

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 (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). pH tohoto roztoku je přibližně 9,4.

- 3.4.1 Roztok síranu měďnatého: ve 100 ml vody se rozpustí 25 g síranu měďnatého ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) prostého železa.
- 3.4.2 Roztok kyseliny citrónové: v 50 ml vody se rozpustí 50 g kyseliny citrónové ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- 3.4.3 Roztok uhličitanu sodného: v přibližně 300 ml teplé vody se rozpustí 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného. Nechá se vychladnout.
- 3.5 Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, promytá vodou a vysušená.
- 3.6 Roztok jodidu draselného 30 % (w/v).
- 3.7 Kyselina sírová 3 mol/l.
- 3.8 Roztok thiosíranu sodného 0,1 mol/l.
- 3.9 Roztok škrobu: ve 30 ml vody se rozpustí 5 g škrobu a směs se přidá do jednoho litru vroucí vody. Vaří se tři minuty, nechá se vychladnout a bude-li třeba, přidá se 10 g jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

4. **Přístroje a pomůcky**

Vodní lázeň s termostatem nastaveným na 38–40 °C.

5. **Postup**

Do 100 ml odměrné baňky se naváží 1 g vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 25–30 ml vody. Baňka se umístí do vroucí vodní lázně na třicet minut a pak se ochladí přibližně na 35 °C. Přidá se 5 ml suspenze kvasinek (3.1) a homogenizuje. Obsah baňky se nechá stát po dobu dvou hodin ve vodní lázni o teplotě 38–40 °C a potom se vychladí se na teplotu přibližně 20 °C.

Přidá se 2,5 ml Carrezova činidla I (3.2) a třicet vteřin se míchá. Potom se přidá 2,5 ml Carrezova činidla II (3.3) a znovu se míchá třicet vteřin. Doplní se vodou na 100 ml, zamíchá se a přefiltruje. Do 300 ml Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje část filtrátu, nejvýše 25 ml, která obsahuje asi 40–80 mg laktózy. Pokud je třeba, doplní se vodou na 25 ml.

Stejným způsobem se provede slepá zkouška s 5 ml suspenze kvasinek (3.1). Stanoví se obsah laktózy metodou podle Luff-Schoorla tímto způsobem: přidá se přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.4) a dvě granule pemzy (3.5). Ručně se zamíchá při zahřívání na volném plameni střední výšky a kapalina se přivede do varu přibližně během dvou minut. Pak se Erlenmeyerova baňka neprodleně umístí na azbestem potaženou drátěnou sítku s otvorem o průměru přibližně 6 cm, pod kterou byl zapálen plamen. Tento plamen musí být regulován tak, aby se zahřívalo pouze dno Erlenmeyerovy baňky. K Erlenmeyerově baňce se připevní zpětný chladič. Vaří se přesně deset minut. Potom se baňka ihned ochladí ve studené vodě a přibližně po pěti minutách se titruje takto:

Přidá se 10 ml roztoku jodidu sodného (3.6) a ihned poté (opatrně a pomalu, vzhledem k riziku nadměrného pění) se přidá 25 ml kyseliny sírové (3.7). Titruje se roztokem thiosíranu sodného (3.8), až se objeví kalně žlutá barva. Pak se přidá škrobový indikátor (3.9) a dokončí se titrace.

Stejná titrace se provede s přesně odměřenou směsí 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.4) a 25 ml vody, po přidání 10 ml roztoku jodidu sodného (3.6) a 25 ml kyseliny sírové (3.7) bez vaření.

6. **Výpočet a vyjádření výsledků**

S použitím přiložené tabulky se stanoví množství laktózy v mg, které odpovídá rozdílu mezi výsledky dvou titrací, vyjádřených v ml roztoku thiosíranu sodného 0,1 mol/l.

Výsledek se vyjádří jako bezvodá laktóza vyjádřená jako procento ve vzorku.

7. **Poznámka**

U látek obsahujících více než 40% zkvasitelného cukru se použije více než 5 ml kvasinkové suspenze (3.1).

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

L. STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU

– POLARIMETRICKÁ METODA –

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu škrobu a degradačních produktů škrobu s vysokou molekulární hmotností v krmivech za účelem kontroly shody s obsahem metabolizovatelné energie (ustanovení v příloze VII) a se směrnicí Rady 96/25/ES⁽¹⁾.

2. Princip

Metoda zahrnuje dvě stanovení. Nejprve je vzorek podroben působení zředěné kyseliny chlorovodíkové. Po vyčření a filtraci je optická otáčivost roztoku měřena polarimetricky.

Potom je vzorek extrahován 40% ethanolem. Po okyselení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, vyčření a filtraci je optická otáčivost roztoku měřena stejně jako u prvního stanovení.

Rozdíl mezi těmito dvěma měřeními násobený známým faktorem udává obsah škrobu ve vzorku.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok 25 % (w/w), hustota: 1,126 g/ml.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 35.