	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50090.1 – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ ČÍSLA KYSELOSTI A KYSELOSTI

### 1 Účel a rozsah

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení čísla kyselosti a kyselosti v živočišných i rostlinných tucích a olejích.

Jsou uvedeny tři způsoby stanovení – titrace za použití studeného nebo horkého rozpouštědla a postup pro instrumentální provedení pomocí automatického titrátoru.

### 2 Princip

Vzorek tuku (oleje) se rozpustí ve vhodném rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel a titruje se ethanolickým roztokem hydroxidu draselného.

Číslo kyselosti udává množství hydroxidu draselného potřebné k neutralizaci volných mastných kyselin přítomných v jednom gramu tuku (oleje).

Kyselost udává procentuální obsah volných mastných kyselin.

### 3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Ethanol, min. 95 %.
- 3 Diethylether.
- 4 Methanol, min. 95 %.
- 5 Směs rozpouštědel.

Příprava: Smíchá se ethanol (2) a diethylether (3) v objemovém poměru 1 : 1. Bezprostředně před použitím se směs neutralizuje roztokem hydroxidu draselného (7) na indikátor fenolftalein (0,3 ml fenolftaleinu (8) na 100 ml směsi).

- 6 Hydroxid draselný.
- 7 Hydroxid draselný, odměrný roztok,  $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .

Příprava: 6,6 g hydroxidu draselného (6) se rozpustí v ethanolu (2), převede se do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní ethanolem po značku. Přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného se stanoví bezprostředně před použitím podle kapitoly 5.5. Roztok se připravuje nejméně 5 dnů předem a před použitím se dekantuje do hnědé skleněné láhve, která se uzavře pryžovou zátkou.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50090.1 – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti	Vydání	1
		Revize	1

## 8 Fenolftalein.

Příprava: 1 g fenolftaleinu se rozpustí ve 100 ml ethanolu (2).

## 9 Kyselina šťavelová.

## 10 Kyselina šťavelová, odměrný roztok, $c(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 0,05 \text{ mol/l}$ .

Příprava: 6,3035 g kyseliny šťavelové (9) se rozpustí v malém množství vody, převede se do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní ethanol (2) po značku.

## Poznámky

- Diethylether je velmi hořlavý a může tvořit výbušné peroxidy. Při jeho používání je třeba zvýšená opatrnost a dodržování všech zásad pro bezpečnou práci s hořlavinami.*
- Ve směsi rozpouštědel (4) lze ethanol nahradit 2-propanolem a diethylether toluenem.*
- Pro těžce rozpustné nebo živočišné tuky lze směs rozpouštědel (4) připravit z jednoho objemového dílu ethanolu (1) a tří objemových dílů terc-butyl(methyl)etheru nebo toluenu.*
- Koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného může být upravena podle aktuální spotřeby. Místo hydroxidu draselného lze použít hydroxid sodný. Zároveň lze ethanolický roztok nahradit roztokem methanolickým.*
- Ethanolický roztok hydroxidu draselného, resp. hydroxidu sodného, lze nahradit vodným roztokem, ale pouze v případě, že objem dodané vody nevede k oddělení fází.*
- Pro tmavě zbarvené tuky lze jako indikátor použít také alkalickou modř 6B (roztok 2 g/100 ml ethanolu) nebo thymolftalein (roztok 2 g/100 ml ethanolu).*


## 4 Přístroje a pomůcky

- Byreta, 10 ml, dělená po 0,02 ml.
- Analytické váhy s přesností 0,001g.
- Automatický titrátor.

## 5 Postup

### 5.1 Příprava zkušební vzorku

Vzorek tuku (oleje) se pro analýzu připraví odpovídajícím postupem (extrakcí) z původního materiálu (krmiva, olejnatá semena apod.). U olejnatých semen musí být extrakce tuku (oleje) ze vzorku provedena bezprostředně po jeho namletí. Podle typu vzorku se použije postup 50078.1 – Stanovení obsahu tuku (oleje) v olejnatých semenech nebo postup 10059.1 Stanovení obsahu tuku.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50090.1 – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti	Vydání	1
		Revize	1

Navážka zkušební vzorku tuku (oleje) a koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného se volí podle očekávaného čísla kyselosti (viz tabulka č. 1). Obvykle se jako zkušební vzorek vezme celý získaný extrakt zvážený s přesností na 0,001 g. Číslo kyselosti případně kyselost se stanoví ihned po vyextrahování, vysušení 1,5 hod při 98°C a zvážení tuku (oleje).

### Poznámky


- 7 *Hmotnost zkušební vzorku tuku (oleje) a koncentrace titračního roztoku se volí tak, aby spotřeba nepřesáhla 10 ml.*
- 8 *Kyselost se stanovuje dle požadavku buď v oleji z produktu, tak jak byl obdržen (čistá semena a nečistoty), nebo v čistém semeni, případně v nečistotách.*

**Tabulka č. 1. Hmotnost zkušební vzorku a koncentrace titračního roztoku podle očekávaného čísla kyselosti.**

Očekávané číslo kyselosti	Hmotnost zkušební vzorku tuku (oleje) (g)	Koncentrace KOH (mol/l)
< 1	20	0,1
	10	0,05
	5	0,025
1 – 4	10	0,1
	5	0,05
4 - 15	2,5	0,1
	0,5	0,05
15 – 75	0,5	0,1
	3,0	0,5
> 75	0,2	0,1
	1,0	0,5

### 5.2 Metoda studeného rozpouštění za použití indikátoru (referenční metoda)

Zkušební vzorek tuku (oleje) se rozpustí v (50 – 100) ml předem zneutralizované směsi rozpouštědel (5), která se může v případě potřeby i mírně zahřát. Pro vzorky s vyšším bodem tání se použije směs ethanol – toluen (viz poznámka 3). Přidá se indikátor (8) a titruje se za stálého míchání odměrným roztokem hydroxidu draselného (7). Bodu ekvivalence je dosaženo, když přídavek jedné kapky hydroxidu vyvolá slabou, ale konečnou změnu barvy, která je stálá nejméně 15 s.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50090.1 – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti	Vydání	1
		Revize	1

Stanoví se faktor odměrného roztoku hydroxidu draselného (7) podle bodu 5.5.

#### Poznámky

9 *Pokud se roztok v průběhu titrace zakalí, přidá se dostatečné množství směsi rozpouštědel (5) tak, aby vznikl čirý roztok.*

### 5.3 Metoda studeného rozpouštění za použití potenciometrického titrátoru (referenční metoda)

Zkušební vzorek tuku (oleje) v baňce zvážený s přesností na 0,001 g se rozpustí v (50 – 100) ml zneutralizované směsi rozpouštědel (5), která se může v případě potřeby i mírně zahřát. Pro vzorky s vyšším bodem tání se použije směs ethanol–toluen (viz poznámka 3).

Do roztoku se zavede kombinovaná elektroda, která se spojí s automatickým titrátorem. Spustí se míchání a míchá se nejméně 30 s. Poté se za stálého míchání titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (7) do dosažení bodu ekvivalence.

Stanoví se faktor odměrného roztoku hydroxidu draselného (7) podle bodu 5.5.

### 5.4 Metoda horkého ethanolu za použití indikátoru

V baňce se zahřeje k varu 50 ml ethanolu (2) s 0,5 ml roztoku fenolftaleinu (8). Dokud je teplota ethanolu nad 70 °C, zneutralizuje se opatrně odměrným roztokem hydroxidu draselného (7). Bodu ekvivalence je dosaženo, když přidavek jedné kapky hydroxidu vyvolá slabou, ale konečnou změnu barvy, která je stálá nejméně 15 s.

Zneutralizovaný ethanol se přidá ke zkušebnímu vzorku a obsah se důkladně promíchá. Poté se přivede k varu a za intenzivního míchání baňkou se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (7).


Stanoví se faktor odměrného roztoku hydroxidu draselného (7) podle bodu 5.5.

#### Poznámky

10 *Pro tmavě zbarvené tuky lze použít větší objem ethanolu a indikátoru.*

### 5.5 Stanovení faktoru odměrného roztoku hydroxidu draselného

Do tří titračních baněk se pipetuje 20 ml cca 0,1 mol/l roztoku hydroxidu draselného (7), přidá se několik kapek indikátoru fenolftaleinu (8) a titruje se odměrným roztokem kyseliny šťavelové (10) do změny zbarvení (červená-bezbarvá). Pak se zahřeje na vodní lázni (znovu se objeví červené zbarvení), roztok se ochladí a dále titruje. Tento postup se opakuje tak dlouho, dokud již roztok při dalším zahřátí nezrůžoví. Faktor odměrného roztoku se vypočítá podle vztahu

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50090.1 – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti	Vydání	1
		Revize	1

$$f = \frac{V}{20}$$

kde  $V$  je spotřeba kyseliny šťavelové v ml.

## Poznámky

- 11 *Roztok hydroxidu draselného (7) je použitelný 2 měsíce, faktor se stanovuje před každým použitím.*
- 12 *Faktor odměrného roztoku KOH nebo NaOH lze stanovit i jinou standardizovanou kyselinou odpovídající koncentrace (např. kyselina chlorovodíková, kyselina benzoová).*

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

### 6.1 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti (ČKT) vyjádřené v mg KOH/g tuku se vypočítá podle vztahu

$$\text{ČKT} = \frac{56,1 \times V \times f \times c}{m}$$

kde  $V$  je objem použitého odměrného roztoku hydroxidu draselného v ml,

$f$  faktor odměrného roztoku hydroxidu draselného,

$c$  koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného v mol/l,

$m$  hmotnost zkušební vzorku tuku (oleje) v g,

56,1 molární hmotnost hydroxidu draselného v g/mol.

### 6.2 Kyselost (obsah volných mastných kyselin)

Kyselost (K) vyjádřená v % (m/m) podle typu tuku (viz tabulka č. 2) se vypočítá podle vztahu

$$K = \frac{M \times V \times f \times c \times 100}{1000 \times m}$$


kde  $M$  je molární hmotnost kyseliny vybrané pro vyjádření výsledku (viz tabulka č. 2) v g/mol,

$V$  objem použitého odměrného roztoku hydroxidu draselného v ml,

$f$  faktor odměrného roztoku hydroxidu draselného,

$c$  koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného v mol/l,

$m$  hmotnost zkušební vzorku tuku (oleje) v g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50090.1 – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti	Vydání	1
		Revize	1

## Poznámky

13 *Jestliže jsou výsledky uváděny zjednodušeně jako „kyselost“ bez další definice, jsou podle dohody vyjadřovány jako kyselina olejová. Pokud vzorek obsahuje minerální kyseliny, jsou podle dohody stanovovány jako mastné kyseliny.*

**Tabulka č. 2. Vybrané mastné kyseliny pro vyjádření kyselosti.**

Typ tuku	Vyjádřeno jako	Molární hmotnost g/mol
Kokosový olej, palmojádrový olej a podobné oleje	Kyselina laurová	200
Palmový olej	Kyselina palmitová	256
Olej z brukvovitých semen <sup>1)</sup>	Kyselina eruková	338
Všechny ostatní tuky	Kyselina olejová	282

<sup>1)</sup> V případě řepkového oleje s maximálním obsahem kyseliny erukové 5 % se kyselost vyjadřuje jako kyselina olejová

## 7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 660 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení čísla kyselosti a kyselosti.
- 2 ISO 729 Oilseeds – Determination of acidity of oils.