	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10058.1 – Stanovení obsahu tuku	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU TUKU

1 Účel a rozsah

Touto metodou se stanoví obsah tuku v krmivech a materiálech určených pro hnojení. Metoda se nevztahuje na zkoušení olejnatých semen a plodin. Podle druhu a složení krmiva a podle účelu, pro který se zkouška provádí, se použije jeden ze dvou níže uvedených postupů.

1.1 Postup A – přímo extrahovatelné tuky

Tato metoda je použitelná pro krmiva rostlinného původu s výjimkou těch, která jsou uvedena v postupu B.

1.2 Postup B – celkové tuky

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Používá se pro všechny materiály, z nichž není možné tuk zcela extrahovat bez předchozí hydrolýzy, např. lepky, kvasnice, bramborové proteiny a výrobky, které byly podrobeny zpracování, jako je vytlačování, vločkování a zahřívání.

1.3 Interpretace výsledků

Ve všech případech, kdy se dosáhlo postupem B vyššího výsledku než postupem A, je třeba považovat za platnou hodnotu výsledek dosažený postupem B.

2 Princip

2.1 Postup A – přímo extrahovatelné tuky

Vzorek se extrahuje petroletherem nebo diethyletherem. Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek se vysuší a zváží.


2.2 Postup B – celkové tuky

Vzorek se hydrolyzuje za horka kyselinou chlorovodíkovou. Směs se ochladí a přefiltruje. Zbytek na filtru se promyje a vysuší a dále se pokračuje ve stanovení podle postupu A.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Petrolether, bod varu (40 – 60) °C. Bromové číslo musí být menší než 1 a zbytek po odpaření menší než 2 mg/100 ml.
- 2 Diethylether, (CH₃CH₂)₂O, bez obsahu peroxidů, se zbytkem po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml.
- 3 Síran sodný, bezvodý, Na₂SO₄.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10058.1 – Stanovení obsahu tuku	Revize	1

- 4 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná 35%, $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$.
- 5 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 6 Kyselina chlorovodíková, roztok, $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se k asi 600 ml vody (5) přidá 265 ml HCl (4) a po vytemperování se doplní vodou (5) po značku.
- 7 Dusičnan stříbrný, AgNO_3 .
- 8 Dusičnan stříbrný, roztok, $c = 10 \text{ g/l}$.
Příprava: 10 g dusičnanu stříbrného (7) se rozpustí v 900 ml vody (5) a doplní do objemu 1 litr.
- 9 Kongočerveň.
- 10 Kongočerveň, roztok, $c = 1 \text{ g/l}$.
Příprava: 1 g kongočervěně (9) se rozpustí ve 100 ml ethanolu (11) a doplní do objemu 1 litr.
- 11 Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 96 %.


4 Přístroje a pomůcky

- 1 Extrakční přístroj. Pokud je opatřen sifonem (typ Soxhlet), rychlost refluxu je taková, aby docházelo k 10 přetokům za hodinu; pokud se jedná o typ bezsifonový, reflux je 10 ml/min.
- 2 Extrakční patrony neobsahující látky rozpustné v petroletheru/diethyletheru s porozitou odpovídající požadavkům uvedeným v bodu 1.
- 3 Sušárna vakuová s teplotou $(75 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ nebo horkovzdušná s teplotou $(100 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$.
- 4 Kahan nebo topná deska.
- 5 Varné kamínky nebo skleněné varné kuličky, hodinové sklo.
- 6 Analytické váhy.

5 Postup

5.1 Postup A

- 5.1.1 Do extrakční patrony se naváže 5 g vzorku s přesností na 1 mg a patrona se uzavře tukuprostou vatou.
- 5.1.2 Patrona se umístí do extrakčního přístroje a extrahuje se 6 h petroletherem (1) nebo diethyletherem (2). Extrakt se jímá do suché, předem zvážené baňky s varnými kamínky nebo skleněnými kuličkami.
- 5.1.3 Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek v baňce se vysuší 1,5 h v sušárně při $(100 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$. Nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se. Suší se dalších 30 min, aby se zajistila konstantní hmotnost tuku (rozdíl mezi dvěma následujícími váženími musí být nejvýše 1 mg).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10058.1 – Stanovení obsahu tuku	Revize	1

Poznámky

- 1 Pro většinu analyzovaných krmiv a krmných směsí dostačuje k zajištění konstantní hmotnosti tuku sušení baňky s extrakčním zbytkem v horkovzdušné sušárně 1,5 h při (100 ± 3) °C.

5.2 Postup B

Do 400ml kádinky nebo do (250 – 300)ml kónické baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 0,001 g, přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (6) a varné kamínky/skleněné kuličky. Kádinka se přikryje hodinovým sklem nebo se kónická baňka napojí na refluxní chladič. Směs se zahřívá k varu na kahanu nebo na topné desce a potom se udržuje v mírném varu 1 h. Během varu se částičky vzorku nesmějí usazovat na stěnách nádoby. Směs se vychladí a filtruje přes zvlhčený dvojité filtr, který neobsahuje žádný tuk. Zbytek na filtru se promývá studenou vodou (5) do negativní reakce filtrátu na chloridy, kdy filtrát s roztokem dusičnanu stříbrného (8) již netvoří zákal, nebo kontrola roztokem kongočerveně (10), dokud nevymizí modré zbarvení filtrátu.

Filtr se zbytkem po hydrolýze se umístí na hodinové sklo a suší se nejméně 3 h v sušárně při (100 ± 3) °C. Filtr s vysušeným zbytkem se vloží do extrakční patrony a utěsní se tukuprostou vatou.

Alternativou je pozvolné sušení filtru při laboratorní teplotě do druhého dne. Poté se vloží do extrakční patrony, utěsní tukuprostou vatou a suší se 1,5 h v sušárně při (100 ± 3) °C.


Extrakční patrona se umístí do extrakčního přístroje a dále se postupuje podle bodu 5.1.2 a 5.1.3.

5.3 Postup pro výrobky s vysokým obsahem tuku

U výrobků s vysokým obsahem tuku, které se obtížně melou nebo u kterých je obtížné odebrat homogenní redukovaný vzorek, se postupuje takto:

Naváží se 20 g vzorku s přesností na 1 mg, promíchá se s 10 g nebo více bezvodého síranu sodného (3). Extrahuje se petroletherem (1) nebo diethyletherem (2) podle bodu 5.1. Získaný extrakt se doplní petroletherem (1) nebo diethyletherem (2) na objem 500 ml a promíchá. Do malé, suché, předem zvažované baňky s varnými kamínky se odměří 50 ml tohoto roztoku. Rozpouštědlo se oddestiluje a po vysušení se postupuje podle bodu 5.1.3.

Ze zbytku po extrakci v patroně se odstraní veškeré rozpouštědlo a zbytek se umele tak, aby prošel sítím s oky 1 mm. Potom se vrátí do extrakční patrony, síran sodný se již nepřidává a postupuje se podle bodu 5.1.2 a 5.1.3.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10058.1 – Stanovení obsahu tuku	Revize	1

Obsah tuku x se vypočítá jako procento ze vzorku podle vztahu

$$x (\%) = (10 m_1 + m_2) \times 5$$

kde

m_1 je hmotnost zbytku po první extrakci v g (aliquotní části extraktu)

m_2 je hmotnost zbytku po druhé extrakci v g.

6 Vyjádření výsledků

Hmotnost zbytku po extrakci x se vyjádří jako % tuku ve vzorku.

$$x (\%) = 100 \times \frac{m_2 - m_1}{m_0}$$

kde

m_0 hmotnost zkušebního vzorku v g,

m_1 hmotnost prázdné extrakční baňky v g,

m_2 hmotnost extrakční baňky s extraktem v g.

Poznámky

- 2 U výrobků s nízkým obsahem tuku se může zvýšit navážka vzorku na 5 g. (5.2).
- 3 Krmiva pro domácí zvířata, která mají vysoký obsah vody, je třeba před hydrolyzou a extrakcí podle postupu B smíchat s bezvodým síranem sodným.
- 4 V bodě 5.2 může být účinnější při promývání filtračního zbytku použít horkou vodu místo studené.
- 5 U některých krmiv může být vhodné prodloužit dobu sušení nad 1,5 h. Je však třeba zamezit přílišnému vysoušení, které může vést k nižším výsledkům. Je možno použít i mikrovlnnou sušárnu.
- 6 Předextrakce podle postupu A před hydrolyzou a další extrakce podle postupu B se doporučuje u krmiv s obsahem tuku nad 15 %. Do jisté míry to závisí na druhu krmiva a druhu tuku v krmivu.