	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Vydání	1
		Revize	0

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 se používají 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 vyčeří Carrezovými činidly I a II. Ethanol se odstraní a množství cukru před a po inverzi se stanoví metodou podle Luff-Schoorla.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Ethanol, C_2H_5OH , 96%.

2 Ethanol, $c(C_2H_5OH) = 40 \%$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije 420 ml ethanolu (1), doplní vodou (31) po značku a promíchá.

3 Octan zinečnatý, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$.

4 Kyselina octová, CH_3COOH , ledová.

5 Hexakynoželeznan draselný, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$.

6 Carrezovo činidlo I.

Příprava: Navážka 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého (3) se rozpustí ve vodě (31) v 100ml odměrné baňce přidají se 3 ml ledové kyseliny octové (4), doplní po značku a promíchá.


7 Carrezovo činidlo II.

Příprava: Navážka 10,6 g trihydrátu hexakynoželeznanu draselného (5) se rozpustí ve vodě (31) v 100ml odměrné baňce, doplní po značku a promíchá.


8 Indikátor methylovanž.

9 Methylovanž, 0,1% roztok, (w/v).

Příprava: Navážka 0,1 g methylovanže (8) se rozpustí ve vodě (31) v 100ml odměrné baňce, doplní po značku a promíchá.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Revize	0

- 10 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná 35 %, $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$.
- 11 Kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se k asi 600 ml vody (31) přidá 353 ml HCl (10) a po vytemperování se doplní po značku a promíchá.
- 12 Kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se k asi 600 ml vody (31) přidá 8,8 ml HCl (10) a po vytemperování se doplní po značku a promíchá.
- 13 Hydroxid sodný, NaOH.
- 14 Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.
Příprava: Navážka 4 g hydroxidu sodného (13) se rozpustí ve vodě (31) v 1000ml odměrné baňce, doplní po značku a promíchá.
- 15 Síran měďnatý, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 16 Síran měďnatý, $c(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 250\text{g/l}$.
Příprava: Navážka 25 g pentahydrátu síranu měďnatého (15) se rozpustí ve 100 ml vody (31).
- 17 Kyselina citronová, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 18 Kyselina citronová, roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 1000 \text{ g/l}$.
Příprava: Navážka 50 g kyseliny citronové (17) se rozpustí v 50 ml vody (31).
- 19 Uhličitan sodný, Na_2CO_3 , bezvodý.
- 20 Uhličitan sodný, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) \sim 480 \text{ g/l}$.
Příprava: Navážka 143,8 g uhličitanu sodného (19) se rozpustí v 300 ml teplé vody (31).
- 21 Luff-Schoorlovo činidlo.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije připravený roztok uhličitanu sodného (20), následně se opatrně přidá roztok kyseliny citronové (18) a roztok pentahydrátu síranu měďnatého (16). Doplní po značku a promíchá.
- 22 Thiosíran sodný, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 23 Thiosíran sodný, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$.
Příprava: Navážka 24,817 g pentahydrátu thiosíranu sodného (22) a 0,2 g uhličitanu sodného (19) se rozpustí ve vodě (31) v 1000ml odměrné baňce, doplní po značku a promíchá.
- 24 Škrob.
- 25 Roztok škrobu, $c = 5 \text{ g/l}$
Příprava: Navážka 5 g škrobu (25) se rozpustí ve 30 ml vody (31). Tato směs se přidá do jednoho litru vroucí vody (31). Vaří se 3 min a nechá se vychladnout.
- 26 Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, 96%, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Vydání	1
		Revize	0

27 Kyselina sírová, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se k asi 600 ml vody (31) přidá 167 ml H_2SO_4 (26) a po vytemperování doplní po značku a promíchá.

28 Jodid draselný, KI.

29 Jodid draselný, $c(\text{KI}) = 30 \%$.

Příprava: Navážka 30 g jodidu draselného (28) se rozpustí v 70 ml vody (31). Přípravuje se vždy čerstvý.

30 Isopenthanol, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$.

31 Destilovaná nebo demineralizovaná voda.

32 Dichroman draselný, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Poznámky

1 *Příklad stanovení faktoru odměrného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$:*

Do tří kuželových baněk o objemu 500 ml se zabroušenou zátkou se naváží 0,08-0,12 g dichromanu draselného (32) – 2 × rekrystalizovaný, rozetřený a vysušen. Rozpustí se v 50 ml vody (31). K roztoku se přidá 10 ml čerstvě připraveného roztoku 30% KI (29) a 20 ml 3M H_2SO_4 (27). Baňka se ihned uzavře zátkou a nechá stát v temnu 10 min. Potom se zátky i stěny baňky opláchnou vodou, přidá se 200 ml vody (31) a vyloučený jód se titruje připraveným roztokem thiosíranu sodného (23) do žlutého zbarvení roztoku. Pak se přidají asi 2 ml roztoku škrobu (25) a pokračuje se v titraci za důkladného promíchávání do přechodu z modrého do zeleného zbarvení roztoku.

Výpočet faktoru $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$:

$$f = \frac{1000 \cdot n}{4,903 \cdot V}$$

V - spotřeba odměrného roztoku thiosíranu sodného (23) v ml.


n - navážka $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (32) v g.

1 ml thiosíranu sodného ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) je ekvivalentní 4,903 mg $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

4 Přístroje a pomůcky

1 Míchací zařízení, přibližně 35 až 40 ot./min.

2 Vodní lázeň s termostatem.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Vydání	1
		Revize	0

- 3 Kahan, topné hnízdo nebo topná deska
- 4 Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, propraná ve vodě a vysušená, nebo skleněné varné kuličky.
- 5 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.

5 Postup

5.1 Extrakce vzorku

Do 250ml odměrné baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 200 ml ethanolu (2) a míchá se po dobu jedné hodiny na míchacím zařízení. Přidá se 5 ml Carrezova činidla I (6) a asi 1 min se míchá. Přidá se 5 ml Carrezova činidla II (7) a znovu se 1 min míchá. Doplní se po značku ethanol (2), 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 200ml odměrné baňky pomocí horké vody (31). Zchladí se, doplní se vodou (31) po značku, homogenizuje a v případě potřeby přefiltruje. Tento roztok se použije pro stanovení obsahu redukcujících cukrů a, po inverzi, pro stanovení obsahu veškerých cukrů.

Poznámky

- 2 *V případě očekávaného nízkého obsahu cukrů ve vzorku je možné navýšit navážku na 5 g.*

5.2 Stanovení redukcujících cukrů


Odpipetuje se maximálně 25 ml roztoku, který obsahuje nejvýše 60 mg redukcujících cukrů vyjádřených jako glukóza. V případě potřeby se odpipetovaný objem doplní vodou (31) na 25 ml. Obsah redukcujících cukrů se stanoví metodou podle Luff-Schoorla.

5.3 Stanovení obsahu veškerých cukrů po inverzi

Do 100ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml roztoku. Přidá se několik kapek roztoku methylovanže (9) a potom se za stálého opatrného míchání přidá kyselina chlorovodíková (11), až se kapalina trvale zbarví do červena. Poté se přidá 15 ml kyseliny chlorovodíkové (12) a baňka se rychle ponoří do vařící vodní lázně, kde se ponechá 30 min. Rychle se vychladí na 20 °C a přidá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (14). Doplní se vodou (31) do 100 ml a homogenizuje. Odpipetuje se maximálně 25 ml roztoku, který obsahuje nejvýše 60 mg redukcujících cukrů vyjádřených jako glukóza. V případě potřeby se odpipetovaný objem doplní vodou (31) na 25 ml. Obsah redukcujících cukrů se stanoví metodou podle Luff-Schoorla. 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 300ml Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje 25 ml Luff-Schoorlova činidla (21); přidá se přesně 25 ml vyčeřeného cukerného roztoku. Přidají se dvě granule pemzy/dvě varné kuličky

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Vydání	1
		Revize	0

a při ručním míchání se zahřívá nad otevřeným plamenem střední délky tak, aby se kapalina uvedla do varu přibližně za 2 min. Pak se Erlenmeyerova baňka neprodleně umístí na azbestem potaženou drátěnou síťku s otvorem o průměru přibližně 6 cm, pod kterou je zapálen plamen. Plamen musí být regulován tak, aby se zahřívalo pouze dno Erlenmeyerovy baňky. K Erlenmeyerově baňce se připojí zpětný chladič a vaří se přesně 10 min.

Pro titraci lze využít alternativního postupu, kdy se do (250 – 300)ml Erlenmayerovy baňky nebo varné baňky se zábrusem odpipetuje 25 ml Luff-Schoorlova činidla (21); přidá se přesně 25 ml vyčeřeného cukerného roztoku. Přidají se dvě granule pemzy/dvě skleněné varné kuličky, baňka se vloží do topného hnízda nebo na topnou desku, připojí se zpětný chladič a vaří se přesně 10 min.

Potom se baňka ihned vychladí ve studené vodě a přibližně po 5 min se titruje takto:

Do baňky se přidá 10 ml roztoku jodidu draselného (29) a ihned poté (opatrně a pomalu, vzhledem k riziku nadměrného pění) se přidá 25 ml kyseliny sírové (27). Titruje se roztokem thiosíranu sodného (23), až se objeví kalně žlutá barva. Pak se přidá škrobový indikátor (25) a titruje se do vymizení fialového zabarvení.

Stejná titrace se provede s přesně odměřenou směsí 25 ml Luff-Schoorlova činidla (21), 25 ml vody (31), 10 ml roztoku jodidu draselného (29) a 25 ml kyseliny sírové (27).


Poznámky

3 *Bez ohledu na množství vzorku se pro zamezení pění se doporučuje přidat přibližně 1 ml isopentanolu (30) před varem s Luff-Schoorlovým činidlem.*

6 Zvláštní postupy

U krmiv bohatých na melasu nebo jiných krmiv, která nejsou zcela homogenní, se do 1 000ml odměrné baňky naváží 20 g vzorku a přidá se 500 ml vody (31). Míchá se 1 h na míchacím zařízení. Vyčeří se Carrezovými činidly I a II (6) a (7), jak je uvedeno v odstavci 5.1, ale 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 vodou (31).

U melas a krmných surovin, které jsou bohaté na cukry a téměř bez škrobu (svatojánský chléb, sušené řepné řízky), se odváží 5 g vzorku, vloží se do 250ml odměrné baňky, přidá se 200 ml vody (31) a míchá se 1 h na míchacím zařízení, v případě potřeby i déle. Vyčeří se Carrezovými činidly I a II (6) a (7), jak uvedeno v odstavci 5.1. Doplní se po značku studenou vodou (31), homogenizuje a přefiltruje. Pro stanovení obsahu veškerých cukrů se dále postupuje podle bodu 5.3.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Vydání	1
		Revize	0

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah přímo redukujících cukrů (X) nebo veškerých cukrů (Y) v % se vypočítá podle vztahu

$$X (Y) = \frac{m_1}{10 \times m_2}$$

m_1 - množství příslušného přímo redukujícího (redukujícího cukru po inverzi) v mg zjištěného z tabulky 1 na základě rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného v ml při titraci zkoušeného vzorku a slepé zkoušky.

m_2 - hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g.

Obsah neredukujících cukrů, vyjádřený jako obsah sacharózy v % (Z), se vypočítá podle vztahu

$$Z = (Y - X) \times 0,95$$

Poznámky

4 Pro stanovení obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, mohou být použity dvě metody:

4.1 Pro přibližný výpočet se obsah laktózy stanovený jinou metodou zkoušení vynásobí koeficientem 0,675 a výsledek se odečte od obsahu redukujících cukrů.


4.2 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 vyčerešení).

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:

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10084.1 – Stanovení obsahu cukrů	Vydání	1
		Revize	0

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

Tabulka 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 ml	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	rozdíl	
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