

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta

CHEMIE POTRAVIN

Laboratorní cvičení

Andrea Kleckerová

**Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta**

CHEMIE POTRAVIN

Laboratorní cvičení

Ing. Andrea Kleckerová, Ph.D.

Brno, 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.

© Andrea Kleckerová, 2014

ISBN 978-80-7509-170-3

OBSAH

ZÁKLADY BEZPEČNOSTI PRÁCE V CHEMICKÉ LABORATOŘI.....	6
1 VYBRANÉ ANALÝZY MLÉKA, MLÉČNÝCH VÝROBKŮ A VAJEC.....	8
1.1 Stanovení bílkovin	8
1.1.1 Stanovení obsahu celkového dusíku a bílkovin podle Kjeldahla.....	8
1.1.2 Stanovení obsahu bílkovin v mléce podle Steineggera (formolová titrace)	11
1.1.3 Spektrofotometrické stanovení bílkovin roztokem amidočerni 10 B	12
1.1.4 Spektrofotometrické stanovení bílkovin oranží G	14
1.1.5 Stanovení obsahu bílkovin biuretovým činidlem (spektrofotometricky)	15
1.1.6 Stanovení bílkovin Nesslerovým činidlem (spektrofotometricky)	17
1.2 Stanovení laktosy	18
1.2.1 Stanovení laktosy v mléce (volumetricky)	18
1.2.2 Stanovení laktosy v mléce (polarimetricky)	20
1.3 Stanovení tuku	21
1.3.1 Stanovení celkového tuku metodou Schmid-Bondzynski-Rafzloff.....	21
1.3.2 Stanovení tuku v mléce a mléčných výrobcích podle Röse-Gottlieba	23
1.3.3 Acidobutyrometrické stanovení tuku v mléce podle Gerbera.....	25
1.4 Stanovení sušiny a minerálních látek.....	27
1.4.1 Vážkové stanovení sušiny – stanovení celkové sušiny a stanovení sušiny mléka výpočtem z hustoty a obsahu tuku	27
1.4.2 Stanovení vápníku v mléce (titrační metoda)	29
1.4.3 Stanovení vápníku komplexonem.....	31
2 VYBRANÉ ANALÝZY MASA A MASNÝCH VÝROBKŮ.....	32
2.1 Stanovení a důkaz bílkovin v mase a masných výrobcích	32
2.1.1 Stanovení dusíku v mase podle Kjeldahla	32
2.1.2 Důkaz bílkovin biuretovou reakcí.....	34
2.1.3 Důkaz bílkovin ninhydrinovou reakcí	35
2.1.4 Důkaz bílkovin xanthoproteinovou reakcí.....	35
2.1.5 Stanovení hydroxyprolinu (spektrofotometricky).....	36
2.2 Stanovení obsahu soli v masných výrobcích	39
2.2.1 Stanovení obsahu soli v masných výrobcích (vyluhovací metoda dle Mohra)	39
2.2.2 Stanovení obsahu soli (chloridů) v mase a masných výrobcích (dle Volharda)....	41
2.2.3 Stanovení obsahu soli v mase a masných výrobcích potenciometrickou metodou	43
3 VYBRANÉ ANALÝZY ROSTLINNÝCH A ŽIVOČIŠNÝCH TUKŮ	44
3.1 Stanovení peroxidového čísla (volumetricky)	44
3.2 Stanovení čísla kyselosti	46
3.3 Stanovení čísla zmýdelnění	48
3.4 Stanovení esterového čísla.....	49

3.5	Stanovení jodového čísla	50
3.6	Stanovení hydroxylového čísla	52
3.7	Stanovení anisidinového čísla	54
3.8	Extrakce a identifikace mastných kyselin v tucích a olejích	56
4	VYBRANÉ ANALÝZY MOUKY A PEKAŘSKÝCH VÝROBKŮ	59
4.1	Stanovení škrobu (polarimetricky)	59
4.2	Stanovení lepku.....	61
5	VYBRANÉ ANALÝZY NÁPOJŮ	62
5.1	Vybrané analýzy čaje a kávy	62
5.1.1	Izolace kofeinu z čaje nebo kávy	62
5.1.2	Stanovení obsahu tříslovin v čaji podle Edera	64
5.2	Vybrané analýzy piva a vína.....	66
5.2.1	Stanovení polyfenolových sloučenin v ovocných šťávách, pivu a vínu	66
5.2.2	Stanovení antioxidační aktivity/kapacity (spektrofotometricky).....	68
5.2.3	Oxidimetrické stanovení alkoholu podle Rebeleina (destilační metoda)	70
5.2.4	Stanovení obsahu ethanolu lihoměrem	72
5.2.5	Stanovení methanolu v destilátech (spektrofotometricky)	73
5.2.6	Stanovení oxidu siřičitého ve víně (jodometricky)	74
5.2.7	Izolace, důkaz a dělení syntetických barviv ve víně.....	76
5.2.8	Titrační stanovení CO ₂ v pivě	78
5.2.9	Refraktometrické stanovení stupňovitosti, skutečného extraktu a ethanolu.....	80
5.2.10	Pěnovost a stálost pěny piva	82
5.2.11	Stanovení chininu v nápojích.....	83
6	VYBRANÉ ANALÝZY OSTATNÍCH VÝROBKŮ	84
6.1	Stanovení kyseliny octové v obchodním octě konduktometricky.....	84
6.2	Vybrané analýzy dětské výživy (ovocných přesnídávek, zeleninových a masozeleninových příkrmů)	85
6.2.1	Stanovení celkového obsahu kyselin	85
6.2.2	Jodometrické stanovení kyseliny askorbové.....	86
	POUŽITÁ LITERATURA	87

ÚVOD

Tento učební text je určen studentům z oboru Technologie potravin, vyučovaného na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně. Tato skripta obsahují návody k laboratorním úlohám do předmětu Chemie potravin - cvičení.

Text je rozdělen do sedmi kapitol, zahrnujících základy bezpečnosti práce v laboratoři, vybrané analýzy mléka, mléčných výrobků a vajec, masa a masných výrobků, rostlinných a živočišných tuků, vybrané analýzy mouky a pekařských výrobků, analýzy různých nápojů a dalších výrobků.

Pro tento učební text byly vybrány takové úlohy, které buď již jsou náplní tohoto předmětu, nebo úlohy, které budou začleněny do nového sylabu vytvořeného v rámci inovace předmětu za podpory projektu s názvem Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace (CZ.1.07/2.2.00/28.0302).

Autorka

ZÁKLADY BEZPEČNOSTI PRÁCE V CHEMICKÉ LABORATOŘI

Před zahájením práce jsou všichni studenti povinni seznámit se s bezpečnostními a požárními předpisy vyvěšenými v laboratoři a dodržovat je. Každý, kdo v laboratoři pracuje, musí postupovat tak, aby neohrozil sebe ani své kolegy. Nejdůležitější zásady bezpečné práce v laboratoři jsou uvedeny v normě ČSN 01 8003 (Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích).

V chemické laboratoři je povoleno vykonávat pouze práce, které jsou náplní laboratorních cvičení, a studenti jsou tak povinni řídit se pokyny vyučujícího a vykonávat pouze takové úlohy, které jsou schváleny nebo nařízeny vyučujícím.

Studentům je umožněn vstup do laboratoře pouze v ochranném oděvu – pracovním pláští a vhodné pracovní obuvi. U jednotlivých úloh jsou k dispozici ochranné brýle, ochranný štít a rukavice.

Každý student je na začátku semestru proškolen v bezpečnosti práce v laboratoři, což stvrdí vyučujícímu podpisem na příslušném formuláři, který je následně uložen k archivaci.

Každý student pracuje pouze na zadaných úkolech a na cvičení přijde teoreticky připraven.

Student neprodleně nahlásí vyučujícímu veškeré zjištěné závady a je povinen ho informovat o jakémkoliv zranění či nehodě.

V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.

Je zakázáno přenášet či jinak manipulovat s vybavením laboratoře a přístroji a z laboratoře vynášet chemikálie či pomůcky. Při práci s analytickými přístroji a ostatními pomůckami je nutné dodržovat pokyny výrobce nebo vyučujícího.

Při práci s těkavými látkami, rozpouštědly či s látkami, u kterých je riziko úniku škodlivin do ovzduší, je nutné pracovat v digestoři s účinným odsáváním a spuštěnými ochrannými skly.

Žíraviny a jedy zásadně nepipetujeme ústy, stejně tak jako se žádná chemikálie neochutnává. Pokud jsou tyto látky v pevném stavu, pak musí být nabírány lopatkami, laboratorními lžičkami či kopisty z odolných materiálů, které s těmito látkami nereagují. Rozpouštěním nebo ředěním žíravín se uvolňuje teplo, a proto musí být rozpouštěny po částech nebo za stálého míchání a chlazení.

Pokud dojde k rozlití kyseliny, je nutno ji ihned spláchnout vodou, případně neutralizovat sodou a opláchnout, v případě rozlití zásady ji ihned spláchnout vodou.

Při ředění kyselin se vždy přilévá kyselina do vody.

Zapálené hořáky kahanů není povoleno ponechat bez dozoru. Prošlehne-li plamen dovnitř kahanu (kahan „hoří uvnitř“), nebo „ulétne-li“ plamen (ucházel by plyn), je třeba okamžitě uzavřít přívod plynu a kahan seřídít.

K utajenému varu, ke kterému může dojít při zahřívání kapalin, je nutné předejít použitím varných kamínků.

Při zahřívání se musí ústí nádob (zkumavky, baňky) udržovat odvráceně od sebe a dalších pracovníků.

Do laboratorních výlevek se nesmějí vylévat rozpouštědla, která se nemísí s vodou, jedy, výbušné látky nebo látky uvolňující jedovaté či dráždivé plyny a kyseliny a hydroxidy s vysokou oxidací. Tyto látky se shromažďují do předem určených a označených nádob. Kyseliny a hydroxidy je možno vylévat do odpadu pouze po dostatečném naředění.

Odpad pevného charakteru se třídí na skleněný a neskleněný a pak se vyhazuje do odpadkových košů na něj určených.

Před odchodem z laboratoře studenti uvedou svoje pracovní místo do původního stavu, elektrické přístroje vypnou ze sítě, řádně si umyjí ruce a přesvědčí se, zda jsou uzavřeny přívody plynu a vody a vypnuty elektrické přístroje; pracovní místo je pak předáno vedoucímu cvičení.

1 VYBRANÉ ANALÝZY MLÉKA, MLÉČNÝCH VÝROBKŮ A VAJEC

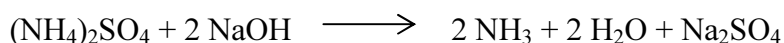
1.1 Stanovení bílkovin

Základní metodou stanovení bílkovin v mléce je metoda podle Kjeldahla, která je velmi přesná, zároveň ale pracovně náročná. Za provozní metodu je považováno stanovení bílkovin s roztokem amidočerni 10 B. Pro stanovení bílkovin lze také využít formolovou titraci dle Steineggera a pro důkaz bílkovin a stanovení jejich obsahu je možné použít spektrofotometrické metody, a to s biuretovým nebo s Nesslerovým činidlem.

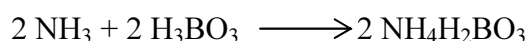
1.1.1 Stanovení obsahu celkového dusíku a bílkovin podle Kjeldahla

Princip metody:

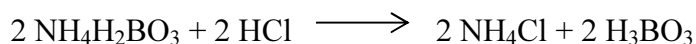
Celkový obsah dusíku v mléce je množství dusíku bílkovinné i nebílkovinné povahy, vyjádřené v g ve 100g mléka. Vzorek mléka je mineralizován směsí koncentrované kyseliny sírové a síranu draselného (pro zvýšení bodu varu reakční směsi a zesílení oxidačního účinku směsi pro mineralizaci) za použití síranu měďnatého jako katalyzátoru, přičemž přítomný organický dusík je převeden na síran amonný. Dusík ve vzniklém síranu amonném se stanovuje destilační metodou, přidávkem nadbytku NaOH se uvolní amoniak podle reakce:



Uvolněný amoniak se metodou destilace s vodní parou predestiluje do předlohy se známým nadbytečným množstvím standardního roztoku kyseliny borité, se kterou reaguje podle rovnice:



Vzniklý boritan amonný se titruje standardním roztokem HCl:



Metoda slouží jako referenční (rozhodčí – dle ČSN EN ISO 8968-1 (57 0528) a současně jako metoda pro kalibraci přístrojů pro automatické stanovení bílkovin.

Obsah dusíku se vypočte z uvolněného množství amoniaku.

1 mol HCl = 1 mol N = 14 g N; 1 ml 0,1 M HCl = 0,0014 g N

Chemikálie:

kyselina sírová H₂SO₄ 95-98% (ρ₂₀ = 1,84/cm³) (bez dusíkatých látek);

hydroxid sodný NaOH roztok 40 %, (bez dusíkatých látek);
síran draselný K_2SO_4 (bez dusíkatých látek);
síran měďnatý $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ $c = 5,0$ g/100ml;
kyselina chlorovodíková HCl – standardní roztok $c = 0,1$ mol/l;
kyselina boritá H_3BO_3 $c = 40,0$ g/l;
síran amonný $(NH_4)_2SO_4$ o čistotě nejméně 99,9%;
směsný indikátor (0,1 g methylčerveně se rozpustí v 95 % ethanolu, zředí se ethanolem na 50 ml a promíchá. 0,5 g bromkresolové zeleně se zapustí v 95 % ethanolu a zředí se ethanolem na 250 ml a promíchá. Oba roztoky se smíchají dohromady.

Pomůcky:

Kjeldahlova baňka se zařízením na mineralizaci vzorku na 500 nebo 800 ml, aparatura pro destilaci s vodní parou; byreta; vodní lázeň, titrační baňky, odměrné válce, pipety, varné kamínky

Pracovní postup:

Do Kjeldahlovy baňky (500 ml) se odváží asi $5,0 \pm 0,1$ g mléka s přesností na 0,0001 g, přidá se 1 ml roztoku síranu měďnatého, 15 g síranu draselného, 25 ml koncentrované H_2SO_4 , 5 - 10 varných kamínků a obsah baňky se promíchá. Kyselinou sírovou se opláchnou i stěny baňky tak, aby byly smyty veškeré ulpělé zbytky vzorku. Baňka se zahřeje na mírném plameni tak, aby obsah nevypěnil, přibližně 20 minut. Potom se plamen zvýší, a prudce se zahřívá dalších 15 minut. Po spálení veškerých organických látek získáme zcela vyčreňený obsah baňky. Po vyjasnění se pokračuje v zahřívání asi 1 – 1,5 hodiny. Po vychladnutí na pokojovou teplotu se obsah baňky mírně zředí přidáním 300 ml vody, opatrně se přidá 75 ml NaOH a baňka se připojí na destilační přístroj. Konec chladiče je ponořen do titrační baňky s 50 ml kyseliny borité. Uvolněný amoniak se jímá v roztoku kyseliny borité. Ohřev se nastaví tak vysoko, aby směs vřela. V destilaci se pokračuje do té doby, než začne obsah nárazově nepravidelně vřít. Poté se Kjeldahlova baňka odpojí od destilačního přístroje a vypne se zdroj ohřevu. Konec trubice se opláchne destilovanou vodou do předlohy. Obsah předlohy se titruje roztokem HCl (0,1 mol/l) za přídavku indikátoru do růžova. Stejným způsobem se provede slepý pokus, kdy se místo vzorku mléka použije 5 ml vody s přídavkem 0,85 g sacharózy.

Vyhodnocení:

Obsah dusíku w_N [%] se vypočte podle vzorce:

$$w_N = \frac{1,4007 \cdot (V_1 - V_0) \cdot c}{m}$$

kde m [g] je hmotnost vzorku mléka, V_1 [ml] je objem HCl ($c = 0,1$ mol/l) při titraci vzorku, V_0 [ml] je objem HCl ($c = 0,1$ mol/l) při titraci slepého pokusu a c [mol/l] je přesná koncentrace HCl.

Obsah „hrubých bílkovin“ w_p [%] se vypočítá z celkového obsahu dusíku w_N vynásobením přepočítávacím faktorem **6,38**. Hodnota je však vyšší o obsah nebílkovinného dusíku, jehož množství může být 5 až 8 % z celkového dusíku v mléce.

$$w_p = w_N \cdot 6,38$$

1.1.2 Stanovení obsahu bílkovin v mléce podle Steineggera (formolová titrace)

Princip metody:

Stanovuje se tzv. aldehydové číslo (stanovení bílkovinného titru) po přidavku formaldehydu, kterým se blokuje působnost volných skupin $-NH_2$, kde aminová skupina volných aminokyselin se váže formaldehydem, čímž je umožněna reakce karboxylu s roztokem hydroxidu sodného. Aldehydové číslo je dáno počtem ml $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH potřebného na neutralizaci 100 ml vzorku (přičemž $1 \text{ ml } 0,25 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH} = 0,0758 \text{ g}$ bílkovinného dusíku).

Chemikálie:

Fenolftalein (1 % ethanolový roztok);

hydroxid sodný NaOH $c = 0,25 \text{ mol/l}$;

40% formaldehyd (předem zneutralizovaný: 100 ml roztoku formaldehydu s přidavkem 0,5 ml 1 % roztoku fenolftaleinu bylo titrováno do slabě růžového zbarvení roztokem NaOH ($0,25 \text{ mol/l}$))

Pomůcky: titrační baňky, byreta, pipety

Pracovní postup:

Do titrační baňky se odpipetuje 50 ml mléka, přidají se 2 ml 1 % ethanolového roztoku fenolftaleinu a směs se zneutralizuje titrací $0,25 \text{ mol/l}$ NaOH do růžova. Ke směsi se odpipetuje 5 ml 40 % formaldehydu zneutralizovaného na fenolftalein. Po promíchání se směs nechá stát 2 minuty v klidu. Poté se provede opakovaná titrace $0,25 \text{ mol/l}$ NaOH na fenolftalein.

Vyhodnocení:

Druhá spotřeba je tzv. aldehydové číslo (1 ml roztoku $0,25 \text{ M}$ NaOH = 1 aldehydové číslo (spotřeba A) a odpovídá $0,0758 \text{ g}$ bílkovinného dusíku). Pro přepočtení na obsah bílkovin se vypočtené množství bílkovinného dusíku vynásobí korekčním součinitelem 6,38 dle vzorce:

$$\text{Obsah bílkovin (g/100 ml)} = \frac{A \cdot 0,0758 \cdot 6,38 \cdot c}{0,25}$$

kde c je přesná koncentrace $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH, stanovená pro stanovení titrační kyselosti
Výsledek dělený hustotou mléka udává obsah celkových bílkovin v %. Podle vyhlášky
Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. by měl být obsah bílkovin v plnotučném, polotučném
i v odstředěném mléce roven nebo větší jak 2,9 %.

1.1.3 Spektrofotometrické stanovení bílkovin roztokem amidočerni 10 B

Princip metody:

Bílkoviny mléka reagují s roztokem organického barviva amidočerni 10 B, čímž dojde
k vytvoření nerozpustného komplexu bílkovina – barvivo. Po oddělení vysrážených bílkovin
společně s navázaným barvivem filtrací nebo odstředěním se stanoví pokles intenzity
zabarvení roztoku, který je úměrný obsahu bílkovin. Jedná se o provozní metodu dle ČSN
570530.

Chemikálie: kyselina citronová $c = 0,3 \text{ mol/l}$, roztok amidočerni 10 B (připravený
rozpuštěním 0,616 g v 1000 ml roztoku 0,3 mol/l kyseliny citronové)

Pomůcky: pipety, centrifugační zkumavky, odstředivka, odměrné baňky, spektrofotometr

Pracovní postup:

Do odměrné baňky na 100 ml se napipetuje 5 ml mléka, doplní se destilovanou vodou
po rysku a obsah se důkladně promíchá. 2,5 ml takto zředěného vzorku mléka se napipetuje
do kónické centrifugační zkumavky a přidá se 5 ml roztoku barviva amidočerni 10 B,
promíchá se a nechá se 10 minut stát při laboratorní teplotě. Vzniklá sraženina se odstřeďuje 5
minut při 2500 ot./min. Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetují 3 ml supernatantu a doplní
se destilovanou vodou po značku a protřepáváním se baňka důkladně promíchá. Intenzitu
zabarvení roztoku měříme na spektrofotometru v 1 cm kyvetě při vlnové délce 615 nm.

Vyhodnocení:

Množství bílkovin se odečte z kalibrační křivky, která se sestojí vynesemím závislosti
úbytku zabarvení (absorbance) roztoku amidočerni 10 B na stoupajícím obsahu bílkovin
stanoveným Kjeldahlovou metodou. Obsah hrubých bílkovin ve vzorku w_p , uváděný jako
hmotnostní podíl v %, se vypočítá ze vztahu:

$$w_p = w_N \cdot 6,38$$

kde w_N [%] je obsah dusíku ve vzorku uváděný jako hmotnostní podíl a číslo **6,38** je obecně uznávaný faktor pro přepočet obsahu dusíku na obsah hrubých bílkovin.

1.1.4 Spektrofotometrické stanovení bílkovin oranž G

Princip metody:

Bílkoviny vážou z pufrovaného roztoku barvivo oranž G, z jehož úbytku zjištěného spektrofotometricky proměřením intenzity zbarvení roztoku při 480 nm se na základě empiricky zjištěného vztahu určí jejich množství ve vzorku. Metoda je vhodná pro rychlé stanovení bílkovin v některých rostlinných materiálech a také pro stanovení bílkovin v mléce.

Chemikálie:

oranž G (připraví se rozpuštěním 1,3 g ve 100 ml horkého 0,05 mol/l fosfátového pufru), fosfátový pufr 0,05 mol/l (připraví se rozpuštěním 3,4 g dihydrogenfosforečnanu draselného KH_2PO_4 , 3,4 ml 42% kyseliny fosforečné, 60 ml kyseliny octové, 1 ml kyseliny propionové, 2 g kyseliny šťavelové v 800 ml vody, poté se zředí na 1000 ml vodou)

Pomůcky: kádinka, odměrný válec, centrifuga, spektrofotometr, kyvety

Pracovní postup:

Do kádinky se naváží 2,3 g mléka (nebo 0,24 g sušeného mléka) a přidá se 40 ml roztoku činidla oranž G. Směs se intenzivně protřepává po dobu 15 sekund a sraženina se oddělí centrifugací po dobu 5 minut při 5 tis. ot/min. Intenzita zbarvení v roztoku se proměří při 480 nm proti základnímu standardnímu roztoku, který se připraví následujícím způsobem: 0,6 g barviva a 1 ml kyseliny propionové se rozpustí ve 100 ml horké vody, roztok se ochladí a doplní na 1000 ml vodou.

Vyhodnocení:

Obsah bílkovin x (%) ve vzorku se vypočte pomocí rovnice:

$$x = (A_0 - A)/K$$

kde A_0 je absorbance standardu, A je absorbance vzorku a K je hodnota regresního koeficientu

(pro mléko: $A_0 = 1,231$ a $K = 0,1700$; pro sušené mléko: $A_0 = 1,295$ a $K = 0,1865$).

1.1.5 Stanovení obsahu bílkovin biuretovým činidlem (spektrofotometricky)

Princip metody:

Celkovou bílkovinu v séru je také možné stanovit biuretovou reakcí. V alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí dávají bílkoviny fialové zbarvení, vhodné k fotometrickému stanovení. V průběhu reakce se vytváří komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb. Vzniklý komplex silně absorbuje záření v oblasti 540 – 560 nm. Intenzita zbarvení komplexu se měří spektrofotometricky a je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Biuretovou reakci obecně poskytují látky obsahující v molekule alespoň dvě peptidové vazby (-CO-NH-), nebo dvě skupiny -CO-NH₂. Reakce tedy není specifická pouze pro bílkoviny.

Chemikálie:

Biuretové činidlo: pentahydrát síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ $c = 13,0 \text{ mmol/l}$;

vinan sodno-draselný $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ $c = 32,0 \text{ mmol/l}$;

hydroxid sodný NaOH $c = 0,6 \text{ mol/l}$

standard bílkoviny (5g/l)

Pomůcky:

sada zkumavek, stojan na zkumavky, pipety, kádinky, nálevka, gáza, kyvety pro spektrofotometr

Pracovní postup:

Příprava kalibračních roztoků:

Pro přípravu sady kalibračních roztoků se do pěti zkumavek napipetuje standard bílkoviny (5 g/l) dle tabulky 1:

Tabulka 1:

H ₂ O ml	Standard (5 g/l) ml
1	0
0,75	0,25
0,5	0,5
0,25	0,75
0	1

Do každé zkumavky se přidají 3 ml biuretového činidla a zkumavky se nechají stát 30 minut při laboratorní teplotě.

Stanovení obsahu bílkovin ve vzorku:

Pro stanovení obsahu bílkoviny bude použit vzorek vaječného bílku. Vzorek bílku se zředí dvacetkrát destilovanou vodou a přefiltruje přes gázu. Do tří zkumavek se napipetuje 0,5 ml zředěného vzorku bílku, přidají se 3 ml biuretového činidla a zkumavky se nechají 30 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí 30 minut se změří absorbance standardů i vzorků při 540 nm proti slepému vzorku bez bílkoviny.

Vyhodnocení:

Z naměřených dat se zpracuje kalibrační křivka a vypočte se koncentrace měřených vzorků.

Zjištěná koncentrace v g/l se přepočte na obsah bílkoviny v bílku.

Použitelnost metody:

Metoda je méně citlivá, pohybuje se kolem 1 - 10 g bílkoviny/l, je však rychlá (není nutná mineralizace), a proto je využívána k orientačnímu stanovení bílkovin.

1.1.6 Stanovení bílkovin Nesslerovým činidlem (spektrofotometricky)

Princip metody:

Dusík vázaný v bílkovinách se mineralizací s kyselinou sírovou převede v amonnou sůl, která se stanoví spektrofotometricky po reakci s Nesslerovým činidlem.

Chemikálie:

Standardní roztok síranu amonného (připravený dle postupu: 0,4706 g síranu amonného se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml)

Nesslerovo činidlo (již připravené)

Pomůcky:

8x 50 ml odměrná baňka, pipety, kádinky, odměrný válec, kyvety pro spektrofotometr

Pracovní postup:

Příprava kalibrační křivky:

Standardní roztok síranu amonného se zředí desetkrát destilovanou vodou (10 ml do 100 ml baňky). Takto připravený pracovní roztok obsahuje 0,1 mg dusíku v 1ml roztoku. Do série 50 ml odměrných baněk se odpipetuje 0 - 60 µg dusíku, přidá se válečkem 30 ml vody, 2ml Nesslerova činidla a doplní vodou po rysku. Zbarvení se měří po 15 minutách při 450 nm proti slepému vzorku bez standardu.

Stanovení obsahu bílkovin ve vzorku:

Mineralizát vzorku (již připravený) obsahuje 0,2g vaječného bílku ve 100 ml roztoku. Do 50 ml baňky se odpipetuje 1 ml mineralizátu, přidá se válečkem 30 ml vody a 2 ml Nesslerova činidla a doplní se po rysku vodou. Zbarvení se měří po 15 minutách při 450 nm paralelně 2 - 3krát.

Vyhodnocení:

Obsah dusíku se odečte z kalibrační křivky a přepočte na navážku k mineralizaci. Vynásobením faktorem 6,25 se získá obsah hrubé bílkoviny.

1.2 Stanovení laktosy

1.2.1 Stanovení laktosy v mléce (volumetricky)

Princip metody:

Obsah laktosy se stanoví titrací roztokem thiosíranu sodného podle množství redukovaného halogenu, který se uvolní při reakci s chloraminem T a jodidem draselným.

Chemikálie:

kyselina fosforečná H_3PO_4 8,8 % roztok

kyseliny chlorovodíková HCl $c = 2 \text{ mol/l}$

kyselina sírová H_2SO_4 $c = 0,5 \text{ mol/l}$

thiosíran sodný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ $c = 0,04 \text{ mol/l}$

jodid draselný KI 10% (připravený: 5 g jodidu draselného se rozpustí v destilované vodě a zředí se na 50 ml.

dichroman draselný $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

chloramin T

wolframanové činidlo (připravené: 7 g wolframanu sodného ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) rozpuštěno v 870 ml destilované vody)

roztok škrobu

Pomůcky:

odměrné baňky, pipety, kádinky, odměrný válec, Erlenmayerovy baňky, byreta, filtrační nálevka

Pracovní postup:

Do odměrné baňky na 100 ml se naváží 10 g vzorku (mléko nebo jiný tekutý mléčný produkt) nebo 1 g sušeného mléka, s přesností na dvě desetinná místa. K navážce vzorku se přidá 25 ml destilované vody, 40 ml wolframanového činidla a obsah baňky se promíchá. Po rozpuštění se přidá 1 ml roztoku kyseliny fosforečné (8,8 %) a 7 ml roztoku kyseliny sírové a baňka se doplní destilovanou vodou po značku, promíchá a obsah baňky se zfiltruje. Do Erlenmayerovy baňky (na 250 ml se zábrusem) se napipetuje 10 ml filtrátu, přidá se 5 ml roztoku jodidu draselného a 20 ml roztoku chloraminu T (připraví se: 0,91 g chloraminu T se

rozpustí v destilované vodě a zředí se na 100 ml). Baňka se uzavře a nechá stát 90 minut v temnu (ve stole) při laboratorní teplotě. Pak se zátka opláchne destilovanou vodou, přidá se 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (2 mol/l) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (0,04 mol/l) do světle žluté barvy. Následně se přidá cca 1 ml roztoku škrobu a roztok se titruje do odbarvení. Stejným způsobem se provede slepý pokus s použitím 10 ml destilované vody místo 10 ml filtrátu.

Vyhodnocení:

Obsah laktosy vyjádřený jako monohydrát laktosy v % se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\text{Obsah laktosy (v \%)} = (V_{bl} - V_{vz}) \cdot 7,2 \cdot F / m_{vz}$$

V_{vz} – spotřeba 0,04 mol/l thiosíranu sodného v ml na vzorek

V_{blk} - spotřeba 0,04 mol/l thiosíranu sodného v ml na slepý pokus

F – korekční faktor na objem sraženiny:

- pro plnotučné mléko 0,992
- pro polotučné mléko 0,994
- pro odstředěné mléko 0,996

m_{vz} – navážka vzorku

Výsledek se vyjádří jako průměr dvou nebo tří stanovení \pm směrodatná odchylka.

1.2.2 Stanovení laktosy v mléce (polarimetricky)

Princip metody:

Polarimetrická metoda se využívá k rychlému stanovení laktózy v mléce, je založena na měření optické otáčivosti laktosy ve vzorku mléka po odstranění bílkovin. Jedná se o rozhodčí metodu dle ČSN 57 0530.

Chemikálie:

Carrezovo činidlo I (150 g hexakynoželesnatanu draselného trihydrátu rozpuštěno v destilované vodě a zředěno na 1000 ml)

Carrezovo činidlo II (300 g síranu zinečnatého heptahydrátu rozpuštěno v destilované vodě a zředěno na 1000 ml)

Pomůcky:

Odměrná baňka, pipety, filtrační nálevka, kádinky, polarimetr

Pracovní postup:

50 ml mléka se odpipetuje do zvážené 100 ml odměrné baňky a baňka se zváží (navážka). Přidá se 5 ml roztoku Carrez I promíchá se a přidá se 5 ml roztoku Carrez II. a opět se promíchá. Poté se odměrná baňka doplní destilovanou vodou po značku. Obsah se promíchá a zfiltruje přes suchý filtr do suché kádinky. Filtrát musí být čirý. Pokud není, je nutno opakovat čiření. Polarimetrické trubice (10 cm) se naplní filtrátem a změří se optická otáčivost.

Vyhodnocení:

Obsah laktosy c v % (w/w) se vypočítá ze vztahu:

$$c = \frac{100 \cdot \alpha \cdot F}{n \cdot [\alpha]_{\lambda}^t \cdot l} \cdot 100$$

kde n je navážka [g], α je optická otáčivost [°], $[\alpha]_{\lambda}^t$ je specifická otáčivost (pro monohydrát laktosy = 52,5°), F je faktor pro objemovou korekci na sraženinu vzniklou vyčiřením, pro polotučné mléko s 2 % tuku $F = 0,965$, l je délka polarimetrické trubice [dm].

Obsah laktosy v mléce se pohybuje v rozmezí 4 – 5 %.

1.3 Stanovení tuku

1.3.1 Stanovení celkového tuku metodou Schmid-Bondzynski-Rafzloff (gravimetricky)

Princip metody:

Materiál se hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou, tuk se z hydrolyzátu vyextrahuje organickým rozpouštědlem a stanoví vážkově. Metoda je vhodná pro stanovení tuku v různých živočišných materiálech a v sýrech.

Chemikálie:

kyselina chlorovodíková, HCl p.a., 25 % roztok

ethanol (je polární, mísí se z vodou)

dichlormethan (nemísí se s vodou a je těžší než voda)

Pomůcky:

Dělička 150 ml, odměrné válce, kádinky, topná deska

Pracovní postup:

5g rozmělněného vzorku se naváží s přesností na tři desetinná místa na celofán do suché baňky s rovným dnem, do které se potom vloží skleněné kuličky nebo kousky porcelánu. Do baňky se přilije 8 - 10 ml 25 % HCl a udržuje se ve vroucí vodní lázni za stálého protřepávání tak dlouho, dokud se vzorek úplně nerozpustí. Probíhá rozklad bílkovin. Baňka se pak nechá ve vroucí lázni ještě asi 20 minut a poté se postupně ochladí na teplotu laboratoře.

Zmineralizovaný vzorek se převede do 100 ml děličky a mineralizační baňka se vypláchne postupně 10 ml ethanolu a 20 ml dichlormethanu a výplachy se vlijí do děličky. Pak se mineralizační baňka vypláchne ještě jednou 20 ml dichlormethanu a výplach se přilije do děličky, uzavře se zátkou a protřepává za současného převrácení po dobu jedné minuty. Dělička se ponechá v klidu tak dlouho, až dolní organická vrstva (obsahující tuk) bude čirá a zřetelně oddělená od vrstvy vodné. Poté se vyjme zátka, opláchne se trochou (cca 2 ml) dichlormethanu tak, aby stékal do děličky. Odpustí se spodní organická vrstva do suché čisté zvážené kádinky s širokým dnem (zvážená na 4 desetinná místa na analytických vahách).

Vodná vrstva se extrahuje dalšími 40 ml dichlormethanu. Protřepávání trvá asi jednu minutu, následně se nechají vrstvy opět oddělit stáním a odpustí se spodní organická vrstva s vyextrahovaným tukem do zvážené kádinky s prvním extrahovaným podílem. Organická vrstva (obsahující vyextrahovaný tuk) ze dvou extrakcí se nechá ve 250 ml zvážené kádince odpařovat v digestoři na topné desce při teplotě 50 - 60 °C. Jakmile je rozpouštědlo odpařeno, baňka se zváží a nechá stát ještě 10 - 20 minut bez zahřívání v digestoři a opět se zváží. Hmotnost by se neměla již výrazněji změnit (sušení do konstantní hmotnosti). Odpařovat se nesmí na vodní lázni zahřívané plynovým kahanem (akutní nebezpečí vznícení par).

Vyhodnocení:

Obsah tuku (v % m/m): **% celkového tuku = $(m_2 - m_1) \cdot 100 / m_{vz}$**

kde m_1 [g] je hmotnost prázdné extrakční baňky, m_2 [g] je hmotnost extrakční baňky s tukem, m_{vz} [g] je navážka vzorku

1.3.2 Stanovení tuku v mléce a mléčných výrobcích podle Röse-Gottlieba

Princip metody:

Podle postupu Röse-Gottlieba se bílkoviny mléka rozpustí v amoniaku, za přídavku ethanolu se tuk vyextrahuje směsí etheru a petroletheru a po odstranění rozpouštědel se stanoví vážkově.

Metoda se hodí pro mléko, neslazené kondenzované mléko, podmásli a syrovátku. Jde o přesnou rozhodčí metodu dle ČSN 57 0530.

Chemikálie:

amoniak NH_3 25 % roztok

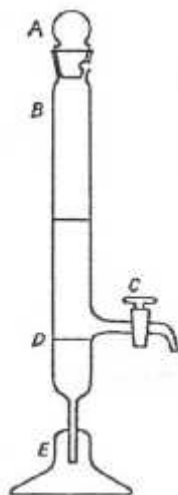
ethanol 96 % roztok

diethylether

petrolether

Pomůcky:

Baňka s rovným dnem a se zábrusem, odměrný válec, kádinka, přístroj k extrakci tuku metodou Röse-Gottlieba (obrázek 1)



Obrázek 1: Přístroj k extrakci tuku metodou Röse-Gottlieba (A – zátka, B – tělo přístroje, C – boční rameno s kohoutem, D – vhodná výška hladiny, E – stojánek)

Pracovní postup:

Ke stanovení se používá speciální extrakční zařízení (viz obrázek 1), do kterého se odváží 10 g vzorku. K obsahu se přidají 2 ml amoniaku, opatrně se protřepe, přidá se 10 ml ethanolu a opět se protřepe. Po - té se přidá 25 ml diethyletheru (prostého peroxidů), extrakční přístroj se uzavře a obsah se promísí minutovým protřepáváním a několikanásobným převrácením. Přidá se 25 ml petroletheru, přístroj se uzavře a opět se promíchává několikerým obracením. Přístroj se nyní nechá 2 hodiny stát, až se vrchní vrstva vyčihí a až se zcela oddělí od vodné vrstvy. Horní vrstva se kvantitativně převede do předem zvážené baňky se zábrusem o obsahu 250 ml s rovným dnem, do níž byl před zvážením vložen kousek pemzy. Extrakce se opakuje ještě dvakrát, vždy s 25 ml diethyletheru a 25 ml petroletheru, a etherová vrstva se vždy převede do zmíněné zvážené baňky. Rozpouštědlo se oddestiluje na elektrické vodní lázni a baňka obsahující tuk se suší buď 1 hodinu v sušárně při teplotě 103 ± 2 °C. Po vysušení se nechá baňka 30 až 60 minut chladnout na vzduchu a váží se do konstantní hmotnosti.

Vyhodnocení:

Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech.

$$\% \text{ celkového tuku} = (m_2 - m_1) \cdot 100 / m_{vz}$$

kde m_1 [g] je hmotnost prázdné extrakční baňky, m_2 [g] je hmotnost extrakční baňky s tukem, m_{vz} [g] je navážka vzorku

1.3.3 Acidobutyrometrické stanovení tuku v mléce podle Gerbera

Princip metody:

Působením kyseliny sírové se rozpustí bílkoviny, hlavně fosfolipidové obaly tukových kuliček mléka, takže se tuk kvantitativně uvolní a oddělí odstředěním. Přídavkem amylalkoholu se dosáhne ostrého rozhraní. Odečte se objem tuku na stupnici butyrometru, který je kalibrován tak, že udává přímo obsah tuku v hmotnostních procentech. Metoda je vhodná pro mléko, pro stanovení tuku ve smetaně nebo v sýru je nutné použít modifikované butyrometry. Metoda butyrometrická je vhodná pouze jako orientační – provozní dle ČSN 57 0530.

Chemikálie:

kyselina sírová H_2SO_4 (Gerberova) 90 - 91% (hustota $1,817 \pm 0,003 \text{ g/cm}^3$ při 20°C)
amylalkohol 98% (hustota $0,808$ až $0,818 \text{ g/cm}^3$ při 20°C , bezvodý)

Pomůcky:

butyrometr (dle ČSN 25 7631), pipeta na mléko - 11 ml (dle ČSN 70 4121), pipeta na kyselinu sírovou ($10 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$), poloautomatická byreta na amylalkohol ($1 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$), odstředivka na butyrometry, vodní lázeň

Pracovní postup:

Ke stanovení je potřeba butyrometr se zátkou. Do butyrometru se pipetou odměří 10 ml kyseliny sírové (Gerberovy) a mléčnou pipetou se po stěně přidá 11 ml mléka tak opatrně, aby se obě kapaliny nesmísily. Poté se opatrně přidá 1 ml amylalkoholu, butyrometr se uzavře pryžovou zátkou a obsah butyrometru se prudce protřepe, až jsou veškeré bílkoviny mléka rozpuštěny a nezůstávají v butyrometru žádné bílé částičky. Potom se obsah butyrometru dobře promísí převrácením butyrometru a posunutím zátky se upraví stav v butyrometru tak, aby hladina sahala až k nejvyššímu dílku stupnice, případně i několik dílků nad poslední rysku. Tím se zajistí, že po odečtení a vytemperování bude celý sloupec tuku v rozmezí stupnice a zamezí se chybám, které mohou vzniknout, je-li tukový sloupec po odstředění příliš posunován. Po protřepání butyrometru se ještě za horka vkládá do odstředivky (zátkou dolů) a odstředí se při 1100 otáčkách za minutu. Jestliže klesne teplota během odstředování u butyrometrů pod 65°C , je nutno butyrometry vložit do vodní lázně a zahřát na 65 až 68°C ,

příčemž hladina vody musí dosahovat až nad horní okraj tukového sloupce, aby veškerý tuk byl rovnoměrně rozehříván na předepsanou teplotu. Butyrometry se vyhřívají po dobu 3 až 5 minut a poté se odečte obsah tuku. Spodní konec tukového sloupce se mírným pohybem zátky posune tak, aby se kryl s nejbližší ryskou, která označuje celé procento tuku a odečte se nejnižší bod menisku tukového sloupce. Při odečítání musí mít tuk opět teplotu $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Odečítá se s přesností poloviny nejmenšího dílku stupnice butyrometru a výsledek se zaokrouhlí na dvě desetinná místa. V kalibrované části stupnice se nesmějí vyskytnout kapky.

Vyhodnocení:

Obsah tuku v g na 100 ml mléka (x) se vypočte podle vztahu

$$x = b - a$$

kde **a** je procento objemové, které odpovídá dolní hladině tukového sloupce butyrometru a **b** je procento objemové, které odpovídá spodnímu menisku horní hladiny tukového sloupce butyrometru.

1.4 Stanovení sušiny a minerálních látek

1.4.1 Vážkové stanovení sušiny – stanovení celkové sušiny a stanovení sušiny mléka výpočtem z hustoty a obsahu tuku

Princip metody:

Podle požadované přesnosti výsledku se obsah sušiny stanovuje vážkově (metodou s pískem (ČSN 570530) nebo bez písku (rozhodčí metoda dle ČSN ISO 6731) a nebo výpočtem (provozní metoda podle ČSN 570530). Obsah celkové sušiny je hmotnostní podíl látek, které zbývají po úplném vysušení vzorku, stanoveným po předsušení zkušebního vzorku ve vroucí vodní lázni a následně odpaření vody v sušárně při teplotě 102 ± 2 °C. Vyjadřuje se v hmotnostních %. Sušina stanovená výpočtem je podíl všech složek mléka kromě volné vody, zjištěný výpočtem z hustoty a obsahu tuku. Vyjadřuje se v g na 100 g mléka.

Chemikálie:

křemenný písek (praný kyselinou chlorovodíkovou, vodou a vyžíhaný)

Pomůcky:

vysoušečka (plochá miska z nekorodujícího materiálu s víčkem výšky 1 cm a průměru 8 až 9 cm), skleněná tyčinka - na jednom konci zploštělá, která se vkládá do vysoušečky, suší-li se mléko s pískem, vodní lázeň, sušárna, exsikátor, analytické váhy

Pracovní postup:

Postup bez použití písku:

Vysoušečka průměru 8 až 9 cm s víčkem se vysuší při 102 ± 2 °C 30 minut. Po vychladnutí v exsikátoru se váží s přesností na 0,0001 g. Do vysoušečky se odpipetují asi 3 ml mléka, mléko se rozlije po celém dně misky, vysoušečka se uzavře víčkem a váží s přesností na 0,0001 g. Vysoušečka se vzorkem bez víčka se ponechá asi 30 minut na vroucí vodní lázni nebo v sušárně při 60 °C a pak se dno osuší a umístí do sušárny vyhřáté na 102 ± 2 °C. Víčko se umístí v sušárně vedle misky. Teplota v sušárně se měří v místě, kde leží misky. Suší se 2 hodiny. Pak se vysoušečka uzavře víčkem a po vychladnutí v exsikátoru se zváží - dvě následující vážení se neliší o více než 0,0005 g, pokud ano, vysoušení se opakuje.

Vyhodnocení:

Obsah celkové sušiny mléka x v % se vypočte podle vzorce:

$$x = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost vysoušečky s víčkem [g], m_1 je hmotnost vysoušečky s víčkem a zkušební vzorkem a m_2 je hmotnost vysoušečky s víčkem a vysušeným podílem mléka [g]

Postup s použitím písku:

Do vysoušečky s vloženou skleněnou tyčinkou se nasype asi 20 g vysoušeného a přečištěného křemenného písku a 30 minut se suší při 102 ± 2 °C. Pak se vysoušečka s pískem vloží do exikátoru a uzavře víčkem. Víčko se při sušení umístí v sušárně vedle misky. Po vychladnutí se zváží s přesností na 0,0001 g. Do vysoušečky se odpipetuje asi 5 ml vzorku, uzavře víčkem, zváží se s přesností na 0,0002 g a dále se postupuje jak výše uvedeno. Během vysoušení se obsah tyčinkou několikrát promíchá, aby se nevytvořil škrálop na povrchu.

Vyhodnocení:

Obsah celkové sušiny mléka x v % se vypočte podle vzorce:

$$x = \frac{c - b}{a - b}$$

kde a je hmotnost vysoušečky s pískem + navážený vzorek mléka v gramech, b je hmotnost vysoušečky s pískem a c je hmotnost vysoušečky + vysušený podíl mléka v gramech

Postup stanovení celkového obsahu sušiny mléka výpočtem:

Obsah tuku mléka se stanoví metodou acidobutyrometrickou dle Gerbera v hmotnostních procentech. Hustota mléka se stanoví metodou laktodenzimetrickou ve stupních laktodenzimetrických ($^{\circ}L_{20}$).

Vyhodnocení:

Obsah celkové sušiny x v % se vypočte podle vzorce:

$$x = 1,21 \cdot t + 0,25 \cdot ^{\circ}L_{20} + 0,82$$

kde t je obsah tuku v hmotnostních procentech (g ve 100 g) a $^{\circ}L_{20}$ stupně laktodenzimetrické při 20 °C

1.4.2 Stanovení vápníku v mléce (titrační metoda)

Princip metody:

Bílkoviny ve vzorku mléka jsou vysráženy kyselinou trichloroctovou a odfiltrovány. Vápník obsažený ve filtrátu je vysrážen jako šťavelan vápenatý a oddělen odstředěním. Po promytí a rozpuštění sraženiny je vápník stanoven titrací manganistanem draselným. Jedná se o rozhodčí metodu podle ISO 12081)

Chemikálie:

kyselina trichloroctová CCl_3COOH $c = 200\text{g/l}$, $c = 120\text{ g/l}$

kyselina octová CH_3COOH 20 %

amoniak NH_3 25 % , (pracovní roztok = 2 ml 25 % roztoku amoniaku ve 100 ml vody)

kyselina sírová H_2SO_4 (20 ml 98 % kyseliny sírové + 80 ml vody)

manganistan draselný KMnO_4 (standardní roztok) $c = 0,004\text{ mol/l} \pm 0,0001\text{ mol/l}$

methyloranž (připravený rozpuštěním 0,05 g ve 100 ml 96 % ethanolu)

Pomůcky:

Byreta, odstředivka, vodní lázeň, pipety, filtrační aparatura, centrifugační zkumavky, odměrná baňka, nálevka, kádinky, titrační baňka

Pracovní postup:

Do 50 ml odměrné baňky se na analytických vahách naváží 20 g mléka a doplní se po rysku roztokem kyseliny trichloroctové o koncentraci 200g/l, protřepe se a nechá se 30 minut stát při laboratorní teplotě. Poté se roztok přefiltruje do kádinky. Do centrifugační zkumavky se napipetuje 5 ml filtrátu, 5 ml roztoku kyseliny trichloroctové o koncentraci 120 g/l, 2 kapky methyloranže a 2 ml kyseliny octové a obsah se tyčinkou promíchá. Potom se po kapkách přidá roztok 25 % amoniaku do žlutého zbarvení a roztok kyseliny octové do slabě růžového zbarvení. Obsah se nechá 4 hodiny stát. Poté se obsah zředí destilovanou vodou a odstředí při 1400 ot./min po dobu 10 minut. Supernatant se opatrně odsaje pipetou, stěny zkumavky se omyjí 5 ml pracovního roztoku amoniaku a odstředí se při 1400 ot./min po dobu 10 minut a ještě jednou se postup zopakuje. Potom se k supernatantu přidají 2 ml kyseliny sírové a 5 ml destilované vody. Ve vařící vodní lázni o teplotě 100 °C se sraženina nechá rozpustit a titruje se standardním roztokem manganistanu draselného do růžového zbarvení, které vydrží 30 s.

Vyhodnocení:

Obsah vápníku **w** se vypočítá:

$$w = 0,0004 \cdot (V - V_0) \cdot \frac{1000 - f}{m} = 0,4 \cdot (V - V_0) \cdot \frac{f}{m}$$

kde **V** je objem roztoku manganistanu draselného spotřebovaného k titraci vzorku [ml], **V₀** je objem roztoku manganistanu draselného spotřebovaného k titraci slepého vzorku [ml], **m** je přesná navážka vzorku [g] a **f** je korekce pro objem sraženiny:

Tabulka 2:

Obsah tuku ve vzorku [%]	korekce f
3,5 - 4,5	0,972
3	0,976
2	0,980
1	0,985
<0,1	0,989

1.4.3 Stanovení vápníku komplexonem

Princip metody:

Vápník se stanoví po zalkalizování mléka 4 mol/l roztokem hydroxidu sodného titrací roztokem komplexonu III za použití vhodného indikátoru. Obsah vápníku se vyjádří v mg na 100 g mléka. Jedná se o provozní metodu podle ČSN 570530)

Chemikálie:

komplexon III (chelaton III = disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrát)

$c = 0,01 \text{ mol/l}$

směsný indikátor = 0,95 g fluorexonu se smísí s 0,05 g fenolftaleinu a 100 g NaCl a dokonale se rozetře v třecí misce, nebo se 1 g murexidu smísí se 100 g NaCl a dokonale se rozetře hydroxid sodný NaOH $c = 4 \text{ mol/l}$

Pomůcky:

odměrná baňka, titrační baňka, pipety, byreta, třecí miska

Pracovní postup:

Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 10 g vzorku mléka, doplní se vodou po značku a baňka se promíchá. 50 ml naředěného vzorku se odpipetuje do titrační baňky, zředí se 100 ml vody, přidá se 5 ml roztoku NaOH a 0,2 g indikátoru. Titruje se roztokem komplexonu III ze zelené fluorescence do světle růžové barvy při použití fluorexonového indikátoru, nebo z růžovofialového zbarvení do fialovomodrého, při použití murexidového indikátoru. Zároveň se provede slepý pokus, kdy se místo mléka nepipetuje 10 ml vody.

Vyhodnocení:

Obsah vápníku x [mg] ve 100g mléka se vypočítá dle vzorce:

$$x = \frac{0,40 \cdot 100 \cdot (b - c)}{a}$$

kde **a** je navážka vzorku v odpipetovaném podílu [g], **b** je množství roztoku 0,01 mol/l komplexonu spotřebovaného při titraci vzorku [ml] a **c** je množství roztoku 0,01 mol/l komplexonu spotřebovaného na titraci slepého vzorku [ml].

(1 ml 0,01 mol/l komplexonu III = 0,40 mg vápníku)

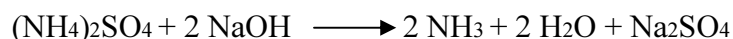
2 VYBRANÉ ANALÝZY MASA A MASNÝCH VÝROBKŮ

2.1 Stanovení a důkaz bílkovin v mase a masných výrobcích

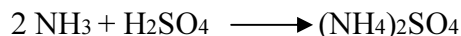
2.1.1 Stanovení dusíku v mase podle Kjeldahla s využitím aparatury podle Parnase - Wagnera

Princip metody:

Dusík organických látek masa je převeden pomocí kyseliny sírové na síran amonný a zároveň při této mineralizaci (kjeldahlizaci) vzniká z vodíku a uhlíku voda a oxid uhličitý a kyselina sírová se redukuje na oxid siřičitý. Mineralizace se urychluje přidávkem síranu draselného (zvýší se teplota varu reakční směsi) a některých katalyzátorů (CuSO₄, HgO, Se, SeO₂). Dusík ve vzniklém síranu amonném se stanovuje destilační metodou. Přídávkem nadbytku NaOH se uvolní amoniak podle reakce:



Uvolněný amoniak se předestiluje s vodní parou do předlohy se známým nadbytečným množstvím standardního roztoku kyseliny, se kterou reaguje podle rovnice:



Nspotřebované množství kyseliny v předloze se zjistí zpětnou titrací standardním roztokem NaOH.

Tato metoda vychází z ČSN 57 0153.

Chemikálie:

hydroxid sodný NaOH 33 %

hydroxid sodný NaOH c = 0,1 mol/l

kyselina sírová H₂SO₄ p.a. 98 %

kyselina sírová H₂SO₄ c = 0,05 mol/l

kyselina sírová H₂SO₄ c = 0,1 mol/l

katalyzátor (připravený: 32 g síranu draselného K₂SO₄ se rozetře s 5 g síranu měďnatého CuSO₄ · 5 H₂O a 1 g selenu)

kyselina boritá H₃BO₃ c = 40 g/l

indikátor Tashiro (připravený: 1g methylenové modři a 2 g methylčerveně se doplní 96 % roztokem ethanolu na 1000 ml)

Pomůcky:

Kjeldahlova baňka, destilační přístroj podle Parnas – Wagnera, odměrné baňky, odměrný válec, kádinky, varné kamínky

Pracovní postup:

Do Kjeldahlovy baňky (250 - 500 ml) se naváží 1 g zhomogenizovaného vzorku masa, přidá se 25 ml koncentrované kyseliny sírové, na špičku nože katalyzátoru a zamíchá. Směs se nejprve zahřívá v digestoři nad mírným plamenem do odstranění základního množství vody a potom při teplotě 360 ± 20 °C tak dlouho, až se roztok vyjasní a odbarví se do čistého tónu. Po vychladnutí na pokojovou teplotu se obsah baňky mírně zředí a kvantitativně převede do destilačního přístroje pro stanovení amoniaku. Alkalizace se provádí přidávkem 40 ml roztoku hydroxidu sodného. Poté se provede destilace uvolněného amoniaku v Parnas-Wagnerově přístroji. Do kuželové baňky, v níž je spodní část chladiče ponořena se odpipetuje 25 ml kyseliny borité a přidají se 2 až 3 kapky indikátoru Tashiro. Destilace je ukončena po 15 minutách od objevení se první kapky v chladiči (od počátku varu). Několik minut (5 minut) před koncem destilace se destilační baňka sníží a konec chladiče se opláchne do předlohy destilovanou vodou. Obsah baňky se titruje odměrným roztokem kyseliny sírové $c = 0,1$ mol/l do zeleného zbarvení. Provede se i slepý pokus, kde se místo navážky vzorku použije destilovaná voda.

Vyhodnocení:

Obsah dusíku x v % se vypočítá:

$$x = \frac{V - V_1}{m} \cdot 0,28$$

kde V je objem kyseliny sírové spotřebované při titraci [ml], V_1 je objem kyseliny sírové spotřebované při titraci slepého pokusu [ml] a m je hmotnost navážky [g].

Obsah bílkovin % se vypočítá:

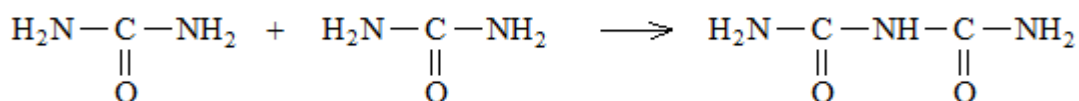
$$\text{obsah bílkovin} = x \cdot 6,25$$

kde x je obsah dusíku a **6,25** je přepočítávací faktor

2.1.2 Důkaz bílkovin biuretovou reakcí

Princip metody:

Principem biuretové reakce je tvorba fialově zbarveného měďnatého komplexu v alkalickém prostředí. Název je odvozen od biuretu, což je kondenzační produkt dvou molekul močoviny. Biuret je nejjednodušší sloučenina, která tuto reakci vykazuje. Biuretovou reakci dávají sloučeniny, které obsahují alespoň dvě skupiny $-\text{CO}-\text{NH}_2$ spojené buď navzájem nebo přes atom dusíku či uhlíku. Reakce je také pozitivní u sloučenin s atomovým seskupením $-\text{CS}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}(\text{NH})-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, $=\text{CH}-\text{NH}-$, také u histidinu, threoninu, serinu a asparaginu. Zbarvení komplexu závisí na délce peptidového řetězce. Citlivost biuretové metody se pohybuje kolem 1 až 10 g bílkoviny/l.



Chemikálie:

pentahydrát síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ $c = 36 \text{ mmol/l}$

vinan sodno-draselný $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ $c = 95 \text{ mol/l}$

hydroxid sodný NaOH $c = 1,8 \text{ mol/l}$

jodid draselný KI $c = 90 \text{ mmol/l}$

Biuretové činidlo: Biuretové činidlo obsahuje síran měďnatý, který poskytuje měďnaté ionty pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami, alkalizující složku - hydroxid sodný, který převede peptidovou vazbu na enolformu, vinan sodno-draselný, který zabraňuje jako komplexotvorná látka srážení Cu^{2+} na $\text{Cu}(\text{OH})_2$ a jodid draselný, který chrání měďnaté ionty před autoredukci.

Pomůcky:

Zkumavky, odměrný válec

Pracovní postup:

K 1 ml vzorku (homogenizovaný vzorek masa nebo masného výrobku) se přidá 1 ml biuretového činidla. Po protřepání v pozitivním případě vznikne fialové zbarvení.

2.1.3 Důkaz bílkovin ninhydrinovou reakcí

Princip metody:

Volné aminoskupiny aminokyselin, peptidů a bílkovin reagují po zahřátí s ninhydrinem za vzniku fialovomodrého zbarvení. Pouze prolin a hydroxyprolin se barví žlutě (aminokyseliny).

Chemikálie: Ninhydrin $c = 0,2 \%$ ethanolový roztok, uhličitan sodný Na_2CO_3 $c = 3 \text{ mol/l}$

Pomůcky: Zkumavky, kapátko, odměrný válec

Pracovní postup:

1 ml homogenizovaného vzorku ve zkumavce se zneutralizuje několika kapkami 3 mol/l Na_2CO_3 , poté se přidá 0,5 ml 0,2 % roztoku ninhydrinu a vloží se do vroucí vodní lázně. V pozitivním případě vzniká fialovomodré zbarvení.

2.1.4 Důkaz bílkovin xanthoproteinovou reakcí

Princip metody:

Aromatické aminokyseliny poskytují reakci s kyselinou dusičnou. Jejich benzenová jádra se nitrují za vzniku žlutých sloučenin. Zbarvení se prohlubuje do oranžova alkalizací roztoku. Fenylalanin tuto barevnou reakci neposkytuje.

Chemikálie:

kyselina dusičná HNO_3 koncentrovaná

hydroxid sodný NaOH $c = 2,5 \text{ mol/l}$,

Pomůcky:

Zkumavky, kapátko, odměrný válec

Pracovní postup:

K 1 ml vzorku ve zkumavce se přidá několik kapek kyseliny dusičné a opatrně se zahřívá. V případě pozitivní reakce vzniká žluté zbarvení nebo sraženina. Po ochlazení se přidá několik kapek 2,5 mol/l NaOH do změny barvy ze žluté do oranžové.

2.1.5 Stanovení hydroxyprolinu (spektrofotometricky)

Princip metody:

Po kyselé hydrolýze bílkovin kyselinou sírovou se hydroxyprolin oxiduje chloraminem T a oxidační produkt (kyselina 3-hydroxy-4-amino-1,3-dienvaleřová) se stanoví spektrofotometricky na základě barevné reakce s *p*-dimethylaminobenzaldehydem za vzniku červeného zbarvení. Hydroxyprolin je charakteristickou aminokyselinou bílkovin pojivové tkáně - kolagenu. Jeho obsah slouží jako ukazatel množství těchto bílkovin. Doporučovaný přepočítávací faktor hydroxyprolinu na bílkoviny pojivové tkáně je 8,00. (Uvedený faktor respektuje i malý podíl kolagenu v nepojivových tkáních zvířat). Metoda je vhodná pro všechny druhy potravinářského materiálu, zvláště živočišného původu.

Chemikálie:

kyselina sířová H₂SO₄ 98 %

zásobní roztok L-hydroxyprolinu c = 500 mg/l

chloramin T, p.a.

isopropanol, p.a.

n-propanol, p.a.

kyselina chloristá HClO₄ p.a. (zředěná 1:6)

p-dimethylaminobenzaldehyd, p.a.

citrátový pufr, pH 6,0

Pomůcky:

Erlenmayerova baňka se zátkou pro mineralizaci, kádinky, odměrný válec, pipety, vodní lázeň, sada zkumavek

Pracovní postup:

Příprava roztoků před vlastním stanovením:

Roztok chloraminu T

Na předvážkách se naváží 0,70 g chloraminu T do 200 ml kádinky s přesností na setinu gramu, rozpustí se ve 12 ml destilované vody, přidá se 12,5 ml *n*-propanolu a 25 ml citrátového pufru.

Barevné činidlo

Na předvážkách se naváží 0,1 g *p*-dimethylaminobenzaldehydu do 25 ml kádinky s přesností na setinu gramu, rozpustí se ve 3,5 ml kyseliny chloristé a přidá se 6,5 ml isopropanolu.

Příprava sady kalibračních roztoků:

Ze zásobního roztoku 4-hydroxyprolinu o koncentraci 500 mg/l se připraví 100ml pracovního roztoku o koncentraci 50 mg/l. Z tohoto pracovního roztoku se připraví do 50 ml odměrných baněk sada kalibračních roztoků hydroxyprolinu obsahujících 0, 1, 2, 3, 5 a 10 mg hydroxyprolinu/l. Do šesti zábrusových zkumavek o objemu 15 - 20 ml se postupně napipetují 2 ml kalibračních standardních roztoků obsahujících 0, 1, 2, 3, 5, 10 mg hydroxyprolinu/l, přidá se 1 ml roztoku chloraminu T a obsah zkumavek se promíchá a nechá stát 20 minut při laboratorní teplotě. Pak se přidá 1 ml barevného činidla, zkumavky se uzavrou a zahřívají se ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Poté se zkumavky nechají 10 minut zchladit a změří se absorbance roztoků při 560 nm proti slepému roztoku = zkumavka obsahující 0 mg hydroxyprolinu/l.

Stanovení hydroxyprolinu ve vzorku (2g vzorku / 100ml):

Do zábrusové zkumavky o objemu 15 - 20 ml se postupně napipetují 2 ml mineralizátu vzorku, přidá se 1 ml roztoku chloraminu T a obsah zkumavky se nechá stát 20 minut při laboratorní teplotě. Poté se přidá 1 ml barevného činidla, zkumavka se uzavře a zahřívá ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu 30 minut společně se sadou kalibračních roztoků. Poté se zkumavky nechají 10 minut zchladit a změří se absorbance roztoku při 560 nm proti blanku. Stanovení se provede paralelně 2 - 3krát.

Vyhodnocení:

Sestaví se kalibrační křivka a vypočte se koncentrace 4-hydroxyprolinu v mg/l ze měřených vzorků hydrolyzátů. Z navážky vzorku pro hydrolýzu se vypočte procentuální obsah 4-hydroxyprolinu v původním vzorku.

Výpočet obsahu hydroxyprolinu:

1. Výpočet obsahu kolagenu v mg

Z hodnot měření kalibračních roztoků se sestrojí graf kalibrační závislosti vynesemím koncentrací (v mg/l) (osa x) a odpovídajících absorbancí (osa y). Z regresní rovnice (závislost absorpance na koncentraci) se získá hodnota koncentrace hydroxyprolinu ve vzorku v jednotkách standardu (mg/l). Tato koncentrace se vynásobí použitým ředěním (50x, 10x, 2x,...) a z navážky vzorku se vypočte množství hydroxyprolinu na 1g vzorku (v mg).

Obsah kolagenu = obsah 4-hydroxyprolinu x 8,00

2. Výpočet obsahu kolagenu v %

Pro výpočet obsahu se použije absorpance pracovního standardního roztoku hydroxyprolinu 0,5 g/l . Výpočet se provede podle vzorce:

- pro ředění 50x: % hydroxyprolinu = $A_{vz} / A_{std} \cdot 0,005 / V_{vz}$
- pro ředění 500x : % hydroxyprolinu = $A_{vz} / A_{std} \cdot 0,05 / V_{vz}$
- pro ředění 5000x : % hydroxyprolinu = $A_{vz} / A_{std} \cdot 0,5 / V_{vz}$

A_{vz} - naměřená absorpance vzorku,

A_{std} - naměřená absorpance standardu (hodnota odpovídající koncentraci 5 mg/l)

V_{vz} -objem vzorku pipetovaný ke stanovení

Obsah kolagenu [%] = obsah 4-hydroxyprolinu [%] x 8,00

Výsledek se uvádí s přesností na jedno desetinné místo.

2.2 Stanovení obsahu soli v masných výrobcích

2.2.1 Stanovení obsahu soli v masných výrobcích (vyluhovací metoda dle Mohra)

Princip metody:

Metoda slouží ke stanovení obsahu soli v potravinách živočišného původu. Obsah chloridů se stanoví titračně roztokem dusičnanu stříbrného za přítomnosti chromanu draselného jako indikátoru. Metoda se řídí normou ČSN 57 0167.

Chemikálie:

standardní roztok chloridu sodného NaCl $c = 0,1 \text{ mol/l}$

odměrný roztok dusičnanu stříbrného AgNO_3 $c = 0,1 \text{ mol/l}$

krystalický NaHCO_3

chroman draselný K_2CrO_4 10 %

indikátorový papírek

Pomůcky:

titrační baňky, odměrná baňka 250 ml, kádinky, odměrný válec, vodní lázeň, byreta, pipety, mixér, filtrační aparatura

Pracovní postup

Příprava vzorku:

Do kádinky se naváží 25 g vzorku masného výrobku, přidá se 100 ml horké destilované vody a vzorek se rozmixováním zhomogenizuje. Vzorek se kvantitativně převede do odměrné baňky o objemu 250 ml a kádinka se vypláchne dalšími 100 ml destilované vody. Směs se promíchá a zahřívá na vodní lázni 15 min. Po ochlazení na pokojovou teplotu se baňka doplní vodou po rysku a obsah baňky se zfiltruje přes skládaný filtr. 20 ml filtrátu se přenesou pipetou do kónické baňky a neutralizuje se několika krystalky hydrogenlithitanu sodného při použití lakmusového papírku. Po neutralizaci se přidá 1 ml chromanu draselného a odměrným válcem 100 ml destilované vody. Titruje se odměrným roztokem dusičnanu stříbrného (0,1 mol/l) do stálého načervenalého zbarvení.

Příprava kalibrační křivky:

Do titrační baňky na 250 ml se napipetuje 5, 10, 15, 20, 25 ml standardního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,1 mol/l. Po přidání 1 ml chromanu draselného a 100 ml destilované vody se titruje roztokem dusičnanu stříbrného ($c = 0,1 \text{ mol/l}$).

Vyhodnocení

Obsah chloridů v přepočtu na chlorid sodný v % vypočítejte podle vzorce:

$$x = \frac{v \cdot M \cdot c}{m} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot 0,1$$

kde v = objem odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

c = koncentrace odměrného roztoku v mol/l

M = molární hmotnost NaCl = 58,45g/mol

V_1 = objem vodného výluhu vzorku v ml

V_2 = objem filtrátu použitého k analýze v ml

m = navážka vzorku v g

Obsah NaCl v g odečtete z kalibrační křivky, přepočtete taktéž na obsah soli ve vzorku.

Výsledky získané z kalibrační křivky a z výpočtu ze vzorce porovnejte.

2.2.2 Stanovení obsahu soli (chloridů) v masě a masných výrobcích (dle Volharda)

Princip metody:

Vzorek masa nebo masného výrobku se nejprve extrahuje horkou vodou a po vysrážení bílkovin je zfiltrován. Po okyselení je přebytek přídavku dusičnanu stříbrného stanoven titrací roztokem thiokyanatanu draselného. Jedná se o metodu dle ČSN ISO 1841-1.

Chemikálie:

thiokyanatan draselný KSCN $c = 0,1 \text{ mol/l}$

síran železito-amonný $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ nasycený roztok (indikátor)

kyselina dusičná HNO_3 $c = 4 \text{ mol/l}$

dusičnan stříbrný AgNO_3 $c = 0,1 \text{ mol/l}$

nitrobenzen nebo nonan-1-ol

trihydrát hexakynoželeznanu draselného $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ $c = 106 \text{ g/l}$

dihydrát octanu zinečnatého $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$

kyselina octová CH_3COOH ledová

reakční činidlo: připraví se rozpuštěním 220 g dihydrátu octanu zinečnatého ve vodě, přidá se 30 ml ledové kyseliny octové a kvantitativně se převede do odměrné baňky na 1000 ml, která se doplní po značku vodou.

Pomůcky:

Odměrné baňky, byreta, pipeta, kónické baňky, vodní lázeň, mlýnek na maso/mixér, filtrační aparatura

Pracovní postup:

Do konické baňky se naváží 10 g dobře zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,001 g. Ke vzorku se přidá 100 ml horké destilované vody a baňka se zahřívá 15 minut ve vroucí vodní lázni. Obsah se občas promíchá. Poté se baňka nechá vychladnout na laboratorní teplotu. Přidají se 2 ml roztoku hexakynoželeznanu draselného a 2 ml reakčního činidla. Po každém přídavku se baňka důkladně promíchá. Baňka se nechá stát 30 minut při laboratorní teplotě a následně se obsah kvantitativně napipetuje do odměrné baňky na 200 ml a doplní destilovanou vodou po rysku. Obsah baňky se promíchá a zfiltruje přes skládaný filtr. Do konické baňky se převede 20 ml filtrátu, přidá se 5 ml 4 mol/l kyseliny dusičné a 1 ml síranu

železito-amonného. Poté se přidá 20 ml roztoku dusičnanu stříbrného a 3 ml nitrobenzenu (nebo nonal-1-olu) a baňka se intenzivně protřepává, aby došlo k vytvoření sraženiny. Následně se obsah baňky titruje thiokyanatanem draselným do stálého růžového zbarvení. Stejně se provede i stanovení slepého pokusu, kde se použije místo 10 g vzorku 10 ml destilované vody.

Vyhodnocení:

Obsah chloridů **x** v hmotnostních % (jako chlorid sodný) ve vzorku se vypočítá:

$$x = 0,05844 \cdot (V_2 - V_1) \cdot \frac{200}{20} \cdot \frac{100}{m} \cdot c = 58,44 \cdot \frac{(V_2 - V_1) \cdot c}{m}$$

kde **x** [%] je obsah chloridů (soli), **V₁** [ml] je objem roztoku thiokyanatanu draselného, **V₂** [ml] je objem roztoku thiokyanatanu draselného použitého při slepém pokusu, **c** [mol/l] je koncentrace roztoku thiokyanatanu draselného a **m** [g] je hmotnost vzorku.

2.2.3 Stanovení obsahu soli v masě a masných výrobcích potenciometrickou metodou

Princip metody:

Obsah soli v masě nebo v masném výrobku se stanoví po digesci s vodou pomocí potenciometrické titrace roztokem dusičnanu stříbrného s použitím stříbrné elektrody. Jedná se o metodu dle ČSN ISO 1841-2.

Chemikálie:

chlorid stříbrný AgCl $c = 0,0856 \text{ mol/l}$ (standardní odměrný roztok)

dusičnan stříbrný AgNO_3 $c = 0,0856 \text{ mol/l}$

kyselina dusičná HNO_3 ředěná 1 : 49 (v/v)

Pomůcky:

kádinky, pipeta, mlýnek na maso/mixér, magnetické míchadlo, pH/mV metr, elektrody (kombinovaná stříbrná nebo indikační stříbrná a referentní)

Pracovní postup:

50,0 g vzorku masa nebo masného výrobku s přesností na 0,1 g se naváží a kvantitativně převede do kádinky o objemu 800 ml, přidá se 450 ml vody a tyčovým mixerem se vzorek homogenizuje. Potom se 50 ml zhomogenizovaného vzorku napipetuje do 250 ml vytárované kádinky a stanoví se přesná hmotnost zkoumaného vzorku. K této navážce se přidá 50 ml zředěné kyseliny dusičné a titruje se za stálého míchání odměrným roztokem dusičnanu stříbrného tak, že celkový přírůstek činí celkem 50 ml. Slepý pokus se provede stejným způsobem, pouze místo 50 g homogenizovaného vzorku se použije 50 ml destilované vody.

Vyhodnocení:

Obsah soli (chloridů) x [%] v hmotnostních procentech se vypočte jako:

$$x = \frac{(V_2 - V_1) \cdot c \cdot 50,58,44}{m_1 \cdot m}$$

kde x [%] je obsah chloridů, vyjádřený jako chlorid sodný v hmotnostních procentech, V_1 [ml] je objem roztoku dusičnanu stříbrného použitého při stanovení, V_2 [ml] je objem roztoku dusičnanu stříbrného použitého při slepém pokusu, c [mol/l] koncentrace roztoku dusičnanu stříbrného, m_1 [g] je hmotnost zkušební vzorku a m [g] je přesná navážka vzorku.

3 VYBRANÉ ANALÝZY ROSTLINNÝCH A ŽIVOČIŠNÝCH TUKŮ

STANOVENÍ TUKOVÝCH ČÍSEL - slouží k charakterizaci vlastností tuku

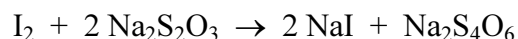
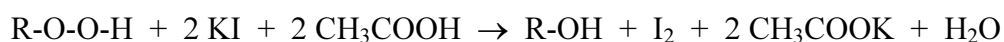
Tabulka 3: Tuková čísla

Ukazatel	Vlastnosti tuků
Peroxidové číslo (stupeň žluklosti tuků)	Obsah polárních látek – tvorba hydroperoxidů
Esterové číslo	Obsah esterově vázaných mastných kyselin
Číslo kyselosti	Obsah volných mastných kyselin
Číslo zmydelnění	Obsah veškerých mastných kyselin
Jodové číslo	Obsah dvojných vazeb
Hydroxylové číslo	Obsah hydroxylových skupin
Anisidinové číslo (stupeň žluklosti tuků)	Obsah aldehydů (epoxidů, cyklických peroxidů, ...)

3.1 Stanovení peroxidového čísla (volumetricky)

Princip metody:

Metoda je založena na oxidaci jodidu draselného peroxidy a hydroperoxydy obsaženými ve vzorku tuku nebo oleje v prostředí kyseliny octové a chloroformu. Uvolněný jod je stanoven titračně odměrným roztokem thiosíranu sodného.



Množství látek, které oxidují jodid draselný za předepsaných podmínek, se vyjadřuje v milimolech aktivního kyslíku (O) na kg (mmol/kg). Toto množství se označuje jako peroxidové číslo (PČ). Reakci ruší přítomnost látek, které mohou rovněž oxidovat jodid na jod, např. kyslík a naopak přítomnost redukujících látek např. antioxidantů. Uvolněný jod se může rovněž částečně adovat na přítomný tuk. Metoda je vhodná pro oxidované tuky s výjimkou tuků oxidovaných při vysoké teplotě.

Chemikálie:

chloroform CHCl_3 p.a.

kyselina octová CH₃COOH ledová, min. 99 %, p.a.

thiosíran sodný Na₂S₂O₃ c = 0,1 mol/l

škrob rozpustný, roztok

nasyčený roztok jodidu draselného KI

Pracovní postup:

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky (se zábrusem) se naváží na celofán 3 g zkušebního vzorku oleje nebo tuku (máslo, sádlo) (s přesností na tři desetinná místa), přidá se 12 ml chloroformu (zkoušený vzorek se rychle rozpustí), 18 ml kyseliny octové a míchá se do úplného rozpuštění. Potom se přidá 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného, baňka se ihned uzavře, roztok se promíchá asi 1 minutu a nechá se stát 20 minut v temném místě při laboratorní teplotě (20 - 25 °C). Následně se přidá 75 ml vody, roztok se pečlivě promíchá a titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného do změny žlutého zbarvení na téměř bezbarvé. Poté se přidá 1 ml indikátoru (škrobového mazu) a pokračuje se v titraci do odbarvení roztoku. Souběžně se provádí za stejných podmínek i slepý pokus (bez tuku), při kterém by spotřeba thiosíranu sodného neměla být větší než 0,2 ml. Při stanovení zabarvených nebo slabě nažloutlých roztoků přidáváme roztok škrobu před začátkem titrace.

Vyhodnocení:

Peroxidové číslo (PČ) se vyjádří v milimolech aktivního kyslíku, tj. uvolňujícího z jodidu jod, ($\frac{1}{2}$ O₂) na 1 kg vzorku:

$$P\check{C} = (V_1 - V_0) \cdot c / m_{vz}$$

kde V₁ [ml] je spotřeba odměrného roztoku 0,1 M Na₂S₂O₃ při vlastním stanovení, V₀ [ml] je spotřeba odměrného roztoku 0,1 M Na₂S₂O₃ při slepém pokusu, c [mol/l] je koncentrace použitého thiosíranu sodného v mmol/l a m_{vz} [g] je navážka zkoušeného vzorku.

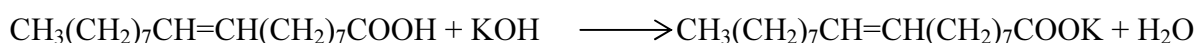
Výsledek stanovení je aritmetický průměr výsledků několika souběžných stanovení aktivního kyslíku (O) mmol/kg s přesností na jedno desetinné místo.

Maximální přípustná hodnota PČ tuku je 10 mmol ($\frac{1}{2}$ O₂)/kg. Tuk vysoké jakosti < 2 mmol($\frac{1}{2}$ O₂)/kg a zcela čerstvý tuk (olej) < 0,5 mmol ($\frac{1}{2}$ O₂)/kg.

3.2 Stanovení čísla kyselosti

Princip metody:

Číslo kyselosti udává počet mg KOH potřebný na neutralizaci volných organických kyselin v 1 g tuku. Tuk se rozpustí v ethanolu a za horka se titruje hydroxidem draselným na fenolftalein. Číslo kyselosti tuků stanoví stupeň hydrolytického štěpení tuků, resp. uvolnění mastných kyselin, ke kterému dochází při stárnutí tuků. Neutralizace volné kyseliny olejové probíhá dle rovnice:



Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 328/1997 Sb. smí být u rostlinných jedlých tuků a olejů maximálně číslo kyselosti 0,6 mg KOH/g, pro vepřové sádlo maximálně 1,2 mg KOH/g, pro výběrové vepřové sádlo max. 1,3 mg KOH/g pro vepřové sádlo 2,5 mg KOH/g.

Chemikálie:

ethanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 98% (neutralizovaný na fenolftalein)

hydroxid draselný KOH $c = 0,1 \text{ mol/l}$

fenolftalein

Pomůcky:

Titrační baňky, odměrný válec, byreta, nálevka, celofán, vodní lázeň

Pracovní postup:

Na celofán se naváží 5 - 10 g vzorku rostlinného nebo živočišného tuku, vloží se do titrační baňky a nechá se rozpustit ve vodní lázni. Přidá se 10 ml ethanolu, 3 kapky fenolftaleinu a za horka se co nejrychleji titruje 0,1 mol/l roztokem KOH do růžovofialového zbarvení, které vydrží po dobu 30 s. Stanovení vzorku se provede ve 3 opakováních. Zároveň se provede slepý pokus, kdy se použije místo navážky vzorku stejné množství rozpouštědla (ethanolu).

Vyhodnocení:

Číslo kyselosti $\check{C}K$ [mg KOH/g] se vypočte ze vztahu:

$$\check{C}K = 5,611 \cdot f \cdot \frac{V_2 - V_1}{m}$$

kde V_2 [ml] je spotřeba 0,1 mol/l KOH, V_1 [ml] je spotřeba KOH na slepý pokus, m [g] je

navážka vzorku a f je korekční faktor $f = \frac{c_{\text{standardizovaná}}(\text{KOH})}{c_{\text{teoretická}}(\text{KOH})}$

3.3 Stanovení čísla zmýdelnění

Princip metody:

Číslo zmýdelnění udává počet mg KOH potřebných ke zmýdelnění (neutralizaci volných a estericky vázaných mastných kyselin) 1 g tuku. Vzorek se vaří pod zpětným chladičem s 0,5 mol/l ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a jeho přebytek se titruje standardním odměrným roztokem 0,5 mol/l kyseliny chlorovodíkové na fenolftalein. Tento postup vychází z ČSN 58 8763.

Chemikálie:

ethanolický roztok hydroxidu draselného KOH $c = 0,5 \text{ mol/l}$

kyselina chlorovodíková HCl $c = 0,5 \text{ mol/l}$

fenolftalein (1 %ní roztok fenolftaleinu v ethanolu)

Pomůcky:

varná baňka se zábrusem, zpětný chladič, topné hnízdo, varné kamínky, odměrný válec, byreta, nálevka, pipety, kádinky, odměrné baňky

Pracovní postup:

Do varné baňky se naváží s přesností na 0,001 g přibližně 1,5 - 2 g vzorku živočišného nebo rostlinného tuku, přidá se 25 ml 0,5 mol/l roztoku KOH a několik varných kamínků. Zmýdelnění probíhá 30 minut pod zpětným chladičem na topném hnízdě. Po zmýdelnění musí být roztok čirý. Do horkého roztoku se přidají 3 kapky fenolftaleinu a nadbytek KOH se titruje 0,5 mol/l HCl z růžového zbarvení do odbarvení. Stanovení se u každého vzorku provede 3krát. Zároveň se zjistí spotřeba KOH na slepý pokus tak, že se vynechá zkušební vzorek, směs se nevaří pod zpětným chladičem, pouze se zahřeje k varu a následně se titruje roztokem HCl.

Vyhodnocení:

Číslo zmýdelnění $\check{C}Z$ [mg KOH/g] vzorku se vypočte podle vztahu:

$$\check{C}Z = \frac{(V_2 - V_1) \cdot c \cdot f \cdot 56,1}{m},$$

kde V_2 [ml] je spotřeba odměrného roztoku HCl na slepý pokus, V_1 [ml] je spotřeba odměrného roztoku HCl na vlastní stanovení, c [mol/l] je koncentrace odměrného roztoku HCl, f je faktor odměrného roztoku HCl a m [g] je hmotnost zkušební vzorku.

3.4 Stanovení esterového čísla

Esterové číslo udává počet mg KOH potřebných na zmýdelnění esterů obsažených v 1 g tuku. Vypočítá se z rozdílu čísla zmýdelnění a čísla kyselosti.

$$\text{esterové číslo} = \text{číslo zmýdelnění} - \text{číslo kyselosti}$$

Vynásobením esterového čísla faktorem 0,547 se vypočte obsah vázaného glycerolu v tuku (v mg/g).

3.5 Stanovení jodového čísla

Princip metody:

Jodové číslo je definováno jako množství (%) halogenu přepočítaného na jód, vázaného na zkoumaný vzorek tuku za podmínek metody. Jodové číslo (JČ) je mírou obsahu dvojných vazeb, tedy charakterizuje obsah nenasycených mastných kyselin. Na dvojných vazbách nenasycených mastných kyselin se váže halogen a jeho nespotřebované množství se stanoví titrací thiosíranem sodným. Lze ho proto použít pro zjištění původu a kvality tuku. Na tuk rozpuštěný v chloroformu se působí jódmonobromidovým roztokem v kyselině octové se známou koncentrací halogenu (Hanušovo činidlo). Jodové číslo může sloužit ke zjištění původů tuků (sádla, loje), nebo zda již došlo k oxidaci. Oleje, které mají JČ nad 150 se řadí mezi vysychavé, oleje s JČ od 100 do 150 jsou polovysychavé a oleje s JČ pod 100 jsou nevysychavé. Tato metoda je uvedena v ČSN EN ISO 3961.

Chemikálie:

jódmonobromidový roztok (Hanušovo činidlo) $c = 0,1 \text{ mol/l}$

thiosíran sodný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ $c = 0,1 \text{ mol/l}$

jodid draselný KI 10 %ní roztok

kyselina sírová H_2SO_4 2 mol/l

chloroform

škrobový maz

Pomůcky:

Zábrusové baňky, filtrační aparatura, odměrný válec, pipety, odměrné baňky, byreta, nálevka, Erlenmayerova baňka se zátkou, kádinky

Pracovní postup:

Do zábrusové Erlenmayerovy baňky se naváží s přesností na 0,0001 g 1 – 10 g vzorku tuku, přidá se 25 ml chloroformu a nechá se rozpustit. Poté se přidá 25 ml Hanušova činidla, roztokem KI se zvlhčí zátka, aby se zadržel unikající jód, baňka se uzavře, obsah se zamíchá a uloží se do tmy na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté se přidá 20 ml 10 % roztoku jodidu draselného, zátka se opláchne vodou a přidá se 100 ml vody. Titruje se 0,1 mol/l odměrným roztokem thiosíranu sodného do oranžového (oranžovo - žlutého) zbarvení. Přidá se 1 ml

škrobového mazu a titruje se z modrého zbarvení až do odbarvení. Současně se provede slepý pokus a to tak, že se místo 10 g vzorku použije 10 ml destilované vody.

Vyhodnocení:

Jodové číslo **JČ** je dáno vztahem:

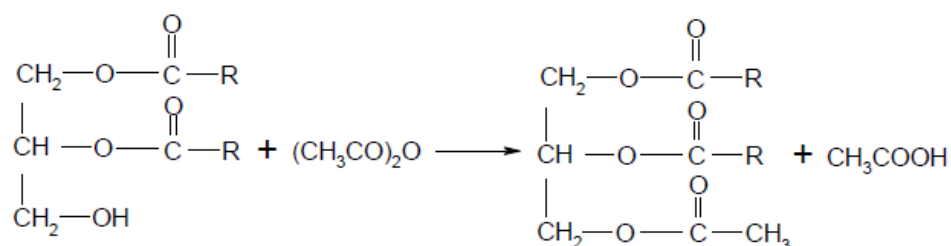
$$\mathbf{J\check{C}} = \frac{(\mathbf{V_2} - \mathbf{V_1}) \cdot \mathbf{f} \cdot \mathbf{c} \cdot \mathbf{12,692}}{\mathbf{m}}$$

kde je $\mathbf{V_2}$ [ml] je spotřeba odměrného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na slepý pokus, $\mathbf{V_1}$ [ml] je spotřeba odměrného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na vlastní stanovení, \mathbf{f} je faktor odměrného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, \mathbf{c} [mol/l] je koncentrace odměrného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a \mathbf{m} [g] je navážka zkušebního vzorku.

3.6 Stanovení hydroxylového čísla

Princip metody:

Hydroxylové číslo je definováno jako počet mg KOH ekvivalentních kys. octové, která reaguje s volnými OH skupinami v 1 g tuku. Stanovuje se acetylací pomocí acetanhydridu. Parciální estery glycerolu obsažené v tucích se acetylují acetanhydridem. Acetylovaný tuk se oddělí od acetanhydridu a octové kyseliny extrakcí hexanem a promytím organické fáze vodou. V acetylovaném vzorku se stanoví číslo zmydlnění. Hydroxylové číslo se vypočte jako rozdíl čísel zmydlnění acetylovaného a původního tuku. Jedná se o metodu podle ČSN 58 8791.



Chemikálie:

ethanol

hydroxid draselný KOH c = 0,5 mol/l

acetylační činidlo (acetaldehyd + Lewisova kyselina)

Pomůcky:

zábrusová baňka, odměrný válec, pipety, destilační aparatura se zpětným chladičem, vodní lázeň,

Pracovní postup:

Do 25 ml zábrusové baňky se diferenčně odváží 1 – 1,5 g oleje (s přesností na 0,0001 g), který se rozpustí v přesně 2 ml acetylačního činidla. Po rozpuštění se nasadí baňka na zpětný chladič a zahřívá se 1 hodinu na vroucí vodní lázni. Potom se přidá přes chladič 1 ml dest. vody a obsah se ještě 10 minut zahřívá. Po ochlazení se chladič i zábrus opláchnou asi 5 ml neutrálního ethanolu a obsah baňky se kvantitativně převede do titrační baňky (vypláchnout neutrálním ethanolem). Roztok se titruje 0,5 M alkoholickým KOH na fenolftalein do růžového zbarvení. Stejně se provede slepý pokus (bez vzorku).

Výpočet:

$$\mathbf{H\check{C}} = \frac{(\mathbf{a} - \mathbf{b}) \cdot \mathbf{c}_{\mathbf{KOH}} \cdot \mathbf{M}_{\mathbf{KOH}}}{\mathbf{m}}$$

kde **a** [ml] je spotřeba 0,5 M KOH při slepém pokusu, **b** [ml] je spotřeba 0,5 M KOH při vlastním stanovení, **c_{KOH}** [mol.l⁻¹] je přesná koncentrace 0,5 M KOH, **M_{KOH}** je molární hmotnost KOH (= 56,106 g.mol⁻¹), **m** [g] je navážka oleje.

3.7 Stanovení anisidinového čísla

Princip metody:

Anisidinové číslo a peroxidové číslo slouží k posuzování kvality olejů. Anisidinové číslo měří množství aldehydů, hlavně 2-alkenalů. Žluknutím oleje se zvyšuje podíl nenasycených kyselin a tedy i aldehydů. Dlouhodobým skladováním a opakovaným tepelným používáním olejů se hodnota anisidinového čísla zvyšuje. Anisidinové číslo je stonásobek nárůstu absorpance měřeného roztoku při vlnové délce 350 nm v 10 mm kyvetě po reakci s p-anisidinem za podmínek stanovených metodou. Metoda vychází z ČSN EN ISO 6885.

Chemikálie:

2,2,4-trimethylpentan (isooktan)

kyselina octová CH_3COOH (ledová)

Anisidinové činidlo (čerstvě připravené: 0,0625 g p-anisidinu se rozpustí a doplní ledovou kyselinou octovou v 25 ml odměrné baňce)

Pomůcky:

odměrná baňka 25 ml, zkumavky, pipety, spektrofotometr, kyvety (skleněné)

Pracovní postup:

Do 25 ml odměrné baňky se naváží 7 g přesušeného vzorku (pevný vzorek je vhodné zahřát 10°C nad bod tání). Přidá se 10 ml 2,2,4-trimethylpentanu, po rozpuštění se doplní stejným rozpouštědlem po rysku a promíchá se (zkušební roztok). Do zkumavky se odpipetuje 5 ml zkušební roztoku a přidá se 1 ml anisidinového činidla. Obsahem zkumavky se důkladně protřepe a zkumavka se umístí do tmy na 8 minut. Poté se roztok převede do kyvety a po 10 minutách se změří absorpance (ve skleněné kyvetě) při 350 nm na spektrofotometru proti 2,2,4-trimethylpentanu jako blanku. Pro výpočet je nutné také změřit absorpanci slepého pokusu, kdy se do zkumavky odpipetuje 5 ml 2,2,4-trimethylpentanu a přidá se 1 ml anisidinového činidla a absorpanci nezreagovaného zkušební roztoku.

Vyhodnocení:

Anisidinové číslo ($A\check{C}$) se vypočte podle níže uvedeného vzorce:

$$A\check{C} = \frac{25 [1,2(A_1 - A_2) - A_0]}{m}$$

kde A_0 je absorbance nezreagovaného zkušebního roztoku změřená proti 2,2,4-trimethylpentanu,

$1,2$ je faktor zohledňující různé objemy pro stanovení absorbance, A_1 je absorbance zreagovaného zkušebního roztoku změřená proti 2,2,4-trimethylpentanu, A_2 je absorbance slepého pokusu změřená proti 2,2,4-trimethylpentanu a m hmotnost zkušebního vzorku v g.

Výsledkem je aritmetický průměr anisidinového čísla zjištěný ze dvou souběžných stanovení.

3.8 Extrakce a identifikace mastných kyselin v tucích a olejích

Princip metody:

Přírodní tuky a oleje jsou tvořeny triacylglyceroly s různým zastoupením nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin, které je typické pro určitý živočišný nebo rostlinný tuk nebo olej. U potravinářsky používaných živočišných tuků sádla a mléčného tuku a u některých rostlinných tuků, jako kokosového, palmového a kakaového, převažují obvykle nasycené mastné kyseliny. U rostlinných olejů převažují obvykle polynenasycené mastné kyseliny. Pro extrakci a izolaci mastných kyselin z oleje nebo tuku musí být rozrušena esterová vazba, např. zmýdlením (triacylglyceroly jsou přeměněny na glycerol a draselnou sůl mastných kyselin). Pro izolaci draselných solí mastných kyselin z glycerolu musí být zmýdlená směs okyselená. Následně mohou být mastné kyseliny extrahovány pomocí organického rozpouštědla. Pro identifikaci mastných kyselin musí být přeměněny na jejich methylestery. Methylestery mastných kyselin mohou být separovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) a identifikovány srovnáním jejich rychlosti migrace (R_f hodnoty) k R_f hodnotám referenčních vzorků methylesterů různých mastných kyselin.

Chemikálie:

methyl palmitát, methyl linoleát, methyl oleát

petrolether (b.v. 30-60 °C) nebo jiné organické rozpouštědlo

hydroxid draselný KOH v ethanolu

kyselina chlorovodíková HCl koncentrovaná

síran sodný bezvodý Na_2SO_4

hexan, diethylether, methanol

chlorid sodný NaCl nasycený roztok

kyselina octová CH_3COOH koncentrovaná

Pomůcky:

kádinky, pipety, nálevky, dělicí nálevky, chromatografická vana, silikagelová fólie, vata, skleněné nanášecí kapiláry, topná deska, sušárna

Pracovní postup:

Příprava methylesterů:

Vysušení směsi solí mastných kyselin: skleněná nálevka se umístí do držáku, z vaty se udělá zátká (velikosti hrachu) a vloží se do horní části stopky nálevky. Do nálevky se na vatou nasype 1 - 2 lžičky bezvodé soli Na_2SO_4 nebo Na_2CO_3 a sůl se prolíje cca 5 ml použitého organického rozpouštědla. Protečený roztok rozpouštědla se odstraní. Přelije se petroletherový extrakt přes sůl v nálevce a filtrát se jímá do kádinky. Poté je sůl propláchnuta ještě 2 ml organického rozpouštědla. Organické rozpouštědlo se odpaří v digestoři na topné desce při 60 – 80 °C.

Syntéza methylesterů mastných kyselin:

V malé kádince nebo zkumavce se smíchá 3,25 ml 6,0 M HCl a 2,75 ml methylalkoholu. Do zkumavky se dá cca 50 mg vzorku tuku a přidají se 2 ml tohoto roztoku. Zkumavka se zazátkuje a směs dobře protřepe. Pak se zkumavka zahřívá na vodní lázni (kádinka s vodou nad plynovým kahanem) na 80 °C po dobu 10 ± 1 min) a pak se ochladí. Přidají se 2 ml diethyletheru, zkumavka se protřepe a nechá stát 1 minutu. Přidá se 5 ml nasyceného roztoku NaCl, protřepe se a stáhne horní vrstva obsahující methylestery. Methylestery se zkoncentrují odpařením.

Identifikace mastných kyselin:

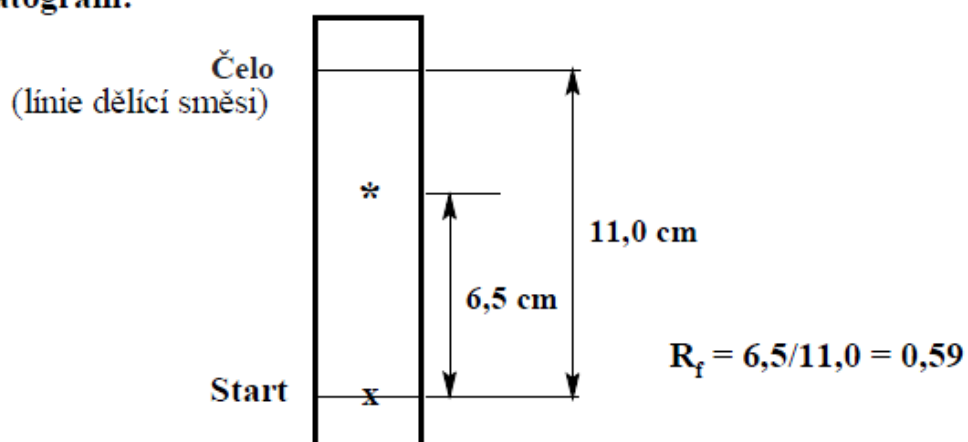
Připraví se silufolová fólie (cca 15x 6,5 cm) pro provedení TLC. Folie je uchopuje pouze za okraje, nedotýkat se prsty dělicí vrstvy. Před použitím se nechá fólie vysušit v sušárně (cca 80 °C, 10 min). Měkkou tužkou se udělá podle pravítka cca 3 cm od spodního okraje startovní linii a označí se cca 4 startovní místa na polovinu fólie. Připravené zahuštěné vzorky esterů mastných kyselin a srovnávací estery mastných kyselin (standardy) (stearové, olejové a linolové, jsou-li k dispozici) se na folii nanášou kapilárou. Pro každý vzorek se použije nová nanášecí kapilára. Skvrny o průměru cca 2-5 mm se vysuší foukáním nebo infračervenou lampou. Do chromatografické vany se nalije cca 50-100 ml vyvíjecí směsi (mobilní fáze) petrolether+diethylether+octová kyselina (80:20:1) nebo hexan+diethyl ether (4:1) (výška hladiny cca 1 cm). TLC fólie se umístí do chromatografické vany vertikálně a nádoba se zakryje sklem. Když mobilní fáze dostoupí do 2/3 výšky fólie, vyvíjení se ukončí. Fólie se vyndá, měkkou tužkou se označí čelo chromatogramu a deska se usuší pod lampou v digestoři nebo v sušárně. Poté se fólie vloží do jiné skleněné vany s několika krystaly jodu a

vana se zakryje a nechá 3 - 4 minuty reagovat. Pozor, nevdechovat výpary jodu! Pak se folie vyndá a označí se tužkou skvrny obtažením. Barví se jen skvrny polynenasycených mastných kyselin.

Vyhodnocení:

Vypočítají se retenční faktory R_f hodnoty pro jednotlivé skvrny (vzdálenost skvrny od startu/vzdálenost čela rozpouštědla od startu).

TLC chromatogram:



Nanášení vzorků:



Obrázek 2: TLC Chromatogram

4 VYBRANÉ ANALÝZY MOUKY A PEKAŘSKÝCH VÝROBKŮ

4.1 Stanovení škrobu (polarimetricky)

Princip metody:

Škrob se převede v rozpustnou formu působením kyseliny chlorovodíkové a stanoví se polarimetricky. Metoda je použitelná pro běžné potravinářské suroviny a potraviny obsahující škrob.

Chemikálie:

Kyselina chlorovodíková, HCl, 1,13 % roztok

Carrezovo činidlo I (150 g hexakynoželeznatanu draselného trihydrátu rozpuštěného v destilované vodě a zředěný na 1000 ml)

Carrezovo činidlo II (300 g síranu zinečnatého heptahydrátu rozpuštěného v destilované vodě a zředěný na 1000 ml)

Lugolovo činidlo (0,2 g jodu rozpuštěno ve 100 ml 2 % roztoku jodidu draselného)

Pomůcky:

hodinové sklo, pipety, odměrný válec, kapátko, kádinky, filtrační aparatura

Pracovní postup:

Důkaz škrobu:

Na hodinové sklo je nanášeno malé množství vzorku, rozetřeno do tenké vrstvy a přidá se několik kapek Lugolova činidla. Jestliže se objeví tmavě modré zbarvení, je ve vzorku přítomen škrob, pak je následně možné provést stanovení škrobu.

Stanovení škrobu:

Do 100 ml Erlenmayerovy baňky se naváží 5 g vzorku s přesností na dvě desetinná místa. K navážce vzorku se přidá 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (1,13 %) a obsah baňky se důkladně promíchá. Stěny se spláchnou dalšími 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (1,13 %), baňka se vloží do vroucí vodní lázně a zahřívá se 15 minut. Během prvních 3 minut se obsah baňky míchá a při dalším zahřívání se občasně promíchá. Po vyjmutí baňky z vodní lázně se přidá 20 ml destilované vody a roztok se ochladí.

Pipetou se přidá 10 ml Carrezova roztoku I a 10 ml Carrezova roztoku II, roztok se vyčistí. Obsah Erlenmayerovy baňky se kvantitativně přelije do 100 ml odměrné baňky, Erlenmayerova baňka se vypláchne cca 5 ml destilované vody a výplach se přelije do odměrné baňky. Odměrná baňka se doplní destilovanou vodou po značku, promíchá se a zfiltruje. Prvních 5 – 10 ml filtrátu se vylije. Filtrát se změří v polarizační trubici délky 20 cm s použitím žlutého sodíkového světla o vlnové délce 589,3 nm. Odečte se minimálně 5 hodnot a vypočítá se průměrný úhel otočení.

Vyhodnocení:

Koncentrace škrobu v g/100ml se vypočítá dle vztahu:

$$c = (100 \cdot \alpha) / (l \cdot [\alpha]_D^t)$$

kde α je průměrná hodnota odečtených stupňů, l délka trubice v dm a $[\alpha]_D^t$ specifická otáčivost škrobu při teplotě 20°C za použití sodíkového světla ($\lambda = 589,3$ nm) pro pšeničný 182,6; žitný 183,9; ječný 181,3; ovesný 181,1; kukuřičný 184,5; rýžový 185,7; bramborový 195,3; amarantový 193,6; neznámý 183,3.

Nalezená koncentrace se přepočítá na navážku a vypočítá se procentický obsah škrobu ve vzorku.

Obsah škrobu v zrninách a bramborách (%): pšenice 59-72, žito 52-57, ječmen 52-62, oves 40-56, rýže 70-80, kukuřice 65-75, fazole 46-54, brambory 17-24

4.2 Stanovení lepku

Princip metody:

Lepek je pšeničná bílkovina, jejímiž hlavními složkami jsou bílkoviny gliadin a glutenin. Je nerozpustný ve vodě a je to zbytek po vyprání připraveného těsta vodou.

Chemikálie:

chlorid sodný NaCl 2 % roztok

Pomůcky:

porcelánová miska, kádinka, hodinové sklo

Pracovní postup:

Naváží se 10 g vzorku s přesností na 0,01 g a zadělá se 2% roztokem NaCl na těsto. Z tohoto těsta se uhněte kulička, která se nechá půl hodiny ležet přikrytá v misce hodinovým sklem. Tato kulička těsta se pak vypírá na dlani ruky proudem vody (18 °C) cca 10 minut. Lepek je vyprán, když odtékající voda je čirá. Lepek má žvýkačkovou konzistenci. Vypraný lepek se dosuší mezi prsty a zváží se na hodinovém skle jako tzv. mokrý lepek.

Vyhodnocení:

Hmotnost lepku se vyjádří v hmotnostních %, která se přepočtou na obsah mokrého lepku v sušině.

5 VYBRANÉ ANALÝZY NÁPOJŮ

5.1 Vybrané analýzy čaje a kávy

5.1.1 Izolace kofeinu z čaje nebo kávy

Princip metody:

Kofein je purinový derivát patřící k alkaloidům, který se spolu s dalšími, jako je theobromin a theofilin, nachází v kávě, čaji a kakau. Metoda využívá výhodu rozpustnosti dané látky určitým rozpouštědlem. V tomto případě je kofein dobře rozpustný v horké vodě a je tak snadno separovatelný od celulosy, která tvoří hlavní složky čaje a kávy. Horkou vodou se však také rozpouštějí taniny, vysokomolekulární látky s kyselými vlastnostmi. Ty tvoří s bazickými látkami, jako např. jako Na_2CO_3 sůl, která je rozpustná ve vodě, ale nerozpustná v organických rozpouštědlech, jako chloroform nebo dichlormethan. Kofein je poměrně dobře rozpustný v organickém rozpouštědle dichlormethanu. Proto kofein může být extrahován z roztoku čaje pomocí dichlormethanu, kdežto sodné soli taninu zůstávají nerozpustné ve vodném roztoku. Odpařením dichlormethanového extraktu tak získáme hrubý kofein, který může být dočištěn sublimací.

Chemikálie:

dichlormethan (je hořlavý a těžší než voda)

uhličitan sodný, bezvodý, Na_2CO_3

síran sodný, bezvodý, Na_2CO_3

Pomůcky:

kádinky, odměrný válec, topná deska, lodička, lžička, děličky, Erlenmayerova baňka, filtrační aparatura, tyčinka, hodinové sklo

Pracovní postup:

Do kádinky o objemu 150 - 250 ml se naváží 5 - 7 g kávy nebo čaje a zalije se 50 ml destilované vody a přidají se 2 g bezvodého uhličitanu sodného. Kádinka se zakryje hodinovým sklem, opatrně se zahřívá na síťce nad kahanem s mírným plamenem a udržuje se při mírném varu **20 minut**. Horký extrakt se zfiltruje do 100 ml Erlenmayerovy baňky a

vychladí se na laboratorní teplotu. Vychlazený extrakt se přelije do 150 ml děličky umístěné na stojanu. Opatrně se přidá **50 ml** dichlormethanu do děličky a zazátkuje se. Pak se dělička vytáhne ze stojanu, uchopí se jednou rukou za hrdlo se zátkou a druhou rukou za výtokovou stopku u kohoutku. Obsah děličky se opakovaným převrácením a opatrným protřepáváním promíchá. Podle potřeby se vzniklé plyny při převrácení v děličce vypustí pootočením kohoutku. Dělička se vsune zpět do držáku stojánku. Po několika minutách se vytvoří dvě oddělené vrstvy: vrchní vodná a spodní vrstva organického rozpouštědla (obsahuje kofein). Vytvoří-li se emulze, může být odstraněna jemným mícháním obsahu nebo jemným mícháním emulze skleněnou tyčinkou. Opatrně se vypustí spodní vrstvu kohoutkem do 100 ml kádinky nebo Erlenmayerovy baňky. Pak se přidá do děličky ještě cca 20 ml dichlormethanu a znovu se obsah promíchá. Obsah děličky se opět nechá oddělit na vrstvy a opět se odpustí spodní vrstva s kofeinem do kádinky. Přidá se 0,5 g bezvodého síranu sodného do roztoku kofeinu a obsah se promíchá. Bezvodá sůl naváže přítomné poslední zbytky vody avšak se nerozpustí. Do předem zvážené 250 ml kádinky se širokým dnem se roztok dichlormethanu s kofeinem zfiltruje. Zbytek soli se spláchne na filtrační papír 2 ml dichlormethanu. Dichlormethan se odstraní odpařením pomocí opatrného zahřívání v digestoři **na topné desce** při 50 - 60 °C (aby roztok nezpěnil). Kádinka s hrubým kofeinem se zváží a vypočítá se jeho hmotnost a procentický výtěžek.

Pracovní postup pro izolaci kofeinu z kolových a energetických nápojů:

Do kádinky o objemu 150 - 250 ml se odměří odměrným válcem 50 ml nápoje. Pokud se jedná o sycený nápoj, je nutné mícháním tyčinkou CO₂ nejprve odstranit. Nápoj se kvantitativně převede do děličky o objemu 150 ml. Opatrně se přidá 50 ml dichlormethanu do děličky a zazátkuje se. S děličkou pracujeme stejně jako v předchozím případě. Spodní vrstva s kofeinem se odpustí do kádinky na 250 ml (zvážené na 4 desetinná místa). Poté se opět přidá 50 ml dichlormethanu do děličky a zazátkuje se. Po protřepání se spodní vrstva také vypustí do kádinky s dichlormethanem, který se nechá odpařit na topné desce.

Vyhodnocení:

$$\text{Obsah kofeinu (v \% m/m): \% celkového kofeinu} = (m_2 - m_1) \cdot 100 / m_{vz}$$

kde m_1 je hmotnost prázdné extrakční baňky v g, m_2 je hmotnost extrakční baňky s tukem v g a m_{vz} je navážka vzorku v g.

5.1.2 Stanovení obsahu tříslovin v čaji podle Edera

Princip metody:

Třísloviny v čaji jsou definovány jako směs polyfenolických látek. Jedná se o rozpustné, svíravé látky, široce distribuované v rostlinných tkáních, které přispívají barvě, aroma a trpké chuti čajového nálevu. Třísloviny se srážejí roztokem octanu měďnatého. Z obsahu mědi ve sraženině (gravimetrické stanovení) se stanoví obsah tříslovin.

Chemikálie:

octan měďnatý $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5 %ní roztok

kyselina dusičná HNO_3 koncentrovaná

Pomůcky:

odměrný válec, žíhací kelímek, odsávací baňka, Büchnerova nálevka, muflová pec, filtrační aparatura

Pracovní postup:

Do úzké kádinky se naváží 2 g vzorku s přesností na 0,001 g, přidá se 100 ml horké vody a obsah se udržuje 1 hodinu při varu za občasného doplňování vyvřené vody. Potom se roztok zfiltruje do kádinky na 800 ml. Vyváření čaje se opakuje ještě dvakrát po půl hodině se 100 ml horké vody. Vývary čaje se pokaždé hned zfiltrují a ve spojených filtrátech se třísloviny vysráží 20 až 30 ml roztoku octanu měďnatého. Roztok se důkladně promíchá tyčinkou, vzniklá sedimentina se zahřeje na vodní lázni a dekantuje třikrát horkou vodou za současné filtrace. Sraženina se zfiltruje přes zvážený filtr a důkladně se promyje horkou vodou. Filtrát musí být barvy zelené, jinak je nutno použít větší množství octanu měďnatého. Odfiltrovaná sraženina se vysuší a spálí s filtračním papírem v porcelánovém kelímku, který byl předem vyžihán a po ochlazení zvážen na analytických vahách. Jelikož se část měďnaté sloučeniny žiháním zredukovala na měď, černý zbytek po vyžihání sraženiny (oxid měďnatý) se pokape koncentrovanou kyselinou dusičnou, odpaří se k suchu, mírně vypálí nad kahanem, vyžihá v muflové peci cca 20 minut a po ochlazení v exsikátoru se zváží (CuO), kdy 1 g CuO odpovídá 1,3061 g tříslovin.

Vyhodnocení:

Obsah tríslovin **w** [%] se vypočte podle vzorce:

$$w = \frac{m_1 \cdot 1,3061 \cdot 100}{m_2}$$

kde **m₁** [g] je hmotnost oxidu měďnatého po vyžihání vzorku a **m₂** [g] je navážka vzorku.

5.2 Vybrané analýzy piva a vína

5.2.1 Stanovení polyfenolových sloučenin v ovocných šťávách, pivu a vínu

Princip metody:

Stanovení celkových fenolových sloučenin není metodicky problematické, standardně se nejčastěji používá Folin-Ciocalteuova metoda (FMC). Základem metody je oxidace fenolů molybdato-wolframáovým reagentem, při níž se tvoří barevný produkt s absorbcí λ_{\max} 745-750 nm. Je založena na redukci fosfowolframato-fosfomolybdatového komplexu, pravděpodobného složení $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}/(\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HCl}$ (FCR, reagent).

Folin-Ciocalteuova reakce je nespecifická pro fenolové látky a reagent může být redukován i mnoha nefenolovými sloučeninami (vitaminem C, ionty Cu^+ aj.). Fenolové sloučeniny reagují jen v alkalickém prostředí, cca pH 10. Metoda byla a je po mnoho let používána pro měření celkových koncentrací fenolových látek v přírodních produktech, vzorcích zeleniny a ovoce, zrnin, ovocných šťáv, piva a vína.

Chemikálie:

Folin-Ciocalteuův reagent FCR (10x ředěný)

uhličitan sodný, Na_2CO_3 , 7,5 % roztok

kyselina gallová, 10mmol/l

Pomůcky:

sada zkumavek, automatické pipety, kádinky, pipeta

Pracovní postup:

Stanovení kalibrační závislosti:

Do 6 zkumavek se napipetuje po 500 μl FCR a postupně se zvyšující množství **1 mmol/l gallové kyseliny**, tj. 0, 20, 40, 60, 80, a 100 μl . (Zásobní roztok kyseliny gallové má koncentraci 10 mmol/l !). Přidá se destilovaná voda v opačném množství tj. 100, 80, 60, 40, 20 a 0 μl . Roztoky se promíchají a nechají se 10 minut reagovat. Poté se přidá 400 μl 7,5 % roztoku Na_2CO_3 . Po 30 minutách se změří absorbance při 765 nm proti slepému pokusu (0 μl kyseliny gallové). Sestrojí se závislost absorbance na koncentraci gallové kyseliny.

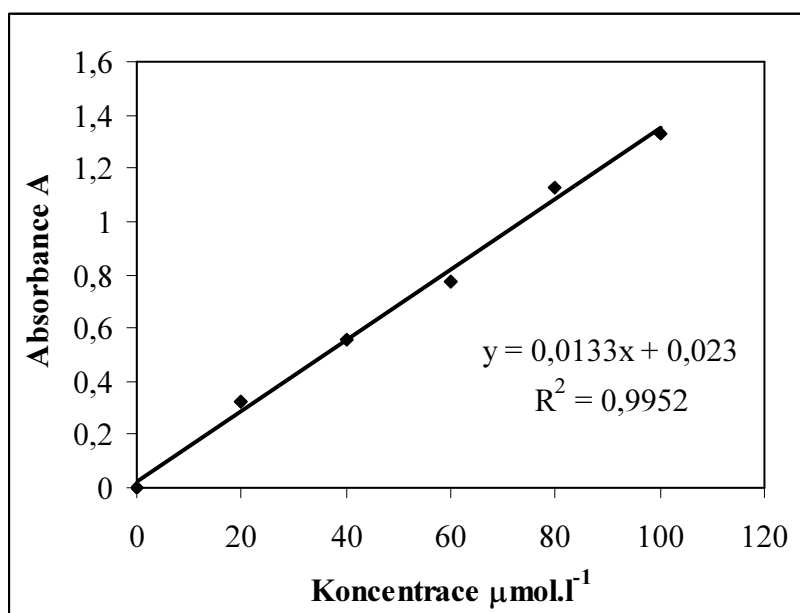
Stanovení fenolových látek ve vzorku:

Reakce se provede obdobně jako se standardem. Do zkumavky se napipetuje 20 μl měřeného vzorku. Přidá se 80 μl destilované vody. Do zkumavky se dále napipetuje 500 μl FCR a směs se nechá 10 minut reagovat. Poté se přidá 400 μl 7,5 % roztoku Na_2CO_3 . Po 30 minutách se změří absorbance při 765 nm proti slepému pokusu (0 μl kyseliny gallové). Vzorek se připraví ve 3 opakováních.

Vyhodnocení:

Sestrojí se závislost absorbance na koncentraci gallové kyseliny.

Výsledek se uvádí v mmol/l ekvivalentu gallové kyseliny (EG), nebo v mg (EG) s přepočtem na molekulovou hmotnost gallové kyseliny (M_r 170,2). V extraktech ovoce a zeleniny může výsledek ovlivňovat přítomnost askorbové kyseliny. Vliv sacharidů je vzhledem k jejich nižší reaktivitě s činidlem méně významný.



Obrázek 3: Kalibrační závislost gallové kyseliny

5.2.2 Stanovení antioxidační aktivity/kapacity (spektrofotometricky)

Pro určení antioxidační kapacity rostlinných extraktů se nejvíce používají metody TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), DPPH[•] (s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllový radikál) a FRAP (Ferric reducing antioxidant power), které jsou založeny na oxidačně-redukční reakci, a to schopnosti antioxidantu poskytovat vodíkový radikál H[•]: Aox-H + R[•] → Aox[•] + RH (Aox = antioxidant)

Princip metody:

Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) bývá také označována jako TAA metoda (Total Antioxidant Activity). TEAC metoda je jednou z nejčastěji používaných metod k určení množství radikálů, které mohou být zneškodněny nějakým antioxidantem, tj. celkové antioxidační kapacity. Je založena na neutralizaci radikalkationtu vzniklého jedoelektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS^{•+}. Antioxidant reaguje s kationradikálem ABTS^{•+} a reakcí se snižuje hodnota absorbance při 734 nm. Antioxidační aktivita je přímo úměrná snížení absorbance reakčního roztoku se vzorkem. Metoda může být použita pro vzorky potravin, séra, plasmy a jiných tělních tekutin.

Chemikálie:

roztok ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolo-6-sulfát, diamoniová sůl) o koncentraci 7 mmol/l připravený (96,02 mg; stačí 70mg/25 ml nebo 384 mg/100 ml deionizované vody;
roztok PBS – fosfátový pufr (Na₂HPO₄·12 H₂O + NaH₂PO₄ · 2 H₂O + NaCl)
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), 5 mmol/l
Pracovní roztok ABTS: připravený smícháním roztoku ABTS s PSD 1 : 1, který se nechá stát ve tmě při pokojové teplotě nejméně 12 hodin.

Pomůcky: sada zkumavek, automatické pipety, kádinky, pipeta

Pracovní postup:

Stanovení kalibrační závislosti:

Do 6 zkumavek se napipetuje 950 µl pracovního roztoku ABTS^{•+} a přidá se postupně 0, 10, 20, 30, 40 a 50 µl **1mmol/l Troloxu**. (Zásobní roztok Troloxu má koncentraci 5 mmol/l !). Přidá se doplňující množství destilované vody, tj. 50, 40, 30, 20, 10 a 0 µl. Zkumavky se

protřepou a směs se nechá 20 min reagovat. Poté se proměří absorbance při 734 nm. Sestrojí se kalibrační závislost (obrázek. 4). Měří se proti roztoku PBS.

Vlastní stanovení vzorků:

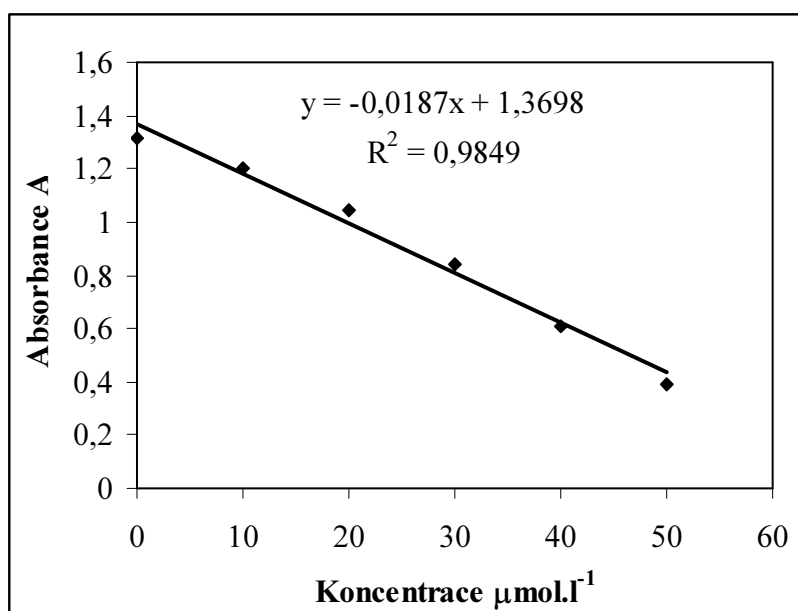
Do zkumavky se napipetuje 950 μl pracovního roztoku ABTS^{•+} a podle intenzity reakce se přidá 10 až 50 μl vzorku, promíchá se a po 20 minutách se změří absorbanci při 734 nm. Měří se proti roztoku PBS.

Antioxidační kapacita se vyjadřuje ekvivalentem ke standardu tj. v mmol/l Troloxu, tj. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Protože reakce probíhá v pufovaném prostředí a s malým objemem vzorku, není závislá na pH pokud není extrémní.

$$1 \text{ mmol/l Troloxu} = 1 \text{ mmol/l testovaných polyfenolů}$$

Příklad ředění a pipetovaného množství vzorků:

Piva	5-10x ředit, 20 - 50 μl
Vína bílá	5x ředit, 20 -50 μl
Vína světle červená	20x ředit, 20 -50 μl
Vína tmavě červená	50x ředit, 20 - 50 μl
Ovocné šťávy	2-5x ředit, 20-50 μl



Obrázek 4: Kalibrační závislost Troloxu

5.2.3 Oxidimetrické stanovení alkoholu podle Rebeleina (destilační metoda)

Princip metody:

Ethanol se ze vzorku vína nejprve predestiluje do předlohy s chromanem draselným a kyselinou dusičnou. Zoxidovaný ethanol vyloučí z jodidu draselného jod, jehož množství se zjistí nepřímou jodometrickou titrací odměrným roztokem thiosíranu sodného na škrobový maz jako indikátor.

Chemikálie:

chroman draselný, K_2CrO_4 , 0,3474 mol/l

thiosíran sodný pentahydrát, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 0,3474 mol/l

Jodid draselný, KI, 30% roztok

kyselina dusičná, HNO_3 , 65%

0,5 % roztok škrobového mazu

Postup metody:

Příprava slepého pokusu:

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 500ml se napipetuje 10 ml roztoku K_2CrO_4 , přidá se 25 ml koncentrované HNO_3 , 250 ml destilované vody a 10 ml roztoku KI. Titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného. Ke konci titrace se přidá 10 ml škrobového mazu a dotitruje se do světle modré barvy. (Pozor, spotřeba může být vyšší než 25 ml). Tato spotřeba odměrného roztoku se označí za spotřebu A.

Příprava vzorku pro destilaci:

Do Erlenmayerovy baňky (100ml) se zábrusem se napipetuje 10 ml roztoku K_2CrO_4 a přidá se 25 ml konc. HNO_3 . Baňka se umístí pod destilační přístroj tak, aby trubice z chladiče zasahovala pod hladinu oxidační směsi až na dno baňky. Do druhé Erlenmayerovy baňky (100ml) se zábrusem se napipetuje 1 ml testovaného vína, přidá se 12 ml destilované vody a tři varné kuličky. Baňka se uchytlí do destilační aparatury a od počátku destilace se měří 3 minuty. Trubicí destilačního přístroje je nutné opláchnout destilovanou vodou do baňky s roztokem K_2CrO_4 . Roztok z této baňky se kvantitativně převede do Erlenmayerovy baňky (500ml), baňka se vypláchne ještě dalšími 250 ml destilované vody a přidá se 10 ml roztoku KI. Titruje se roztokem thiosíranu sodného. Ke konci titrace se přidá 10 ml škrobového mazu

a dotitruje se do světle modré barvy. Tato spotřeba odměrného roztoku se označí za spotřebu B.

Vyhodnocení:

$(1 - B / A) \cdot 15,2 = \% \text{ obj. alkoholu vyjádřená na dvě desetinná místa}$

$(1 - B / A) \cdot 120 = \text{koncentrace (g.l}^{-1}\text{) alkoholu vyjádřená na jedno desetinné místo.}$

5.2.4 Stanovení obsahu ethanolu lihoměrem

Princip metody:

Obsah ethanolu se stanoví destilační metodou (přesné stanovení) nebo lihoměrem. Stanovení lihoměrem je vhodné pro pravé destiláty s vyšším obsahem ethanolu, např. pro slivovice, meruňkovice apod.

Pomůcky:

Lihoměr s vhodným rozsahem, odměrný válec (200 – 500 ml)

Pracovní postup:

Destilát přilijeme do odměrného válce, ponoříme lihoměr.

Vyhodnocení:

Ze stupnice lihoměru se odečtou přímo objemová procenta ethanolu.

5.2.5 Stanovení methanolu v destilátech (spektrofotometricky)

Princip metody:

Methanol se zoxiduje manganistanem draselným na formaldehyd, který se stanoví po reakci s kyselinou fuchsinsířičitou. Metoda je vhodná pro stanovení methanolu ve vzorcích s obsahem asi do 2 % methanolu.

Chemikálie:

pracovní roztoky methanolu obsahující 0, 0,5, 1, 1,5, 2 % methanolu

manganistan draselný KMnO_4 1% roztok

kyselina šťavelová 8% roztok

kyselina sírová H_2SO_4 koncentrovaná

fuchsinsířičité činidlo

Pomůcky: sada kádinek, pipety, spektrofotometr

Pracovní postup:

Příprava kalibrační závislosti:

Z pracovních roztoků methanolu o koncentracích: 0, 0,5, 1, 1,5, 2 % methanolu se napipetuje po 1 ml do čistých a suchých kádinek, přidají se 4 ml vody, 0,2 ml kyseliny sírové a 5 ml 1% manganistanu draselného. Směs se promíchá, nechá se 2 minuty stát, přidá se 1ml 8% kyseliny šťavelové a 1ml kyseliny sírové. Po odbarvení roztoku se přidá 5ml fuchsinsířičitého činidla. Vzniklé zbarvení se měří po 2 hodinách při 590 nm proti slepému roztoku (zkumavka s 0 % methanolu)

Vlastní stanovení vzorku:

Z průměrného vzorku destilátu se odpipetují 1ml, přidají se 4 ml vody a postupuje se stejným způsobem jako u kalibrační závislosti. Stanovení se provede 2-3 krát.

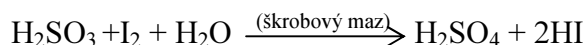
Vyhodnocení:

Koncentrace methanolu ve vzorku se odečte z kalibrační závislosti.

5.2.6 Stanovení oxidu siřičitého ve víně (jodometricky)

Princip metody:

Oxid siřičitý je ve vzorku přítomen volný jako kyselina siřičitá, hydrogensiřičitanový a siřičitanový anion a vázaný na některé organické sloučeniny. Ke stanovení koncentrace volného SO₂ a celkového SO₂ ve vzorcích vín se používá přímá jodometrie (ČSN 560216). Volný oxid siřičitý se přímo oxiduje jódem, vázaný se oxiduje jódem až po uvolnění alkalickou hydrolyzou.



Chemikálie:

bromičnan draselný KBrO₃ c = 0,017 mol/l

thiosíran sodný pentahydrát Na₂S₂O₃·5H₂O c = 0,02 mol/l

jodid draselný KI c = 0,02 mol/l

hydroxid sodný NaOH c = 1 mol/l

kyselina sírová H₂SO₄ c = 1 mol/l a 20% roztok

kyselina chlorovodíková HCl (1:1)

škrobový maz

roztok jodu 0,02 mol/l

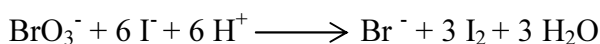
Pomůcky:

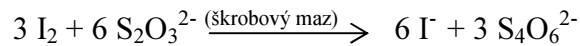
Erlenmayerova baňka, pipety, byreta, odměrný válec, titrační buňky

Pracovní postup:

Stanovení přesné koncentrace Na₂S₂O₃:

Do zábrusové Erlenmayerovy baňky na 500 ml se odpipetuje 25 ml roztoku KBrO₃ (c=0,017 mol/l) a zředí se 25 ml destilované vody, přidají se 2 g KI, 2 ml 2 mol/l H₂SO₄ a baňka se uzavře. Po pěti minutách se roztok zředí 150 ml destilované vody a titruje se roztokem Na₂S₂O₃, jehož koncentrace je stanovována. Titruje se nejdříve do slabě žlutého zbarvení a po přidání škrobového mazu (5 ml) se titruje do změny modrého zbarvení na čirou tekutinu. Reakce probíhá dle rovnice:





Standardizace odměrného roztoku I₂:

Do Erlenmayerovy baňky na 500 ml se odměří válcem 200 ml destilované vody a poté se napipetuje 25 ml roztoku jódu + 10 ml HCl (1:1). Tento roztok se titruje po kapkách 0,02 mol/l roztokem Na₂S₂O₃ do světle žlutého zbarvení. Po přidání 5 ml škrobového mazu se titruje do odbarvení modrého zbarvení.

Stanovení volného oxidu siřičitého:

Do titrační baňky se napipetuje 50 ml vzorku vína, přidá se 10 ml 20% kyseliny sírové a 5 ml škrobového mazu. Ihned se titruje 0,02 M roztokem jódu, až modré zbarvení vydrží asi 30 s. Titrovat se musí rychle, aby interferující látky co nejméně ovlivnily výsledek.

Stanovení celkového oxidu siřičitého:

Do titrační baňky se zábrusem (Erlenmayerovy baňky) se odpipetuje 25 ml 1 mol/l NaOH a přidá se 50 ml vzorku, a to tak, že se pipetou vzorek podvrství pod roztok NaOH. Obsah titrační baňky se promíchá, zazátkuje a nechá stát 15 minut. Poté se přidá 15 ml 20% kys. sírové, 5 ml škrobového mazu a titruje se stejným postupem do modrého zbarvení.

Vyhodnocení:

Ze spotřeby jódu se vypočítá obsah oxidu siřičitého v jako hmotnostní koncentrace c_m v mg/l.

5.2.7 Izolace, důkaz a dělení syntetických barviv ve víně

Princip metody:

Syntetická barviva používaná v potravinářském průmyslu mohou být rozpustná ve vodě a v tucích. Z analytického hlediska je důležitější zjišťování potravin vzhledem na dodržování příslušných zdravotnických norem a identifikace povolených barviv. Barvivo z tohoto je možné extrahovat vhodným rozpouštědlem nebo absorbovat na vlněné vlákno nebo polyamidový (PA) prášek. Po promytí vodou, kdy se vyplaví přirozená barviva, je možné eluovat syntetická barviva z vlny nebo PA prášku amoniakem. Takto získaný eluát je možné zahustit a dále podrobit chromatografickému dělení s následnou identifikací přítomných barviv.

Chemikálie:

kyselina vinná 10 % roztok

kyselina sírová H_2SO_4 koncentrovaná

amoniak NH_3 2% roztok

aceton

petrolether

methanol

butanol

propanol

sada standardů syntetických potravinářských barviv

Pomůcky:

Odpařovací porcelánová miska, kádinka, filtrační papír, vyvíjejí nádoba, tenká vrstva (SILUFOL), vodní lázeň vlněné vlákno,

Pracovní postup:

K 50 ml vzorku vína se přidá 5 g kyseliny vinné (konc. 10%) nebo 2 ml koncentrované kyseliny octové a chomáč vlněného vlákna. Roztok s vlákny se zahřívá v horké vodní lázni 30 min až hodinu. Potom se vlákno vypere destilovanou vodou a osuší filtračním papírem. Pokud zůstane vlákno zbarvené, je zkoušený vzorek potravin uměle přibarven.

Syntetická barviva lze z vlákna izolovat tak, že se vlákno ponoří do 15 ml 2% amoniaku na porcelánové misce a zahřívá se na vodní lázni až do jejich opětného rozpuštění. Extrakt se potom zahustí, případně zředí nebo odpaří až do sucha a zpětně se rozpustí v malém množství methanolu. Identifikace barviv je možná pomocí rozdělovacích metod – papírové, tenkovrstvé nebo sloupcové chromatografie. Na tenkou silufolovou vrstvu se naznačí tužkou asi 1 cm od dolního okraje startovní čára, na kterou se pak postupně nakápnou jednotlivá standardní barviva + vzorek. Poté se tenká vrstva vloží do vyvíjecí komory a vyvíjí se různými rozpouštědly, např. acetonem, butanolem, propanolem či petroletherem. Vyvíjení se provádí v digestoři. Po vyvíjení (cca 1 hodina) se vyhodnotí retenční faktory (R_f) jednotlivých skvrn.

Vyhodnocení:

Porovnáním R_f vzorku a standardních barviv určíme barevné složení vzorku.

R_f = vzdálenost start – střed skvrny (**lomeno**) / vzdálenost start - čelo

5.2.8 Titrační stanovení CO₂ v pivě

Princip metody:

V pivu je CO₂ fyzikálně rozpuštěn v podobě kyseliny uhličitě a je vázán na koloidní systém piva. Obsah CO₂ u našich piv se pohybuje v rozmezí od 0,35 do 0,50 hm. %. Jednou z metod, kterou lze stanovit obsah CO₂ v pivě je titrační metoda podle Cannizzara a de Clercka, která je nepřesnější, ale také nejobtížnější. Stanovení je založeno na reakci CO₂ s nadbytkem NaOH, přičemž vzniká Na₂CO₃. Nezreagované množství odměrného roztoku NaOH pak titrujeme HCl na fenolftalein do pH 9,0. Rozdíl mezi původně přidaným objemem NaOH a k retitraci spotřebovaným objemem HCl odpovídá množství CO₂ ve vzorku. Při retitraci se totiž převede všechno vzniklé Na₂CO₃ na NaHCO₃. Rozdíl obou spotřeb udává, kolik mililitrů roztoku NaOH o koncentraci 0,1 mol.l⁻¹ by se spotřebovalo na reakci:



Chemikálie:

hydroxid sodný NaOH c = 0,1 mol/l

fenolftalein

kyselina chlorovodíková HCl c = 0,1 mol/l

Pomůcky:

pH metr, titrační baňky, pipeta, byreta

Pracovní postup:

Do titrační baňky se odpipetuje alikvótní podíl silně ochlazeného vzorku piva (10 ml), přidá se 40 ml 0,1 M NaOH. Nezreagované množství NaOH se titruje odměrným roztokem 0,1M HCl na fenolftalein do odbarvení nebo do pH 9,0 (měříme pH metrem). Poté se provede stejným způsobem slepé stanovení, kdy se místo vzorku piva odpipetuje shodné množství destilované vody. Rozdíl spotřeb mezi slepým stanovením a stanovením vzorku odpovídá množství CO₂ ve vzorku.

Vyhodnocení:

$$m(\text{CO}_2) = c(\text{HCl}) \cdot (V_{\text{sl}} - V_{\text{st}}) \cdot M(\text{CO}_2) \cdot F_t$$

kde m [mg] je množství CO_2 v titrovaném množství piva, toto množství se přepočítá na mg.l^{-1} piva, $c(\text{HCl})$ [mol/l] je přesná koncentrace HCl , $(V_{\text{sl}} - V_{\text{st}})$ [ml] je rozdíl spotřeb slepého stanovení a stanovení vzorku v ml, $M(\text{CO}_2)$ je molární hmotnost CO_2 a F_t je faktor titrace.

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. musí být minimální obsah CO_2 ve všech druzích piva 0,3 hm. %.

5.2.9 Refraktometrické stanovení stupňovitosti, skutečného extraktu a ethanolu

Princip metody:

Stanovení skutečného extraktu a ethanolu potřebných k výpočtu stupňovitosti původní mladiny lze provést destilací. Tento postup je však časově náročnější a lze jej nahradit refraktometrickým měřením. V pivě zbaveném CO₂ se stanoví při 20°C relativní hustota a refrakce piva. Z těchto údajů se vypočítá obsah ethanolu a skutečný extrakt, což je extrakt odpovídající relativní hustotě piva zbaveného CO₂ a ethanolu a vyjadřuje skutečná hmotnostní procenta extraktu.

Pomůcky:

ponorný refraktometr, termostat, teploměr, stolní lampa, 2 zábrusové Erlenmayerovy baňky, dělená pipeta (10 ml), filtrační nálevka a kruh, filtrační papír, pyknometr

Pracovní postup:

Pro stanovení stačí 0,2 l vzorku piva. Zkoušené pivo se zbaví CO₂ třepáním v otevřené Erlenmayerově baňce, a to buď ručním, nebo na trepačce (asi 15 minut). Pivo je zbaveno CO₂, jestliže se po uvolnění dlaně zakrývací otvor baňky nezjistí přetlak. Potom se pivo zfiltruje, aby se zbavilo pěny. První podíly filtrátu se vylíjí. Po vytemperování a přezkoušení refrakce vody při 20 °C (viz návod u přístroje) se změří refrakce zkoušeného piva (vytemperovaného rovněž na 20 °C). Poté se stanoví hustota vytřepaného vzorku piva pyknometricky.

Vyhodnocení:

Z hodnoty refrakce a z relativní hustoty při 20 °C **d** se vypočítá obsah skutečného extraktu **n** [%] a obsah ethanolu **A** [%] ve zkoušeném pivě.

Pro výpočet se často používá soustava vzorců sestavených Lehmanem a Gerumem:

$$A = \frac{(R - L) \cdot 2}{7d}$$
$$n = \frac{(R + L) \cdot 0,9}{7d} + K$$

kde **R** je refrakce odečtená na refraktometru a zmenšená o refrakci vody (okolo 15),

$d = \rho$ (piva při 20°C) / ρ (vody při 20°C), $L = (d-1) \cdot 1000$, K je korekce, jejíž velikost závisí na obsahu alkoholu (pro $A=1$ % je $K = 0,04$, pro $A = 2$ % je $K = 0,05$, pro $A = 3$ % je $K = 0,08$, pro $A = 4$ % je $K = 0,07$, pro $A = 5$ % je $K = 0,04$)

Ze zjištěných hodnot skutečného extraktu n a alkoholu A lze vypočítat stupňovitost původní mladiny p [%] podle Bellingova vzorce:

$$p = \frac{(2,0665 \cdot A + n) \cdot 100}{1,0665 \cdot A + 100}$$

kde 2,0665 je množství extraktu v gramech potřebné k vytvoření 1 g alkoholu,
1,0665 je množství látek v gramech vzniklých při kvašení na 1 g alkoholu.

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. a její novely č 45/2000 Sb. je u piva s označením:

- lehká - požadován maximální obsah extraktu (stupňovitosti) původní mladiny 7%,
- výčepní pivo - požadováno rozmezí obsahu extraktu původní mladiny 8-10%,
- ležák - požadováno rozmezí obsahu extraktu původní mladiny 11-12%,
- speciální - požadován minimální obsah extraktu původní mladiny 13%.

5.2.10 Pěnovost a stálost pěny piva

Princip metody:

Pěnovost a stálost pěny je charakteristickou vlastností piva. Bohatá, hustá a trvanlivá pěna bývá znakem piva s říznou a plnou chutí. Pěnovost piva je schopnost piva vytvářet po nalití do konzumní nádoby pěnu. Při zkoušce se sleduje množství a kvalita pěny vzniklé po nalití vzorku piva do zkušební sklenky.

Pomůcky:

Pivní sklenice (0,5 l), pravítko

Pracovní postup:

Vytemperovaný vzorek piva se bezprostředně po otevření obalu nalije z výšky maximálně 5 cm od středu dokonale odmaštěné zkušební sklenky tak, aby osa láhve svírala s horizontální rovinou úhel 45°. Nalévání je nutno přerušit v okamžiku naplnění zkušební nádoby. Bezprostředně po nalití se změří výška pěny s přesností na 0,5 cm. Výška pěny je vzdálenost povrchu pěny od kapaliny. Současně se změří stabilita pěny s přesností na 15 sekund, tedy změří se čas, který uplyne od okamžiku, kdy bylo ukončeno nalévání vzorku, do vytvoření lysinky na povrchu piva.

Vizuálně se posoudí kvalita pěny. Hustá pěna je tvořená velkým množstvím malých bublin, řídká pěna menším množstvím větších bublin.

Vyhodnocení:

Výška pěny se vyjadřuje v celých cm, stability pěny se vyjadřuje v minutách. Kvalita pěny se označuje termíny: velmi hustá pěna, středně hustá pěna, řídká pěna.

5.2.11 Stanovení chininu v nápojích

Princip metody:

Chinin se nejčastěji stanovuje v chininových nápojích. U bezbarvých nápojů obsahujících chinin lze použít k jeho stanovení přímé spektrofotometrické metody při vlnové délce 347 nm. Metoda vychází z ČSN 56 0240-11.

Chemikálie:

kyselina chlorovodíková HCl $c = 1 \text{ mol/l}$

kyselina fosforečná H_3PO_4 $c = 2,9 \text{ mol/l}$

směs kyselin I: (HCl + H_3PO_4 - 1 + 1)

směs kyselin II: směs kyselin I + H_2O (1 + 4)

chinin – standardní roztok $c_m = 50 \text{ mg/100 ml}$ (příprava: navážka se rozpustí ve 20 ml směsi kyselin I a roztok se doplní destilovanou vodou na objem 100 ml)

Pomůcky: kádinky, sada odměrných baněk, pipeta, spektrofotometr

Pracovní postup:

Měření kalibrační závislosti:

Do 100 ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml standardního roztoku chininu, přidá se 18 ml směsi kyselin I a doplní se destilovanou vodou po rysku. Z tohoto roztoku chininu se postupně pipetuje 1, 3, 5, 7 a 9 ml do sady 10 ml odměrných baněk a doplní se po rysku směsí kyselin II po rysku. Změří se absorbance při vlnové délce 347 nm proti slepému pokusu.

Stanovení chininu v tonicu metodou kalibrační závislosti:

Mírným zahřátím na vodní lázni se z chininového nápoje (tonicu) vytěsňuje CO_2 . Po ochlazení se odpipetuje 25 a 50 ml roztoku do dvou 100 ml odměrných baněk, přidá se 20 ml směsi kyselin I a roztoky se doplní po rysku destilovanou vodou. Po promíchání se změří absorbance při vlnové délce 347 nm proti slepému pokusu.

Vyhodnocení:

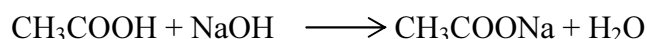
Z kalibrační závislosti se zjistí hmotnostní koncentrace chininu c_m v g/l a obsah chininu v původním nápoji se vyjádří hmotnostní koncentrací.

6 VYBRANÉ ANALÝZY OSTATNÍCH VÝROBKŮ

6.1 Stanovení kyseliny octové v obchodním octě konduktometricky

Princip metody:

Množství kyseliny octové v obchodním octě lze kromě potenciometrické indikace bodu ekvivalence stanovit i konduktometricky. Stanovení kyseliny octové se provádí titrací 10 x koncentrovanějším odměrným roztokem NaOH za měření měrné vodivosti roztoku (konduktivity). Stanovení probíhá dle rovnice:



Chemikálie: hydroxid sodný NaOH $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Pomůcky: odměrná buňka, váženka, odměrný válec, pipeta, kádinka, konduktometr s vodivostní elektrodou, elektromagnetická míchačka, míchadélko

Pracovní postup:

Z údaje výrobce o obsahu kyseliny octové v obchodním octě (4% až 8%) se vypočítá objem vzorku potřebný k přípravě 200 ml zásobního roztoku o koncentraci 0,1 mol/l CH_3COOH . Vypočítaný objem vzorku se odměří odměrným válcem, přilije se do předem zvážené váženky a zváží se s přesností 0,1 mg. Navážený vzorek se přilije a kvantitativně spláchne destilovanou vodou po rysku. Ze zásobního roztoku vzorku se odpipetuje 30 ml do kádinky, která se umístí na elektromagnetickou míchačku. Do kádinky se vloží vodivostní elektroda, míchadélko a přidá se tolik destilované vody, aby byla celá měrná část elektrody ponořena a do elektrod nenaráželo míchadélko (při opakované titraci se přidává vždy stejné množství destilované vody). Poté se titruje za stálého míchání odměrným roztokem NaOH o $c = 0,1 \text{ mol/l}$. Titrace se ukončí po přidání dvojnásobného množství NaOH za bodem ekvivalence. Do tabulky se zaznamenávají hodnoty měrné vodivosti κ ($\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$) a objem odměrného roztoku NaOH V (ml), a to při první titraci po 0,5 ml, při druhé a třetí titraci po 0,2 ml.

Vyhodnocení:

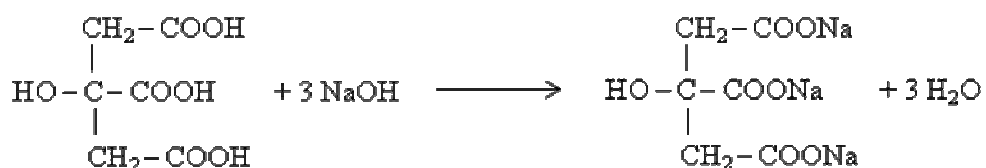
Sestrojí se konduktometrické titrační křivky pro všechna titrační stanovení a z 2. a 3. titrace se vyhodnotí z bodů ekvivalence průměrná spotřeba odměrného roztoku NaOH. Vypočítá se obsah kyseliny octové ve vzorku octa v hmotnostních procentech.

6.2 Vybrané analýzy dětské výživy (ovocných přeseňávek, zeleninových a masozeleninových přeseňávků)

6.2.1 Stanovení celkového obsahu kyselin

Princip metody:

Stanovení celkového obsahu kyselin se provádí alkalimetry. Bod ekvivalence zjistíme na indikátor fenolftalein nebo u tmavých vzorků potenciometricky titrací do pH 8,1.



Chemikálie:

hydroxid sodný NaOH c = 0,1 mol/l

fenolftalein

Pomůcky:

titrační baňky, byreta, odměrná baňka, pipeta, filtrační aparatura, pH metr, teploměr, kádinka

Pracovní postup:

Do kádinky o objemu 200 ml se odváží 25 g vzorku a vylouží se 100 ml destilované vody o teplotě cca 80°C. Poté se vzorek kvantitativně převede do 250 ml odměrné baňky a doplní se destilovanou vodou po rysku. Obsah baňky se přefiltruje a z filtrátu se odpipetuje 50 ml do titrační baňky. Titruje se 0,1 M NaOH na indikátor fenolftalein nebo lze bod ekvivalence identifikovat potenciometrickou titrací do pH 8,1.

Vyhodnocení:

Obsah kyselin se vyjádří jako kyselina citrónová v %.

6.2.2 Jodometrické stanovení kyseliny askorbové

Princip metody:

Kyselina askorbová (vitamin C) je poměrně silným redukčním činidlem, a proto ji lze v kyselém prostředí titrovat přímo odměrným roztokem jódu. Kyselina askorbová přitom přechází na dehydroaskorbovou kyselinu.

Chemikálie:

kyselina sírová H_2SO_4 $c = 4 \text{ mol/l}$

škrobový maz

odměrný roztok jodu I_2 $c = 0,001 \text{ mol/l}$

Pomůcky:

filtrační aparatura, odměrná baňka, titrační baňky, byreta, odměrný válec

Pracovní postup:

50 g vzorku se kvantitativně převede do 200 ml odměrné baňky a doplní po rysku destilovanou vodou. Obsah se přefiltruje a z filtrátu se odpipetuje alikvótní podíl (25 ml) do titrační baňky. Odměrným válečkem se přidá 5 ml 4 M H_2SO_4 a 2 ml škrobového mazu. Titruje se 0,001 M roztokem I_2 do modrofialového zbarvení.

Vyhodnocení:

Vypočítá se obsah kyseliny askorbové v mg ve 100 g vzorku a v mg v celém vzorku.

POUŽITÁ LITERATURA

BURIÁNEK, Tomáš. Metody analýzy potravin (chemicko-fyzikální a senzorická stanovení). Vyd. 1. Střední průmyslová škola chemická Brno, 2008, 123 s.

ČSN 56 0216 (560216) Metody zkoušení révových vín, tokajských vín a vín sladových, Praha: Úřad pro normalizaci a měření, 1964, 48 s.

ČSN 56 0240-11 (560240) A Metody zkoušení nealkoholických nápojů. Stanovení chininu, Praha: Úřad pro normalizaci a měření, 1976, 8 s.

ČSN 57 0153 (570153) Metody zkoušení výrobků z masa a sterilovaných pokrmů v konzervách. Stanovení obsahu bílkovin podle Kjeldahla, Praha: Úřad pro normalizaci a měření, 1987, 8 s.

ČSN 57 0167 (570167) Metody zkoušení výrobků z masa a sterilovaných pokrmů v konzervách. Metody stanovení obsahu chloridů. Praha: Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, 1985

ČSN 57 0530 (570530) Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Praha: Český normalizační institut, 1974, 108 s.

ČSN EN ISO 5509 (588767) Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Příprava methylesterů mastných kyselin. Praha: Český normalizační institut, 2001, 40 s.

ČSN EN ISO 6885 (588777) Živočišné a rostlinné tuky a oleje - stanovení anidisinového čísla, Praha: Český normalizační institut, 2008, 20 s.

ČSN EN ISO 8968-1 (57 0528) Mléko - Stanovení obsahu dusíku -Část 1: Metoda dle Kjeldahla. Praha: Český normalizační institut, 2002, 15 s.

ČSN ISO 12081 (570514) Mléko - stanovení obsahu vápníku - titrační metoda, Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012, 12 s.

ČSN ISO 1841-1 (57 6022) Maso a masné výrobky – Stanovení obsahu chloridů – část 1: Volhardova metoda. Praha: Český normalizační institut, 1999, 8 s.

ČSN ISO 1841-2 (57 6022) Maso a masné výrobky – Stanovení obsahu chloridů – část 1: Potenciometrická metoda. Praha: Český normalizační institut, 1999, 8 s.

DAVÍDEK, Jiří. Laboratorní příručka analýzy potravin. 2. vyd. Praha: SNTL, 1981, 718 s.

HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. Analýza potravin: laboratorní cvičení. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001, 109 s., příl. tabulky. ISBN 80-86494-03-9.

JANČÁŘOVÁ Irena a JANČÁŘ Luděk. Anorganická a analytická chemie laboratorní cvičení, 1. vyd. 2012, MENDELU, 162 s.

POKORNÝ, Jan. Analýza potravin. Praha, 1986.

POKORNÝ, Jan. Metody senzorické analýzy potravin a stanovení senzorické jakosti. Vyd. 2. Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1997, 195 s. ISBN 80-85120-60-7.

PRÍBELA, Alexander. Analýza potravin. 2. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1996, 224 s. ISBN 80-227-0846-1.

STRATIL, Pavel. Chemie potravin. Laboratorní cvičení, 2011, 28 s. MENDELU

VORLOVÁ, Lenka. Chemie potravin. Návody k praktickým cvičením. 1. vyd. Brno: VFU Brno, 2001, 84 s. ISBN 80-7305-411-6.

ZÝKA, Jaroslav. Analytická příručka. 2., dopl. a upr. vyd. Praha: SNTL, 1972, 1037 s.

Autor	Ing. Andrea Kleckerová, Ph.D.
Název titulu	CHEMIE POTRAVIN Laboratorní cvičení
Vydavatel	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno
Vydání	První, 2014
Náklad	300 ks
Počet stran	89
Tisk	ASTRON studio CZ, a.s.; Veselská 699, 199 00 Praha 9 Neprošlo jazykovou úpravou.
ISBN	978-80-7509-170-3

Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ