

PRODUKTY UBOCZNE PRZEMYSŁU OLEJARSKIEGO	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-84
	Śruty nasion oleistych	8054-04
	Oznaczenie zawartości izotiocyjanianów i 5-winylo-2-oksazolidynotyonu	Zamiast BN-72/8054-04
	metodą chromatografii gazowej	Grupa katalogowa 1549

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy jest chromatograficzna metoda oznaczania zawartości izotiocyjanianów (ITC) i 5-winylo-2-oksazolidynotyonu (WOT) w nasionach rzepaku i w poekstrakcyjnych śrutach rzepakowych.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Normę stosuje się przy oznaczaniu izotiocyjanianów: allilu, 3-butenylu, 4-pentenylu oraz 5-winylo-2-oksazolidynotyonu (WOT) w nasionach i śrutach rzepakowych.

## 2. METODA OZNACZANIA

**2.1. Zasada metody** polega na enzymatycznej hydrolizie glukozyolanów a następnie ekstrakcji uwolnionych związków rozpuszczalnikiem organicznym. Uwolnione izotiocyjaniany i 5-winylo-2-oksazolidynotyon analizuje się metodą chromatografii gazowej przy wykorzystaniu detektora płomieniowo-jonizacyjnego.

### 2.2. Aparatura i przyrządy

#### 2.2.1. Aparatura do analizy chromatograficznej

- Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym oraz programatorem temperatury.
- Kolumny szklane długości około 1,5 m i średnicy wewnętrznej  $2 \div 4$  mm.
- Mikrostrzykawkki chromatograficzne pojemności  $1,0 \div 10,0$  mm<sup>3</sup>.

#### 2.2.2. Zestaw do przygotowania wypełnienia kolumny

- Kolba okrągłodenna pojemności 750 cm<sup>3</sup> ze szlifem.
- Nasadka z dwoma tubusami.
- Łażnia wodna.
- Pompa wodna próżniowa.

#### 2.2.3. Zestaw do wykonania hydrolizy i ekstrakcji

- Buteleczki antybiotykowe pojemności 30 cm<sup>3</sup>.
- Pipety pojemności 5 cm<sup>3</sup>.
- Wytrząsarka.
- Wirówka.

### 2.3. Odczynniki, roztwory i materiały

a) Argon sprężony z butli o czystości nie mniejszej niż 99,9%.

b) Azot sprężony wg PN-71/C-84912.

c) Wodór sprężony wg PN-61/C-84908.

d) Powietrze sprężone wg PN-74/C-84913.

e) Nośniki do chromatografii gazowej: Gas Chrom Q, Chromosorb W, Supelcoport o uziarnieniu 80/100 mesh i 100/120 mesh lub równoważne.

f) Wypełnienie kolumny: 3% Apiezon L na Gas Chrom Q 100/120 mesh, 3% Dexil 300 na Supelcoportie 100/120 mesh.

g) Wzorce izotiocyjanianów (ITC):

- izotiocyjanian etylu,
- izotiocyjanian allilu,
- izotiocyjanian butylu,
- izotiocyjanian 3-butenylu,
- izotiocyjanian 4-pentenylu.

h) Palmitynian metylu stosowany jako standard wewnętrzny. Do kolby pojemności 100 cm<sup>3</sup> odważyć 10 mg palmitynianu metylu i uzupełnić do kreski chlorkiem metylenu.

i) Wzorec 5-winylo-2-oksazolidynotyonu (WOT): 200 g śruty rzepakowej nieodgoryczzonej zmieszać z 10 mg zmielonych nasion gorczyicy białej i zalać 250 cm<sup>3</sup> wody destylowanej z dodatkiem 10 mg kwasu askorbinowego. Po dokładnym wymieszaniu zawartość w kolbie pozostawić w temperaturze 25°C na 20 h. Wilgotną masę umieścić w gilzach ekstrakcyjnych i poddać ekstrakcji eterem etylowym w aparacie Soxhleta w ciągu  $4 \div 5$  h. Ekstrakt oczyścić przez 6-krotne wytrząsanie z 10 cm<sup>3</sup> porcjami nasyconego wodnego roztworu NaHCO<sub>3</sub>. Warstwy wodne odrzucić, a z warstwy eterowej ekstrahować WOT 6-krotnie porcjami wodorotlenku sodowego (2.5y). Połączone wyciągi doprowadzić do pH  $8 \div 8,5$  strumieniem CO<sub>2</sub> z butli i dalej ekstrahować 4-krotnie równą objętością eteru etylowego. Ekstrakt eterowy oczyścić przez wytrząsanie z węglem aktywnym i przesączyć przez bibułę do sączenia. Eter odparować, a oleistą pozostałość rozpuścić

Zgłoszona przez Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego  
Ustanowiona przez Dyrektora Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego dnia 1 lutego 1984 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 lipca 1984 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 4/1984 poz. 7)

w 10 cm<sup>3</sup> odwodnionego przez Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eteru etylowego i przenieść do naczynka wagowego. Ostrożnie zagęścić na łaźni wodnej do około 5 cm<sup>3</sup>.

Naczynko szczelnie zamknąć, owinąć przyklepcem i umieścić w lodówce w temperaturze -10°C. Po kilku godzinach pojawią się w naczynku kryształy WOT. Naczynko wyjąć z lodówki, zlać znad kryształów resztki eteru. Uzyskane kryształy WOT należy chronić przed wilgocią (najlepiej zatopić w ampulkach i przechowywać w lodówce).

j) Myrozynaza — enzym przygotowany z nasion gorczycy białej (*Sinapis alba*).

Przed przygotowaniem enzymu należy sprawdzić zdolność kiełkowania nasion. Używać nasiona o zdolności kiełkowania co najmniej 85%. Nasiona gorczycy dokładnie rozdrobnić i przeprowadzić pierwsze odtłuszczenie za pomocą heksanu na zimno, wykonując przemycanie próbki w kolbie stożkowej przez dekantację rozpuszczalnika. Wysuszyć śrutę częściowo odtłuszczone w temperaturze pokojowej, aby usunąć pozostałość rozpuszczalnika. Temperatura rozpuszczalnika będącego w kontakcie z nasionami nie może przekraczać 30°C. Następnie powtórnie rozdrobnić i odtłuścić śrutę w warunkach uprzednio opisanych.

Tak otrzymany enzym przechowywać w temperaturze 4°C, w szczelnie zamkniętym naczyniu szklanym, co zapewnia mu trwałość przez 6 tygodni. W przypadku braku heksanu odtłuszczać można za pomocą eteru naftowego (liczba bromowa eteru naftowego musi być niższa niż 1).

k) Mieszanina wzorcowa izotiocyjanianów i palmitynianu metylu.

Do kolby pojemności 100 cm<sup>3</sup> odważyć

- 10 mg izotiocyjanianu etylu,
- 10 mg izotiocyjanianu alilu,
- 10 mg izotiocyjanianu butylu,
- 10 mg izotiocyjanianu 3-butenylu,
- 10 mg izotiocyjanianu 4-pentenylu,
- 10 mg palmitynianu metylu

i uzupełnić chlorkiem metylenu do kreski.

l) Bufor, pH 7, handlowy lub przygotowany w następujący sposób: do 3,53 cm<sup>3</sup> roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu 19,2 g/1000 cm<sup>3</sup> wody destylowanej dodać 16,47 cm<sup>3</sup> ortofosforanu dwusodowego Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> o stężeniu 23,6 g/1000 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, ustalić pH za pomocą pehametru.

ł) Chlorek metylenu cz.d.a. destylowany znad KOH (30 g/1000 cm<sup>3</sup>). Zbierać frakcje w temperaturze 40°C.

m) Eter etylowy wolny od nadtlenczków: 1000 cm<sup>3</sup> eteru etylowego wytrząsać w rozdzielaczu z roztworem wodnym siarczanu żelazawego i kwasu siarkowego (70 g FeSO<sub>4</sub> cz.d.a. rozpuścić w 55 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, dodać 6 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stężonego).

Po rozdzieleniu odrzucić dolną warstwę, warstwę eterową wytrząsać ze 100 cm<sup>3</sup> 0,5-procentowego (m/m) roztworu nadmanganianu potasowego. Po odrzuceniu dolnej warstwy wytrząsać eter ze 100 cm<sup>3</sup> 5-procentowego (m/m) roztworu wodorotlenku sodowego a następnie przemycać wodą destylowaną z dodatkiem fenoloftaleiny, aż do zaniku odczynu zasadowego (kolor różowy).

Przemycy eter destylować znad CaCl<sub>2</sub> (150 g/1000 cm<sup>3</sup>). Zbierać frakcje wrzące w temperaturze 35 ÷ 36°C. Bezpośrednio przed użyciem sprawdzić eter na zawartość nadtlenczków. Kilka cm<sup>3</sup> eteru zmieszać z taką samą ilością świeżo przyrządzonego 2-procentowego (m/m) roztworu jodku potasowego i w obecności skrobi jako wskaźnika dodać kilka kropli kwasu solnego. Obserwować zmianę zabarwienia. W obecności nadtlenczków występuje brunatne zabarwienie.

n) Kwas siarkowy (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) stężony cz.d.a.

o) Jodek potasowy (KJ) cz.d.a. roztwór 2-procentowy (m/m).

p) Skrobia, roztwór 1-procentowy (m/m).

r) Kwas solny (HCl) stężony cz.d.a.

s) Chlorek wapniowy (CaCl<sub>2</sub>) cz.d.a.

t) Fenoloftaleina, roztwór 1-procentowy (m/V).

u) Kwaśny węgiel sodowy (NaHCO<sub>3</sub>), roztwór nasycony.

w) Kwas askorbinowy cz.d.a.

x) Heksan cz.d.a. lub eter naftowy.

y) Wodorotlenek sodowy (NaOH), roztwór o  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ .

z) Siarczan sodowy bezwodny (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) cz.d.a.

**2.4. Pobieranie próbek.** Próbkę nasion pobrać zgodnie z PN-76/R-66146, a próbkę śruty pobrać zgodnie z PN-75/R-64769.

**2.5. Przygotowanie próbki do analizy.** Nasiona rzepaku rozdrobnić, odtłuścić zgodnie z 2.3j) i wysuszyć w temperaturze 105°C do stałej masy. Śrutę rzepakową rozdrobnić i wysuszyć w temperaturze 105°C przez 16 h.

## 2.6. Wykonanie oznaczania

**2.6.1. Hydroliza enzymatyczna i ekstrakcja.** Do butelek antybiotykowych lub probówek szczelnie zamkniętych pojemności około 30 cm<sup>3</sup> odważyć około 1 g śruty z dokładnością do 0,001 g, dodać 5 cm<sup>3</sup> buforu o pH 7, 50 mg enzymu myrozynazy i 5 cm<sup>3</sup> chlorku metylenu zawierającego standard wewnętrzny (10 mg palmitynianu metylu w 100 cm<sup>3</sup> chlorku metylenu). Buteleczki lub probówki z zawartością szczelnie zamknąć i mieszać intensywnie w temperaturze pokojowej, stosując wytrząsanie mechaniczne przez 2,5 h.

W przypadku gdy hydroliza i ekstrakcja nie zapewniła rozdzielania się warstw, zawartość probówki poddać wirowaniu 6 tysięcy obrotów na minutę w ciągu 10 min. Do analizy pobrać mikrostrzykawką chromatograficzną ciecz z warstwy chlorku metylenu (dolnej) i wprowadzić do komory nastrzykowej chromatografu.

**2.6.2. Przygotowanie wypełnienia kolumny 3%** Apiezon L na Gas Chrom Q 100 (120 mesh). Odważyć 0,45 g fazy stacjonarnej, rozpuścić w niewielkiej ilości chlorku metylenu i przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej pojemności 750 cm<sup>3</sup>. Ilość użytego chlorku metylenu nie powinna przekraczać 150 cm<sup>3</sup>. Następnie odważyć 14,55 g nośnika i wsypywać małymi porcjami do roztworu fazy stacjonarnej mieszając zawartość kolby ruchem kolistym. Kolbę zamknąć nasadką, podłączyć do pompki próżniowej, umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 40°C i ciągle mieszając odparować rozpuszczalnik. Po usunięciu rozpuszczalnika, gdy

wypełnienie jest suche, sypkie i nie przykleja się do ścianek kolby, należy umieścić je na płytce Petriego i pozostawić w temperaturze pokojowej w celu usunięcia śladów rozpuszczalnika.

**2.6.3. Napełnienie kolumny chromatograficznej.** Jeden koniec kolumny zabezpieczyć tamponikiem z waty szklanej silanizowanej i podłączyć do pompki próżniowej, natomiast przez drugi koniec kolumny wysypywać małymi porcjami wypełnienie. Podczas napełniania ubijać wypełnienie za pomocą wibratora mechanicznego. Po całkowitym napełnieniu kolumny odłączyć ją od pompki próżniowej, zatkać drugi koniec watą szklaną silanizowaną i podłączyć do aparatu. Kolumnę kondycjonować w temperaturze 230°C przy przepływie gazu nośnego 30 cm<sup>3</sup> na minutę w ciągu 72 h.

**2.6.4. Wykonanie analizy chromatograficznej.** Optymalne parametry pracy chromatografu:

— temperatura kolumny: izoterma 80°C przez 3 min, następnie liniowy wzrost temperatury z szybkością 8°C na min do 240°C w ciągu 10 min, izoterma końcowa,

— temperatura detektora 250°C,

— temperatura komory nastrzykowej 230°C,

— gaz nośny: Argon, szybkość przepływu 30 cm<sup>3</sup> na min,

— gazy pomocnicze:

— wodór, szybkość przepływu 30 cm<sup>3</sup> na min,

— powietrze, szybkość przepływu 300 cm<sup>3</sup> na min,

— wielkość dozowanej próbki od 1,0 do 3,0 mm<sup>3</sup>.

Po ustaleniu wymaganych warunków wprowadzić badaną próbkę za pomocą mikrostrzykawki na kolumnę chromatograficzną. Otrzymane na chromatogramie piki powinny być symetryczne i dobrze rozdzielone, a w przypadku płynięcia linii podstawowej lub asymetrycznych pików kolumnę należy dodatkowo kondycjonować.

## 2.7. Obliczanie wyników oznaczania

**2.7.1. Interpretacja jakościowa chromatogramu.** Interpretację jakościową chromatogramów przeprowadzić przez porównanie czasów retencji poszczególnych pików badanej próbki z czasami retencji pików odpowiednich substancji wzorcowych, przy czym obie analizy chromatograficzne muszą być wykonane w takich samych warunkach.

**2.7.2. Interpretacja ilościowa chromatogramu.** Interpretację ilościową wykonać wyliczając powierzchnię piku dla każdego składnika metodą trójkątów lub jako iloczyn wysokości piku i jego szerokości w połowie wysokości. Zawartość izotiocyjanianów allilu, 3-butenyłu, 4-pentenylu oraz 5-winylo-2-oksazolidynotyonu względem palmitynianu metylu obliczyć w procentach wg wzoru

$$X = \frac{P_z \cdot W_k}{P_s \cdot m} \cdot 0,5$$

w którym:

$P_z$  — powierzchnia piku badanego, mm<sup>2</sup>,

$P_s$  — powierzchnia piku standardu wewnętrznego, mm<sup>2</sup>,

$W_k$  — współczynnik korekcyjny, który dla izotiocyjanianu allilu, izotiocyjanianu 3-butenyłu, izotiocyjanianu 4-pentenylu wynosi 2, a dla 5-winylo-2-oksazolidynotyonu wynosi 2,5,

$m$  — odważka (g),

0,5 — współczynnik wynikający ze stężenia roztworu standardu wewnętrznego (0,5 mg palmitynianu metylu w 5 cm<sup>3</sup> chlorku metylenu).

Przy obliczaniu wyników należy postępować zgodnie z PN-70/N-02120 p. 2 oraz każdorazowo określać warunki wynikające z 2.6.4, w jakich była wykonana analiza.

**2.7.3. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik końcowy oznaczania należy przyjąć średnią arytmetyczną dwóch równoległych oznaczeń. Różnica pomiędzy równoległymi oznaczeniami wyrażona błędem względnym nie może przekraczać wartości podanych w tablicy.

Składnik	Dopuszczalna wartość błędu względnego, % ( $\frac{x_1 - x_2}{\bar{x}} \cdot 100$ )
Suma izotiocyjanianów	14
5-winylo-2-oksazolidynotyonu	22

## K O N I E C

### INFORMACJE DODATKOWE

**1. Instytucja opracowująca normę** — Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa.

**2. Istotne zmiany w stosunku do BN-72/8054-04.** Zarówno izotiocyjaniany (ITC), jak i winylo-2-oksazolidynotyon (WOT) są oznaczane z jednej próbki metodą chromatografii gazowej.

### 3. Normy związane

PN-61/C-84908 Wodór techniczny sprężony

PN-71/C-84912 Azot sprężony techniczny

PN-74/C-84913 Powietrze sprężone

PN-70/N-02120 Zasady zaokrąglania i zapisywania liczb

PN-75/R-64769 Pasze. Pobieranie próbek

PN-76/R-66146 Ziarno roślin oleistych. Pobieranie próbek i przygotowywanie próbki laboratoryjnej

### 4. Normy międzynarodowe

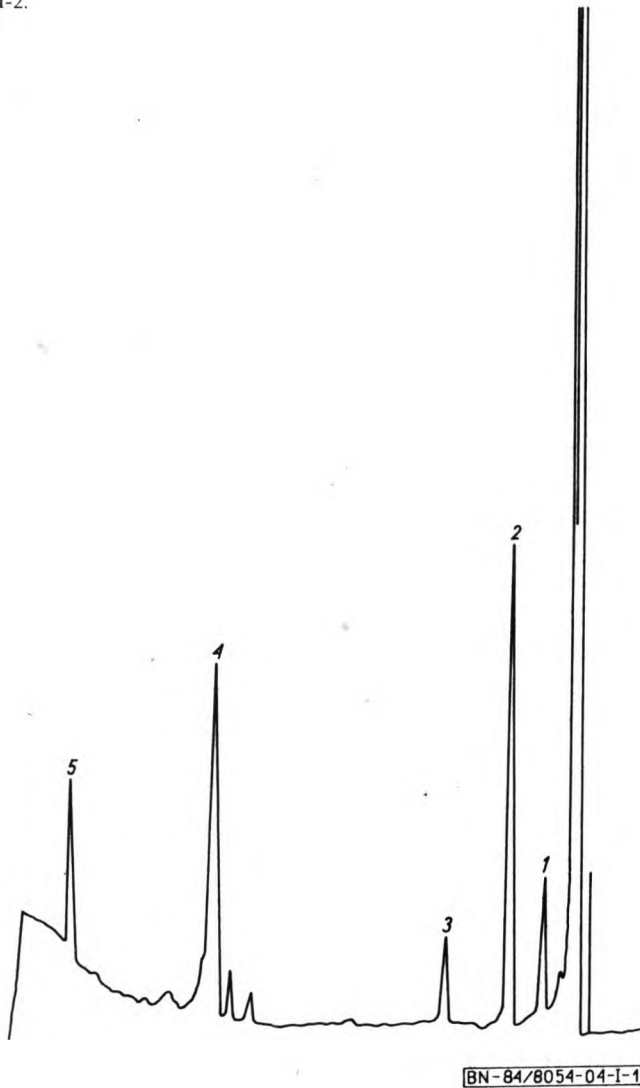
ISO 5504 Oilseeds and oilseed residues — Determination of isothiocyanates and vinyl thiooxazolidone

5. Autorzy projektu normy — dr inż. B. Kłossowska, dr inż. M. Obiedziński, inż. M. Wawrzyniewicz — Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego. Warszawa.

6. Względne czasy retencji

Wypełnienie kolumny	3% Apiezon L na Gas Chrom Q	3% Dexil 300 na Supelcoporcie
Związek	100/120 mesh	100/120 mesh
ITC — allilu	92,0	86,0
ITC — 3-butenylu	84,0	80,6
ITC — 4-pentenylu	72,0	70,2
WOT — 5-winylo-2- -oksazolidynotyonu	29,5	20,5

7. Przykładowe rozdziály chromatograficzne — wg rys. 1-1 i rys. 1-2.



Rys. 1-1



Rys. 1-2

#### **Sprostowanie do BN-84/8054-04**

W punkcie 2.7.2 (str. 3) zamieszczony wzór powinien mieć następującą postać:

$$X = \frac{P_z \cdot W_k}{P_s \cdot m} \cdot 0,05$$

W INFORMACJACH DODATKOWYCH (str. 4) p. 7 powinien mieć następującą treść:

**7. Przykładowe rozdziały chromatograficzne** — wg rys. I-1 w kolumnie z wypełnieniem 3% Apiezon L na Gas Chrom Q 100/120 mesh oraz wg rys. I-2 w kolumnie z wypełnieniem 3% Dexil 300 na Supelcoporcie 100/120 mesh.