

PRODUKTY UBOCZNE PRZEMYSŁU OLEJARSKIEGO	NORMA BRANŻOWA	BN-72
	Śruty nasion oleistych	8054-04
	Oznaczanie zawartości izotiocyjanianów i 5-winylo-2-oksazolidynotyonu	Grupa katalogowa XV 49

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest metoda oznaczania zawartości izotiocyjanianów i 5-winylo-2-oksazolidynotyonu w poekstrakcyjnych śrutach rzepakowych.

1.2. Zakres stosowania przedmiotu normy. Normę stosuje się przy oznaczaniu ITC i OZT w poekstrakcyjnych śrutach rzepakowych odgoryczonych i nieodgoryczonych.

1.3. Określenia

1.3.1. Izotiocyjaniany — ITC — lotne, organiczne związki siarki, tworzące się przez hydrolizę enzymatyczną tioglikozydów występujących w nasionach i śrutach z nasion roślin krzyżowych.

1.3.2. 5-winylo-2-oksazolidynotyon — OZT — lotny, cykliczny związek siarki, tworzący się przez hydrolizę enzymatyczną tioglikozydów występujących w nasionach i śrutach z nasion roślin krzyżowych.

1.4. Normy związane

PN-63/C-13011 Szlify stożkowe złącz szklanych
PN-70/N-02120 Zasady zaokrąglania i zapisywania liczb

PN-69/R-64769 Pasze. Pobieranie próbek i przygotowanie średniej próbki laboratoryjnej

2. METODY OZNACZANIA

2.1. Zasada oznaczania. Zasada metody polega na enzymatycznym uwolnieniu izotiocyjanianów i 5-winylo-2-oksazolidynotyonu z tioglikozydów, wydestylowaniu lotnych z parą wodną izotiocyjanianów, które w środowisku amoniakalnym tworzą nietrwałe tiomoczniki reagujące ilościowo z azotanem srebra. Nadmiar azotanu srebra odmiareczkowuje się roztworem rodanku amonowego.

5-winylo-2-oksazolidynotyon, pozostały w roztworze po wydestylowaniu izotiocyjanianów, ekstrahuje się eterem etylowym i oznacza spektrofotometrycznie w zakresie 220÷270 mμ.

2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

a) Młynek szybkoobrotowy.

b) Wirówka o obrotach około 2000 obrotów/min z kompletem probówek o pojemności 100 ml każda.

c) Lodówka.

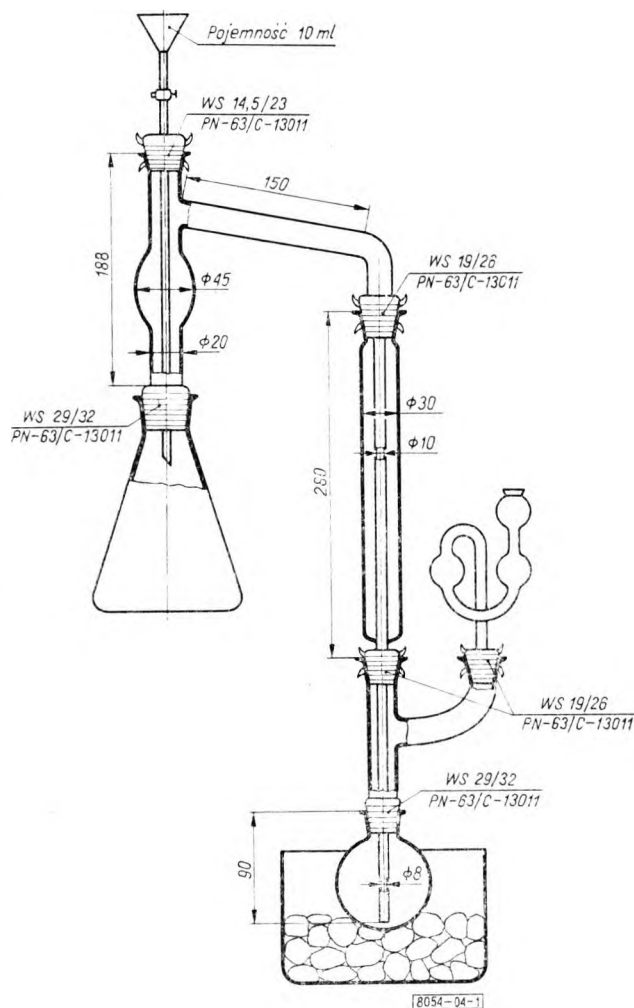
d) Pehametr.

e) Łażnia wodna kilkustanowiskowa.

f) Ciepłarka z termostatem.

g) Spektrofotometr na zakres nadfioletu z kompletem kuwet kwarcowych, z korkiem szlifowym, o długości drogi optycznej równej 1 cm.

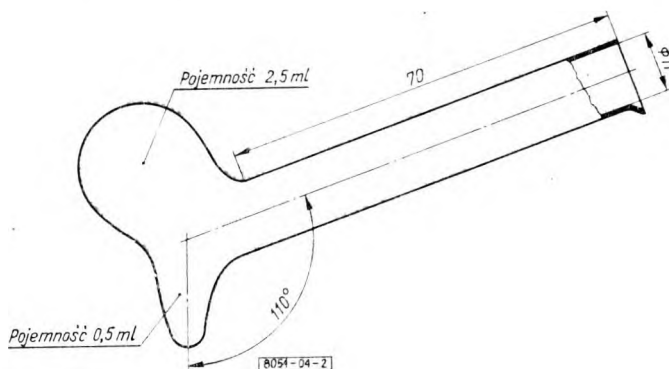
h) Zestaw do destylacji — wg rys. 1.



Rys. 1. Zestaw do destylacji izotiocyjanianów

Zjednoczenie Przemysłu Olejarskiego
Ustanowiona przez Dyrektora ZPO dnia 2 marca 1972 r. jako norma obowiązująca
w zakresie czynności objętych normą od dnia 1 stycznia 1973 r.
(DZ. Norm. i Miar nr 4/1972 poz. 6)

- i) Kolby stożkowe ze szlifem 29/32 o pojemności 500 ml, z korkiem.
- j) Kolby kuliste ze szlifem 29/32 o pojemności 250 ml.
- k) Chłodnice powietrzne ze szlifem 29/32.
- l) Kryształizatory o średnicy 14 cm.
- ł) Kolby pomiarowe ze szlifem o pojemności 100 ml.
- m) Ekstraktorki — wg rys. 2.



Rys. 2 Ekstraktorka do ekstrakcji winylotiooksazolidonów

- n) Rozdzielacz o pojemności 1000 ml.
- o) Kolba z dnem płaskim o pojemności 1000 ml.
- p) Butla z ciemnego szkła.
- r) Zestaw do destylacji eteru.
- s) Kaolin porowaty, grudki średnicy 3÷4 mm.
- t) Lód.
- u) Smar do szlifów beztluszczowy: 9 g skrobi cz.d.a. rozpuścić w 20 g glikolu ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) cz.d.a. i gotować, ciągle mieszając na palniku gazowym 0,5 godz.
- w) Gorczyca.
- z) Sączki bibułowe (Filtrak nr 388).

2.3. Odczynniki i roztwory

- a) Bufor cytrynianowy — 168 g kwasu cytrynowego $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ cz.d.a. rozpuścić w 4 l wody destylowanej i przez dodanie nasyconego roztworu ługu sodowego (NaOH) doprowadzić do pH 4.
- b) Amoniak (NH_4OH) cz.d.a. roztwór wodny 10-procentowy.
- c) Azotan srebra (AgNO_3) cz.d.a., roztwór wodny 0,1n.
- d) Alkohol etylowy ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 70-, 90- i 95-procentowy.
- e) Rodanek amonowy (NH_4CNS) cz.d.a., roztwór wodny 0,1n.
- f) Siarczan żelazowoamonowy ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), cz.d.a., roztwór wodny 8-procentowy.
- g) Kwas azotowy (HNO_3) cz.d.a., roztwór wodny 6n.

h) Toluen ($\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_3$) cz.d.a.

i) Roztwór enzymu około 100 g gorczycy białej umieścić w młynku szybkoobrotowym i rozdrabniać przez 30 sek. 100 g rozdrobnionych nasion odważyć z dokładnością do 1 g, przenieść do kolby stożkowej pojemności 500 ml i dodać 300 ml wody destylowanej o temperaturze pokojowej, a następnie wymieszać, zakryć korkiem i pozostawić w spokoju na 1 godz w temperaturze pokojowej.

Po upływie 1 godz mieszaninę poddać wirowaniu (wyważając starannie próbówki) w czasie 10 min przy około 2000 obrotów na 1 min. Zebrać odwirowaną ciecz do cylindra pomiarowego pojemności 250 ml. Osad odrzucić.

Roztwór przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml i zadać równą objętością 90-procentowego alkoholu etylowego w celu wytrącenia enzymu. Uzyskuje się łącznie 350÷400 ml mieszaniny zawierającej osad. Mieszaninę poddać wirowaniu napełniając tylko 2 próbówki wirówki w celu uniknięcia strat enzymu.

Zdekantować i odrzucić klarowny płyn, a do osadu dodać 200 ml 70-procentowego alkoholu etylowego, wymieszać i mieszaninę ponownie poddać wirowaniu. Klarowną ciecz odrzucić.

Osad z obu próbek przenieść do kolby stożkowej pojemności 300 ml i zadać 100 ml wody destylowanej o temperaturze pokojowej, wymieszać i pozostawić na 1,2 godz w temperaturze pokojowej. Roztwór przesączyć przez sączek z bibuły. Sączek z osadem odrzucić.

W celu konserwacji roztworu enzymu dodać 1 ml toluenu.

Roztwór należy przechowywać w lodówce w temperaturze $+4^\circ\text{C}$, co zapewnia trwałość preparatu przez 5 dni.

j) Nadmanganian potasowy (KMnO_4) cz.d.a., roztwór wodny 0,5-procentowy.

k) Kwas siarkowy (H_2SO_4) cz.d.a., stężony.

l) Roztwór siarczanu żelazowego (FeSO_4) cz.d.a.: 30 g siarczanu żelazowego rozpuścić w 55 ml wody destylowanej i dodać 1,7 ml stężonego kwasu siarkowego.

ł) Jodek potasowy (KJ) cz.d.a., roztwór wodny 2-procentowy.

m) Roztwór skrobi 1-procentowy.

n) Kwas solny (HCl) cz.d.a. stężony.

o) Siarczan sodowy bezwodny (Na_2SO_4) cz.d.a.

p) Chlorek wapniowy (CaCl_2) cz.d.a.

r) Fenoloftaleina, roztwór 1-procentowy.

s) Eter etylowy wolny od nadtlenu — 1000 ml eteru wytrząsać w rozdzielaczu z 20 ml roztworu siarczanu żelazowego, a następnie trzykrotnie z 0,5-procentowym roztworem nadmanganianu potasowego w porcjach po 15 ml każda.

Po oddzieleniu dolnej warstwy wytrząsać eter

z 15 ml 5-procentowego roztworu wodorotlenku sodowego, a następnie przemywać wodą destylowaną z dodatkiem jednej kropli fenoloftaleiny, aż do zaniku odczynu zasadowego (kolor różowy). Przemity eter przelać do kolby z dnem płaskim, dodać około 200 g chlorku wapniowego i odstawić na 24 godz. Po tym czasie eter przesączyć przez sączek bibułowy do butli z ciemnego szkła, w której znajduje się bezwodny siarczan sodowy.

Osuszony eter należy przedestylować odbierając frakcje wrzące w temperaturze 34÷36°C.

Bezpośrednio przed użyciem należy każdorazowo sprawdzić eter na zawartość nadtlenu. W tym celu kilka ml eteru mieszać z taką samą ilością świeżo przyrządzonego 2-procentowego roztworu jodku potasowego (KJ), a następnie wobec roztworu skrobi jako wskaźnika dodać kilka kropli kwasu solnego i obserwować zmianę zabarwienia. W obecności nadtlenu występuje wyraźne zabarwienie brunatne.

t) Wzorzec 5-winylo-2-oksazolidynotyonu.

2.4. Przygotowanie próbki do badania. Próbkę śrutę pobrać zgodnie z PN-69/R-64769.

Śrutę przeznaczoną do analizy umieścić w młynku szybkoobrotowym (np. Komet) i rozdrabniać przez 15 sek. Rozdrobniona śruta powinna przechodzić przez sito o oczkach 1 mm.

2.5. Oznaczanie izotiocyanianów

2.5.1. Wykonanie oznaczania. Odważyć około $2 \pm 0,1$ g rozdrobnionej śrutę i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem o pojemności 500 ml. Kolba ta jest jednocześnie kolbą destylacyjną. Do śrutę w kolbie destylacyjnej dodać kolejno 100 ml buforu cytrynianowego i 3 ml roztworu enzymu, następnie zamknąć kolbę szczelnie korkiem ze szlifem odpowiednio nasmarowanym smarem beztłuszczowym i starannie wymieszać zawartość przez wstrząsanie.

Kolbę wstawić na 16 godz do ciepłarki o temperaturze 25°C lub na 3 godz do ciepłarki o temperaturze 40°C. Próbki należy co pewien czas mieszać przez wstrząsanie.

Przy stosowaniu ciepłarki o temperaturze 40°C należy po kilku minutach otworzyć na chwilę kolbę, gdyż inaczej rozgrzewające się powietrze może wypchnąć korek.

Przed upływem czasu termostatowania próbek należy przygotować zestaw do destylacji. W tym celu do odbieralnika, którym jest kolba kulista ze szlifem o pojemności 250 ml, wprowadzić za pomocą pipety 10 ml 0,1n azotanu srebra i 2,5 ml 10-procentowego amoniaku.

Odbieralnik połączyć z aparaturą destylacyjną i zanurzyć w wodzie z lodem.

Rurka doprowadzająca destylat powinna być zanurzona w roztworze azotanu srebra z amoniakiem.

Po upływie oznaczonego czasu wyjąć z ciepłarki kolbę ze śrutą, dodać do niej kilka ziarn porowatego kaolinu w celu ułatwienia destylacji i połączyć szczelnie z aparaturą destylacyjną. Przez lejek w zestawie destylacyjnym dodać do kolby stożkowej 10 ml 95-procentowego alkoholu etylowego, a do rurki fermentacyjnej 3 ml 95-procentowego alkoholu etylowego. Niezwłocznie rozpocząć destylację, którą należy prowadzić aż do momentu zebrania 70 ml destylatu w odbieralniku.

Należy zwrócić uwagę na pienienie się zawartości kolby oraz na zasysanie destylatu do chłodnicy.

Odłączyć odbieralnik od zestawu, wlać do niego alkohol znajdujący się w rurce fermentacyjnej, zamknąć odbieralnik chłodnicą powietrzną i ogrzewać przez 30 min na wrzącej łaźni wodnej.

Odbieralnik ochłodzić w zimnej wodzie, zawartość przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić wodą destylowaną do kreski, po czym przefiltrować przez sączek z bibuły (Filtrak nr 388). 25 ml przesącza pobrać i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 100 ml, dodać do niej 1 ml 6n kwasu azotowego oraz 0,5 ml roztworu siarczanu żelazowo-amonowego. Odmiareczkować nadmiar azotanu srebra za pomocą 0,01n rodanku amonowego do trwałej barwy jasnołososiowej.

W przypadku oznaczania wyłącznie izotiocyanianów zawieszinę pozostałą po destylacji odrzucić, a kolbę destylacyjną, po jej starannym umyciu, napełnić do połowy objętości wodą destylowaną i ponownie połączyć z zestawem destylacyjnym. Prowadzić destylację wody przez 15 min w celu dokładnego oczyszczenia zestawu. Równocześnie za pomocą waty nawiniętej na drucik lub specjalnej szczoteczki oczyścić wylot rurki odprowadzającej destylat. Tak przygotowany zestaw jest przygotowany do dalszego użytkowania. Przy ciągłym użytkowaniu należy co kilka dni starannie przesmarować wszystkie szlify zestawu.

Równoległe z oznaczaniem właściwym należy wykonać próbę ślepa. W tym celu do kolby destylacyjnej należy wprowadzić 100 ml buforu cytrynianowego i 3 ml roztworu enzymu. Hydrolizę, destylację i dalsze czynności wykonywać w sposób identyczny jak przy oznaczaniu właściwym.

2.5.2. Obliczanie wyników. Zawartość izotiocyanianów ITC w przeliczeniu na butenyloizotiocyanian obliczyć w procentach wg wzoru

$$ICT = \frac{(a - 0.1 \cdot b \cdot 4) \cdot 0,005659 \cdot 100}{m}$$

w którym:

- a — objętość 0,1n roztworu azotanu srebra użyta do reakcji, ml,
- $b = b' - b''$,
- b' — objętość 0,01n roztworu rodanku amonowego użyta do miareczkowania badanej próby, ml,
- b'' — wartość wynikająca z różnicy: 25 minus objętość (ml) 0,01n roztworu rodanku amonowego użytego do miareczkowania ślepej próby,
- m — odważka śruty, g,
- 0,005659 — współczynnik wynikający z przeliczeń stechiometrycznych — 1 ml 0,1n roztworu azotanu srebra odpowiada 0,005659 g butenylizotiocyanianu.

2.6. Oznaczania 5-winylo-2-oksazolidynotyonu

2.6.1. Wykonanie oznaczania. Zawiesinę, pozostałą w kolbie destylacyjnej po oddestylowaniu izotiocyanianów, należy przesączyć przez sączek bibułowy (Filtrak nr 388) do zlewki o pojemności 100 ml. Filtrat doprowadzić za pomocą 1n roztworu wodorotlenku sodowego do pH 10,5, po czym roztwór przenieść ilościowo do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Zlewkę przemyć kilkakrotnie małymi porcjami wody destylowanej. Z kolby pomiarowej odpipetować 1,0 ml roztworu i umieścić w ekstraktorku.

Ekstrahować czterokrotnie eterem wolnym od nadtlenców, biorąc każdorazowo do ekstrakcji po 2 ml. Warstwę wodną odrzucić, a połączone ekstrakty eterowe umieścić w kolbie pomiarowej o pojemności 10 ml i uzupełniać eterem etylowym do kreski.

Do jednej kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm wprowadzić badany ekstrakt eterowy, do drugiej eter etylowy wolny od nadtlenców. Kuwety zamknąć korkami ze szlifem i umieścić w spektrofotometrze.

Wykonać pomiar absorpcji badanej próbki wobec eteru etylowego jako ślepej próby, w zakresie 220÷270 m μ . OZT w roztworze eterowym wykazuje największą absorpcję przy długości fali 248 m μ .

Wielkość absorpcji odczytać z wykresu absorpcji uwzględniając absorpcję tła. W tym celu poprowadzić linię tła przez najmniejsze wartości absorpcji przy długościach fal 230 i 266 m μ .

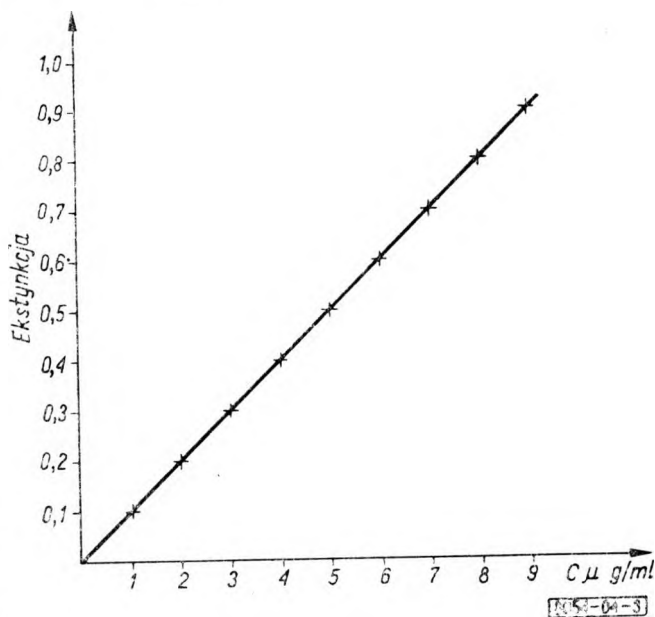
Jeżeli skala spektrofotometru wycechowana jest w jednostkach transmitancji (przepuszczalności) wówczas do przeliczenia na absorpcję najlepiej posłużyć się odpowiednimi tablicami dostępnymi między innymi w Kalendarzu Fizyko-chemicznym lub też zastosować wzór

$$A = \lg \frac{100}{T} = 2 - \log T$$

w którym:

- A — absorpcja,
- T — transmitancja.

Równoległe z wykonaniem pomiaru absorpcji próbki badanej sporządzić krzywą wzorcową używając eterowy roztwór OZT w odpowiednich stężeniach. Ponieważ OZT jest związkem trudno dostępnym w stanie czystym, można posłużyć się krzywą wzorcową wg rys. 3 z zastrzeżeniem, że spektrofotometr będzie uprzednio sprawdzony pod względem właściwej rejestracji długości fali jak też czułości.



Rys. 3. Krzywa wzorcową dla 5-winylo-2-oksazolidynotyonu

2.6.2. Obliczanie wyników. Na podstawie zmierzonej absorpcji próbki badanej, uwzględniającej absorpcję tła, odczytać z krzywej wzorcowej stężenie OZT.

Zawartość OZT obliczyć w procentach wg wzoru

$$\text{OZT} = 0,05 C$$

w którym:

- C — stężenie odczytane z wykresu,
- 0,05 — współczynnik uwzględniający odważkę, rozcieńczenie i grubość kuwety.

2.7. Liczba oznaczeń. Należy wykonać co najmniej dwa równoległe oznaczenia.

2.8. Różnica między wynikami. Dopuszczalna różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń może wynosić 0,03%, gdy zawartość ITC i OZT jest niższą od 0,3%, a 0,05%, gdy zawartość ITC i OZT jest wyższą od 0,3%.

Wyniki zaokrąglić do drugiego miejsca po przecinku i interpretować zgodnie z PN-70/N-02120 Metoda Z.

3 **BN-72/8054-04 Śruty nasion oleistych. Oznaczanie zawartości izotiocyjanianów i 5-wi- poprawka 1**
nylo-2-oksazolidynionu
XV 49

W punkcie 2.5.2. **Obliczanie wyników**, zamiast: wzoru:
 $b = b' - b''$, powinno być: $b = b' + b''$.

(Biuletyn PKNiM nr 7/78 poz. 68)