	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU TUKU V OLEJNATÝCH SEMENECH

1 Rozsah a účel

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení tuku (hexanového, diethyletherového nebo petroletherového extraktu) v olejnatých semenech.

2 Princip

Tuk ("olej") se stanoví vážkově po extrakci vzorku hexanem, diethyletherem nebo petroletherem na vhodném zařízení, oddestilování rozpouštědla a vysušení vyextrahovaného tuku vzorku.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Extrakční činidlo n-hexan, diethylether nebo petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 1).
- 2 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná.
- 3 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Plyn inertní (dusík nebo oxid uhličitý).

Poznámky

1 n-hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečné hořlaviny I. třídy, a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

4 Přístroje

- 1 Extrakční zařízení, vhodné konstrukce, s extrakčními baňkami o objemu 200 ml až 500 ml (poznámka 2).
- 2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení.
- 3 Patrony nebo tuby extrakční, tukuprosté, velikosti podle použitého extrakčního přístroje.
- 4 Sušárna elektrická vakuová s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou.
- 5 Vata obvazová, odtučněná.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Revize	1

Pro bavlníková semena s přilehlými vlákny se požaduje další zařízení:

- 6 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automatickou regulací teploty (130 ± 2) °C.
- 7 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou schopná vyhřát vzorek na teplotu 115 °C během 30 min.
- 8 Miska kovová s plochým dnem o průměru 100 mm a výšce přibližně 40 mm (tzv. vysoušečka).
- 9 Keramická porézní nádoba, cylindrická o vnitřním průměru 68 mm, vnějším průměru 80 mm, výškou 85 mm a tloušťkou stěn i základny 6 mm.

Poznámky

- 2 *Pro stanovení tuku je možné použít i extrakční poloautomatické přístroje, pokud poskytují výsledky zcela srovnatelné v mezích opakovatelnosti s uvedenou metodou.*

5 Postup

5.1 Úprava vzorku


Pro zkoušku se použije zkušební vzorek tak, jak byl získán, nebo po odstranění nečistot (poznámka 3). Pokud se pracuje se vzorkem, ze kterého byly předem odstraněny velké neolejnaté částice, je nutno to zohlednit při výpočtu (viz. 6.4).

V případě semene kopry se zkušební vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodlení.

Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě bavlníku s přilehlými vlákny, se vzorek mele v mechanickém mlýnku, který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho, dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacetina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení se provede bez prodlení.

Bavlníková semena s přilehlými vlákny se upravují následujícím způsobem. Do vysoušecí misky (8) se naváží přibližně 60 g vzorku s přesností 1 mg tak, jak byl získán. Miska se semeny se vloží do sušárny (6), předem vyhřáté na (130 ± 2) °C a vzorek se nechá při této teplotě sušit 2 h. Poté se miska vyjme ze sušárny a nechá se vychladnout na vzduchu asi 30 min. Vysušená semena se přemístí do porézní keramické nádoby (9), jejíž vnitřní stěny byly předem pomocí pipety zvlhčeny 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (2). Je třeba dbát na to, aby se kyselina úplně vstřebala a nevytvořila na stěnách ulpívající kapky. Potom se nádoba přikryje hodinovým sklem a vloží do sušárny (7) a zahřeje se během 30 min na teplotu 115 °C a při této se udržuje dalších 30 min. Poté se keramická nádoba (9) vyjme ze sušárny a nechá zchladit na vzduchu 1 h.

Semena se zváží s přesností 1 mg, rozemelou se na mechanickém mlýnku, jako je tomu u semen střední velikosti.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Vydání	1
		Revize	1

Malá semena (len, řepka, konopí apod.) se navažují přímo z neupraveného vzorku v původním stavu. Navážka malých semen se drtí bezprostředně před extrakcí (viz. postup 5.2.1).

5.2 Vlastní stanovení přímou extrakcí

5.2.1 Vložení vzorku do extrakční patrony

U materiálů uvedených v 5.1, kromě malých semen, se do extrakční patrony (3) odváží asi 10 g vzorku s přesností 1 mg a shora se utěsní obvazovou vatou (poznámka 5). Navážka malých semen se nejprve rozdrť v mechanickém mikrodrtiči nebo v mlýnku, přičemž je třeba dát pozor, aby byla rozdrčena všechna semena. Rozdrčená semena se přenesou kvantitativně do extrakční patrony (3), nejlépe pomocí špachtle a vatového tamponu, namočeného do použitého extrakčního činidla (1). Tímto tamponem se také vytře miska mikrodrtiče nebo mlýnku a shora se s ním utěsní extrakční patrona (tuba), poznámka 5.

Pokud obsah těkavých látek (vlhkost) přesahuje 10 %, vloží se patrona (3) se vzorkem do sušárny (4) a předsuší se při teplotě 80 °C tak, aby se obsah těkavých látek snížil pod 10 %.

5.2.2 První extrakce


Extrakční patrona (3) se vzorkem se vloží do střední části extrakčního přístroje (1), tato část se nasadí na extrakční baňku A, předem vysušenou (30 min, 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zváženou s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky A se přidá potřebné množství extrakčního činidla (1) (poznámka 4), baňka se umístí na vyhřívací zařízení (2), napojí se na extraktor (1) a extrahuje se po dobu 4 h. Rychlost extrakce se upraví tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně k 10 přetokům extrakčního činidla, je-li použit diskontinuální extraktor, nebo minimálně 3 až 5 kapek kondenzujícího extrakčního činidla za sekundu, byl-li použit kontinuální průtokový extraktor. Po této době se extrakce přeruší, extrakční zařízení se nechá vychladnout, vyjme se patrona (tuba) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla.

5.2.3 Druhá extrakce

Vzorek se z patrony (3) vysype do mikrodrtiče a rozdrť se co možná nejjemněji (poznámka 6). Takto upravený vzorek se kvantitativně vsype zpět do patrony (3) a ta se opět vloží do extrakčního zařízení (1) a extrahuje se další 2 h. K tomu účelu se použije stejná extrakční baňka A, obsahující první část extraktu. Po dvou hodinách se extrakce přeruší, extrakční zařízení (1) se nechá vychladnout, opět se vyjme patrona (3) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla. Opakuje se drcení jako po první extrakci.

5.2.4 Třetí extrakce

Vzorek se po druhé extrakci a následném drcení vloží zpět do extrakční patrony (3) a tato se vloží zpět do extrakčního zařízení (1). K zařízení se připojí extrakční baňka B, předem vysušená (30 min, 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážená s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky B se přidá potřebné množství extrakčního činidla, baňka se umístí na vyhřívací zařízení (2), napojí se na extraktor a extrahuje po dobu 2 h.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Vydání	1
		Revize	1

5.2.5 Odstranění extrakčního činidla a vážení tuku

Větší část rozpouštědla z extrakčních baněk A a B se odpaří na vyhřívacím zařízení (2), poslední stopy extrakčního činidla se odstraní v sušárně (4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu 1,5 h. Extrakční činidlo je možno odstranit také proudem vzduchu nebo lépe inertního plynu (3), zaváděného do baněk po krátkých intervalech anebo snížením tlaku v baňkách.

Baňky s vyextrahovaným tukem ("olejem") se nechají vychladnout v exsikátoru po dobu nejméně 1 h a potom se zváží s přesností nejméně na 0,001 g. Potom se baňky s extraktem vloží zpět do sušárny (4) a při výše uvedené teplotě se suší ještě 10 min, ochladí se v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností. Pro obě baňky platí, že rozdíl mezi dvěma váženími nemá být větší než 10 mg. V opačném případě je nutné sušení a vážení opakovat až bude docíleno požadovaného rozdílu.

Pokud hmotnost výtěžku v baňce B nepřekročí 10 mg, extrakce je dokončena. V opačném případě je nutno provést další extrakci po dobu 2 h za stejných podmínek, dokud množství výtěžku z poslední extrakce není nižší nebo rovno 10 mg.

Alternativní postup sušení baňky s extraktem:

Baňka se suší 2 h při (95 – 98) °C a po ochlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

5.2.6 Stanovení obsahu nečistot

Vyextrahovaný olej má být čistý. Pokud není, je nutno určit obsah nečistot. K tomuto účelu se rozpustí olej v rozpouštědle použitém k extrakci, zfiltruje se přes filtrační papír, předem vysušený při (103 ± 2) °C do konstantní hmotnosti a zvážený s přesností 1 mg. Filtr se ještě několikrát promyje čistým rozpouštědlem (1), aby se zcela odstranil vyextrahovaný tuk ("olej"). Filtr se vysuší při (103 ± 2) °C do konstantní hmotnosti a zváží s přesností 1 mg. K chlazení a vážení se použije vhodná nádobka opatřená víčkem.

Poznámky


3 *Pokud se požaduje určení obsahu oleje z čistých semen, zkouší se tato semena odděleně od nečistot a postupuje se přitom jako u semen tak, jak byla získána. Pro určení obsahu oleje v nečistotách se provede zkouška stejným způsobem jako pro čistá semena.*

Avšak v tomto případě

a) Zkušební navážka má být 2 g až 10 g,

b) Extrahuje se pouze jednou po dobu 4 h. V takovém případě je eventuelní chyba, která vznikla při stanovení obsahu oleje v původním olejnatém semeni, zanedbatelná.

4 *Volí se takové množství extrakčního činidla, aby u diskontinuálně průtokového přístroje docházelo ke spolehlivému přetékání kondenzátu extrakčního činidla. U kontinuálně průtokového přístroje se volí přibližně 50 ml až 100 ml.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Vydání	1
		Revize	1

- 5 *Olejnatá semena mohou být zkoušena odděleně takto:*
- Čistá semena a nečistoty.*
 - U podzemnice olejné čistá semena, celkové množství jemných částic, neolejnaté nečistoty a olejnaté nečistoty.*
- 6 *Laboratoře, které neprovádějí pravidelně rozboru olejnatých semen a které nemají mikrodrtič, může být mikrodrcení nahrazeno rozetřením na prášek tloučkem v třecí misce:*
- Po čtyřech hodinách extrakce podle 5.2.2 se vyprázdní obsah tuby do třecí misky a přidá se přibližně 10 g písku, který byl předem promytý kyselinou chlorovodíkovou (2) a vysušen. Vzorek semene spolu s pískem se potom roztírá tloučkem co nejjemněji a dále se pokračuje ve zkoušce podle odstavce 5.2.3. Protože je ruční drcení méně účinné než mechanické v mikrodrtiči, je množství oleje získané v baňce B, která obsahuje výsledek třetí extrakce, téměř vždy vyšší než 10 mg (zejména v případě semen, která se těžko extrahují, jako např. kopa). Proto je důležité provádět za sebou následující extrakce, dokud množství extrahovaného oleje z poslední extrakce není nižší než 10 mg, což může být více než 5 extrakcí. Drcení v třecí misce nemůže být většinou použito v případě vícenásobného rozboru, protože únava pracovníka laboratoře brání uspokojivému rozdrobení více vzorků a extrakce oleje z hrubě rozdrobeného vzorku nemůže být dokonalá.*

6 Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v semeni tak, jak bylo zkoušeno

Obsah oleje (tuku) v g/kg (X) se vypočítá podle vztahu

$$X = 10^3 \times \frac{m_1}{m_0},$$


kde

m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g,

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti. Pokud není splněna podmínka opakovatelnosti, opakuje se zkouška ve dvou jiných navážkách vzorku. Pokud i v tomto případě přesáhne rozdíl 0,4 g na 100 g vzorku, bere se za výsledek aritmetický průměr všech čtyř uskutečněných zkoušek

V protokolu musí být uvedeno, jaké extrakční činidlo bylo použito.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Vydání	1
		Revize	1

6.2 Stanovení oleje při odděleném rozboru čistých semen a nečistot

Vztah uvedený v 6.1 lze použít také pro výpočet obsahu oleje jak čistých semen, tak i nečistot, tzn., když byla čistá semena a nečistoty zkoušeny odděleně. V tomto případě se obsah oleje v g/kg (Y) vypočte podle vztahu

$$Y = H_1 - \frac{P \times (H_1 - H_2)}{10^3},$$

kde P je obsah nečistot ve zkoušených semenech v g/kg,

H₁ obsah oleje v čistých semenech v g/kg,

H₂ obsah oleje v nečistotách v g/kg.

6.3 Stanovení obsahu oleje v bavlníkových semenech s přilehlými vlákny

Obsah oleje (tuku) v g /kg (Z) se vypočítá podle vztahu


$$Z = 10^3 \times \frac{m_1 \times m_3}{m_o \times m_2},$$

kde m₀ je hmotnost zkušební vzorku v g,

m₁ součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g,

m₂ hmotnost zkušební vzorku (asi 60 g) před přípravou podle 5.1- bavlníková semena v g,

m₃ hmotnost stejného zkušební vzorku po provedené přípravě podle 5.1 – bavlníková semena a před drcením v g.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Revize	1

6.4.1 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v případech, kdy byly velké neolejnaté částice odděleny před zkouškou

Obsah oleje (tuku) v g /kg (U) se vypočítá podle vztahu

$$U = X \times \frac{10^3 - N}{10^3}$$

kde

X je obsah tuku v semeni podle 6.1,

N obsah velkých neolejnatých nečistot předem oddělených ze zkoušeného semene v g/kg.

6.5 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v podzemnici olejné

Obsah oleje (tuku) v g /kg (V) se vypočítá podle vztahu

$$V = (H_1 - H_2) \times \frac{J + I_o + I_1}{10^3},$$

kde

J je obsah jemných částic zkušební vzorku v g/kg,

I₀ obsah olejnatých nečistot v g/kg,

I₁ obsah neolejnatých nečistot v g/kg,


H₁ obsah oleje v čistých semenech v g/kg,

H₂ obsah oleje v nečistotách v g/kg.

6.6 Stanovení obsahu oleje, korigovaného na sušinu

Obsah oleje (tuku) korigovaný na sušinu v g/kg (W) se vypočítá podle vztahu

$$W = X \times \frac{100}{100 - S}$$

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10060.1 – Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	Vydání	1
		Revize	1

kde

- X je obsah oleje (tuku) v g/kg v semenech, tak jak byl získán podle 6.1.
- S obsah vlhkosti a těkavých látek v %.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.