roztok síranu měďnatého: ve 100 ml vody se rozpustí 25 g síranu měďnatého ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) prostého železa.

- 3.8.2 Roztok kyseliny citrónové: v 50 ml vody se rozpustí 50 g kyseliny citrónové ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ).
- 3.8.3 Roztok uhličitanu sodného: v přibližně 300 ml teplé vody se rozpustí 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného. Nechá se vychladnout.
- 3.9 Roztok thiosíranu sodného 0,1 mol/l.
- 3.10 Roztok škrobu: ve 30 ml vody se rozpustí 5 g škrobu a tato směs se přidá do jednoho litru vroucí vody. Vaří se tři minuty, nechá se vychladnout a v případě potřeby se přidá 10 mg jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.
- 3.11 Kyselina sírová 3 mol/l.
- 3.12 Roztok jodidu draselného 30 % (w/v).
- 3.13 Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, propraná ve vodě a vysušená.
- 3.14 3-methylbutan-1-ol (isopenthanol).

#### 4. Přístroje a pomůcky

Míchací zařízení: přibližně 35–40 otáček/min.

#### 5. Postup

##### 5.1 Extrakce vzorku

Do 250 ml odměrné baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 200 ml ethanolu (3.1) a míchá se po dobu jedné hodiny na míchacím zařízení. Přidá se 5 ml Carrezova činidla I (3.2) a asi 30 sekund se míchá. Přidá se 5 ml Carrezova činidla II (3.2) a znovu se míchá jednu minutu. Doplní se po značku ethanol (3.1), homogenizuje a přefiltruje. Odpipetuje se 200 ml filtrátu a odpaří se na polovinu objemu, aby se odstranila většina ethanolu. Zbytek po odpařování se kvantitativně převede do 200 ml odměrné baňky pomocí horké vody. Zchladí se, doplní se vodou po značku, homogenizuje a v případě potřeby přefiltruje. Tento roztok se použije pro stanovení obsahu redukujících cukrů a, po inverzi, pro stanovení obsahu veškerých cukrů.

##### 5.2 Stanovení redukujících cukrů

Odpipetuje se maximálně 25 ml roztoku, který obsahuje nejvýše 60 mg redukujících cukrů vyjádřených jako glukóza. V případě potřeby se odpipetovaný objem doplní destilovanou vodou na 25 ml. Obsah redukujících cukrů se stanoví metodou podle Luff-Schorla. Výsledek se vyjádří jako procentní obsah glukózy ve vzorku.

##### 5.3 Stanovení obsahu veškerých cukrů po inverzi

Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml roztoku. Přidá se několik kapek roztoku methyloranže (3.4) a potom se za stálého, opatrného míchání přidá kyselina chlorovodíková (3.5), až se kapalina trvale zbarví do červena. Poté se přidá 15 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6) a baňka se rychle ponoří do vařící vodní lázně, kde se ponechá třicet minut. Rychle se vychladí na 20 °C a přidá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.7). Doplní se vodou do 100 ml a homogenizuje. Odpipetuje se maximálně 25 ml roztoku, který obsahuje nejvýše 60 mg redukujících cukrů vyjádřených jako glukóza. V případě potřeby se odpipetovaný objem doplní destilovanou vodou na 25 ml. Obsah redukujících cukrů se stanoví metodou podle Luff-Schorla. Výsledek se vyjádří jako procento glukózy nebo, kde je to vhodné, jako sacharózy po vynásobení faktorem 0,95.

##### 5.4 Titrace (metoda podle Luff-Schoorla)

Do 300 ml Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.8); přidá se přesně 25 ml vyčereného cukerného roztoku. Přidají se dvě granule pemzy (3.13) a při ručním míchání se zahřívá nad otevřeným plamenem střední délky tak, aby se kapalina uvedla do varu přibližně za dvě minuty. Pak se Erlenmeyerova baňka neprodleně umístí na azbestem potaženou drátěnou sítku s otvorem o průměru přibližně 6 cm, pod kterou je zapálen plamen. Tento plamen musí být regulován tak, aby se zahřívalo pouze dno Erlenmeyerovy baňky. K Erlenmeyerově baňce se připojí zpětný chladič a vaří se přesně deset minut. Potom se baňka ihned vychladí ve studené vodě a přibližně po pěti minutách se titruje takto:

Do baňky se přidá 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a ihned poté (opatrně a pomalu, vzhledem k riziku nadměrného pění) se přidá 25 ml kyseliny sírové (3.11). Titruje se roztokem thiosíranu sodného (3.9), až se objeví kalné žlutá barva. Pak se přidá škrobový indikátor (3.10) a dokončí se titrace.

Stejná titrace se provede s přesně odměřenou směsí 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.8) a 25 ml vody, 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a 25 ml kyseliny sírové (3.11) bez vaření.

## 6. Výpočet a vyjádření výsledků

S použitím tabulky se stanoví obsah glukózy v mg, který odpovídá rozdílu mezi hodnotami obou titrací vyjádřených v mg thiosíranu sodného 0,1 mol/l. Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

## 7. Zvláštní postupy

- 7.1 V případě krmiv bohatých na melasu nebo jiných krmiv, která nejsou zcela homogenní, se do 1 000 ml odměrné baňky naváží 20 g vzorku a přidá se 500 ml vody. Míchá se jednu hodinu na míchacím zařízení. Vyčechá se Carrezovými činidly I a II (3.2 a 3.3), jak je uvedeno v odstavci 5.1, ale v tomto případě se čtyřnásobným množstvím obou činidel. Doplní se po značku 80% ethanolem (v/v).

Homogenizuje se a přefiltruje. Ethanol se odstraní postupem uvedeným v odstavci 5.1. Pokud ve směsi není žádný dextrinovaný škrob, doplní se po značku destilovanou vodou.

- 7.2 V případě melas a krmných surovin, které jsou bohaté na cukry a téměř bez škrobu (svatojánský chléb, sušené řepné řízky), se odváží 5 g, vloží se do 250 ml odměrné baňky, přidá se 200 ml destilované vody a míchá se na míchacím zařízení po dobu jedné hodiny a v případě potřeby i déle. Vyčechá se Carrezovými činidly I a II (3.2 a 3.3), jak je uvedeno v odstavci 5.1. Doplní se po značku studenou vodou, homogenizuje a přefiltruje. Pro stanovení obsahu veškerých cukrů se dále postupuje podle bodu 5.3.

## 8. Poznámky

- 8.1 Pro zamezení pění se doporučuje přidat (bez ohledu na množství vzorku) přibližně 1 ml isopentanolu (3.14) před varem s Luff-Schoorlovým činidlem.
- 8.2 Rozdíl mezi obsahem veškerých cukrů po inverzi vyjádřených jako glukóza a obsahem redukujících cukrů vyjádřených jako glukóza vynásobený koeficientem 0,95 udává procentní obsah sacharózy.
- 8.3 Pro stanovení obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, mohou být použity dvě metody:
- 8.3.1 Pro přibližný výpočet se obsah laktózy stanovený jinou metodou zkoušení vynásobí koeficientem 0,675 a výsledek se odečte od obsahu redukujících cukrů.
- 8.3.2 Pro přesný výpočet obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, se stejný vzorek musí použít pro dvě konečná stanovení. Jedna zkouška se provede s částí roztoku získaného podle bodu 5.1, druhá zkouška se provede s částí roztoku získaného při stanovení laktózy metodou určenou pro tento účel (po fermentaci ostatních druhů cukrů a vyčechání).

V obou případech se obsah přítomného cukru stanoví metodou podle Luff-Schoorla a vyjádří v mg glukózy. Jeden údaj se odečte od druhého a rozdíl se vyjádří jako procento ve vzorku.

*Příklad:*

Oba objemy odpovídají pro každé stanovení hmotnosti navážky vzorku 250 mg.

V prvním případě je spotřebováno 17 ml roztoku thiosíranu sodného 0,1 mol/l, což odpovídá 44,2 mg glukózy. V druhém případě je spotřebováno 11 ml téhož roztoku, což odpovídá 27,6 mg glukózy.

Rozdíl činí 16,6 mg glukózy.

Obsah redukujících cukrů (s výjimkou laktózy) vyjádřených jako glukóza je tedy:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Tabulka hodnot pro 25 ml Luff-Schoorlova činidla

ml roztoku thiosíranu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,1 mol/l, dvě minuty zahřívání k varu a deset minut varu

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glukóza, fruktóza, invertní cukry $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktóza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltóza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l
	ml	mg	rozdíl	mg	rozdíl	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

## K. STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY

## 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení množství laktózy v krmivech obsahujících více než 0,5 % laktózy.

## 2. Princip

Cukry se vyextrahují ze vzorku vodou. Extrakt se vystaví fermentačnímu účinku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které ponechají laktózu v nezměněném stavu. Po vyčerení a filtraci se obsah laktózy ve filtrátu stanoví metodou podle Luff-Schoorla.

## 3. Chemikálie

- 3.1 Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, suspenze: ve 100 ml vody se suspenduje 25 g čerstvého droždí. Suspenze vydrží v chladničce maximálně jeden týden.
- 3.2 Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.
- 3.3 Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g kyanoželeznatého draselného (ferrokyanidu draselného)  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Doplní se vodou na 100 ml.
- 3.4 Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání se nalije roztok kyseliny citrónové (3.4.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.4.3). Přidá se roztok síranu měďnatého (3.4.1) a doplní se vodou na 1 litr. Nechá se přes noc usadit a potom se přefiltruje. Zkontroluje se koncentrace takto získaného činidla ( $\text{Cu}$  0,05 mol/l;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mol/l). pH tohoto roztoku je přibližně 9,4.