

WYROBY PRZEMYSŁU OLEJARSKIEGO	N O R M A B R A N Ż O W A	BN-80
	Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych w roślinnych tłuszczach jadalnych i w nasionach rzepaku metodą chromatografii gazowej	8050-05
		Zamiast BN-72/8050-05
		Grupa katalogowa XII 69

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest metoda oznaczania składu kwasów tłuszczowych w roślinnych tłuszczach jadalnych oraz w nasionach rzepaku z uwzględnieniem odmian niskoerukowych. Metoda polega na zastosowaniu chromatografii gazowej do analizowania estrów metylowych kwasów tłuszczowych.

1.2. Zakres stosowania. Normę należy stosować do oznaczania składu kwasów tłuszczowych w ciekłych i stałych tłuszczach roślinnych, takich jak: olej rzepakowy, sojowy, słonecznikowy, palmowy itp. oraz w margarynie, jak również do oznaczania składu kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku bez względu na zawartość w nim kwasu erukowego, przy czym naważka nasion powinna wynosić co najmniej 10 g. Metoda nie obejmuje kwasów tłuszczowych o liczbie atomów węgla poniżej 6 oraz kwasów tłuszczowych z grupami funkcyjnymi epoksy-, hydroksy-, hydroperoksy-, keto-, cyklopropylo-, cyklopropyleno-. Metody nie należy stosować do oznaczania kwasów tłuszczowych wielonienasyconych o wiązaniach podwójnych skumulowanych, jak również do kwasów tłuszczowych z wiązaniami potrójnymi.

1.3. Określenia

1.3.1. Chromatogram — zapis sygnałów detektora przedstawiający zmiany składu w eluacie wypływającym z kolumny jako funkcję czasu lub objętości gazu nośnego.

1.3.2. Pik — zapis sygnału detektora przedstawiający rozkład stężenia lub masy eluowanej substancji w gazie przenoszącym jako funkcję czasu.

1.3.3. Nośnik — materiał sypki, porowaty, na którym osadzona jest faza ciekła w postaci cienkiej warstewki. Rolę nośnika może spełniać wewnętrzna ścianka kolumny, zwłaszcza kapilarnej.

1.3.4. Faza nieruchoma — ciecz lub aktywne ciało stałe (adsorbent) lub adsorbent pokryty cieczą. Faza ciekła pokrywa nośnik warstwą cienkiego filmu.

1.3.5. Gaz nośny — faza ruchoma przenosząca składniki próbki przez kolumnę oraz z kolumny do detektora.

1.3.6. Wypełnienie kolumny — nośnik pokryty fazą nieruchomą lub adsorbent wypełniający kolumnę lub faza pokrywająca ścianki kolumny kapilarnej.

1.3.7. Rozdzielczość kolumny chromatograficznej — iloraz różnicy czasów retencji dwóch substancji pomnożony przez 2 i sumy szerokości odpowiadających im pików przy podstawie. Rozdzielczość obliczać wg wzoru

$$R = \frac{2(OA' - OA)}{B'C' + BC} \quad (1)$$

w którym:

OA' — czas retencji dla pierwszego pików,

OA — czas retencji dla drugiego pików,

$B'C'$ — szerokość pierwszego pików,

BC — szerokość drugiego pików.

1.3.8. Sprawność kolumny — liczba pól teoretycznych, przypadających na jednostkę długości, najczęściej na 1 m. Liczbę pól teoretycznych obliczać wg wzoru

$$n = 16 \left(\frac{OA'}{B'C'} \right) \quad (2)$$

w którym:

OA' — czas retencji pików,

$B'C'$ — szerokość tego pików przy podstawie.

1.3.9. Błąd względny wyniku oznaczania (%) — iloraz różnicy wyników dwóch równoległych oznaczeń i wartości średniej arytmetycznej tych wyników pomnożony przez 100. W przypadku wykonywania większej liczby oznaczeń zamiast różnicy wartości wyników należy obliczać odchylenie standardowe.

2. METODA OZNACZANIA

2.1. Zasada metody polega na ekstrakcji eterem oleju z nasion rzepaku, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika — na hydrolizie alkalicznej. Oleje i tłuszcze wydzielone z margaryny poddaje się bezpośrednio hydrolizie alkalicznej. Uwolnione z glicerydów kwasy tłuszczowe przeprowadza się w estry metylowe. Otrzymane estry analizuje się metodą chromatografii gazowej. Na podstawie wykonanej analizy chromatograficznej przeprowadza się jakościową i ilościową ocenę składu kwasów tłuszczowych oleju w badanej próbce.

Zgłoszona przez Zjednoczenie Przemysłu Olejarskiego
Ustanowiona przez Naczelnego Dyrektora Zjednoczenia Przemysłu Olejarskiego dnia 15 kwietnia 1980 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 października 1980 r. (Dz. Norm. i Miar nr 11/1980 poz. 50)

2.2. Aparaty i przyrządy

- a) Chromatograf gazowy z detektorem płomienio-jonizacyjnym wraz z wyposażeniem.
 - b) Kolumna chromatograficzna o długości około 1,5 m. Zalecane jest stosowanie kolumn szklanych. Można stosować również kolumny kapilarne pokryte fazą polarną.
 - c) Mikrostrzykawka chromatograficzna umożliwia-jąca wprowadzenie próbek o objętości od 0,001 do 0,01 cm³.
 - d) Waga półanalityczna o dokładności 0,001 g.
 - e) Łaźnia powietrzna z termoregulacją w zakresie do 100°C.
 - f) Zestaw szklany do destylacji rozpuszczalników.
 - g) Zestaw szklany do nasycania metanolu chlorowodem.
 - h) Zestaw szklany do wkraplania chlorku tionylu do metanolu.
 - i) Moździerze porcelanowe do ucierania nasion rzepaku.
 - j) Pipety pojemności 1, 2, 5 cm³ z podziałką.
 - k) Gruszki gumowe lub inne przyrządy do napełniania pipet.
 - l) Ampułki szklane pojemności 5 cm³.
 - m) Kolumienki szklane do ekstrakcji oleju z nasion rzepaku (długość około 25 ÷ 50 mm, średnica około 15 ÷ 20 mm, zaopatrzone w kran lub spiek szklany).
 - n) Statyw do przeprowadzenia ekstrakcji oleju z kolumienek do ampulek.
 - o) Kolby kuliste pojemności 750 ÷ 1000 cm³.
- ## 2.3. Odczynniki i roztwory
- a) Azot, argon lub hel o czystości określonej wyma-ganiami w instrukcji obsługi chromatografu gazowego.
 - b) Wodór o czystości określonej wymaganiami w in-strukcji obsługi chromatografu gazowego.
 - c) Tlen lub powietrze o czystości określonej wyma-ganiami w instrukcji obsługi chromatografu gazowego.
 - d) Nośniki do chromatografii gazowej przemylwane kwasem, a w niektórych przypadkach również silanizo-wane w zależności od stosowanej fazy stacjonarnej. Rozdrobnienie zależne od średnicy kolumny w zakresie 80 ÷ 100 mesh lub 100 ÷ 120 mesh.
 - e) Fazy stacjonarne: poliestrowe lub organo-siliko-nowe, przy czym zaleca się stosowanie następujących wypełnień:
 - 10% Apolar 5CP na Gas Chrom Q, 100 ÷ 120 mesh,
 - 10% BDS na Diatomite C(AW), 100 ÷ 120 mesh,
 - 5% BDS + 5% DEGS na Chromosorbie W(AW), 100 ÷ 120 mesh.
 - f) Eter etylowy cz.d.a. Może być stosowany eter o niższej czystości, po uprzednim oczyszczeniu na drodze destylacji.
 - g) Chloroform cz.d.a. do przygotowania wypełnień chromatograficznych (wymienionych w poz. e). Może być stosowany odczynnik o niższym stopniu czystości po uprzednim oczyszczeniu na drodze destylacji.
 - h) Izooktan cz.d.a. Można stosować odczynnik o niższym stopniu czystości po uprzednim oczyszczeniu na drodze destylacji.

- i) Wata odtłuszczona eterem etylowym w aparacie Soxhleta.
 - j) Metanol cz.d.a. zawierający nie więcej niż 0,5% wody.
 - k) Piasek przemylwany stężonym kwasem solnym i azotowym na gorąco, płukany wodą destylowaną do odczynu obojętnego, a następnie suszony. Zaleca się ogrzewanie mieszaniny piasku z kwasami pod chłodnicą zwrotną przez około 8 h.
 - l) Wodorotlenek sodowy cz.d.a.
 - m) Chlorek tionylu cz.d.a.
 - n) Kwas siarkowy cz.d.a.
 - o) Chlorek sodowy cz.d.a.
 - p) Wodorotlenek potasowy 0,5N roztwór w meta-nolu.
 - r) Trójfluorek borowy, roztwór około 14-procento-wy w metanolu (v/v). Trójfluorek borowy jest substan-cją silnie toksyczną. Należy go stosować w wyjątko-wych przypadkach w razie braku innych odczynników do estryfikacji. W czasie pracy z tym odczynnikiem należy zachować środki ostrożności przewidziane w przepisach bhp. Roztwory metanolowe BF₃ przechowywać w szczelnie zamkniętych naczyniach z ciemnego szkła w temperaturze 0 ÷ 6°C. Trwałość tego roztworu nie przekracza 6 miesięcy.
 - s) Chlorowodór, roztwór w metanolu około 4-pro-centowy (v/v).
 - t) Chlorek tionylu, roztwór w metanolu około 2-procentowy (v/v).

Roztwory chlorowodoru i chlorku tionylu w meta-nolu przechowywać nie dłużej niż 7 dni w warunkach takich, jak dla MeOH-BF₃.
 - u) Kwas siarkowy, roztwór w metanolu w stosunku 2:10.
 - w) Chlorek sodowy, nasycony roztwór.
- ## 2.4. Przygotowanie próbki do analizy
- ### 2.4.1. Przygotowanie próbki analitycznej nasion rzepaku.
- Średnią próbkę laboratoryjną przygotować wg PN-76/R-66146 i pobrać z niej co najmniej 10 ± 0,1 g. Naważkę zmielić w młynku (bez piasku) lub utrzeć w moździerzu z piaskiem w stosunku 1:2.
- ### 2.4.2. Przygotowanie próbki tłuszczów jadalnych.
- Próbkę pobraną wg PN-76/A-86910 przygotować wg PN-76/A-86911. Do ampułki pojemności 5 cm³ prze-nieść 10 ÷ 50 mg tłuszczu. Dalej postępować wg 2.6.
- ## 2.5. Ekstrakcja oleju z próbki rzepaku.
- W kolumnie ekstrakcyjnej umieścić najpierw tampon waty, a następ-nie 6 ± 0,1 g mieszaniny nasion z piaskiem i drugi tampon waty. Upakować wypełnienie kolumny za po-mocą pręcika szklanego. Umieścić na wlocie kolumny rozdzielacz, zamocować zestaw na statywie i wlać do rozdzielacza 25 cm³ eteru etylowego. Ekstrahować olej z szybkością przepływu eteru około 2,5 cm³/min do cylinderka o objętości 25 cm³. Po wymieszaniu pobrać do ampułki pojemności 5 cm³ tyle eluatu, aby po odpa-rowaniu zostało od około 10 do 50 mg oleju.
- ## 2.6. Wykonanie estryfikacji.
- Do ampułki z olejem lub tłuszczem wprowadzić 1 ± 0,1 cm³ 0,5N metanolowego roztworu wodorotlenku sodowego lub potasowego i wrzucić 2-3 mikroperełki szklane lub porcelanowe.

Ampułkę umieścić w elektrycznej łaźni powietrznej o temperaturze około 75°C i prowadzić hydrolizę oleju przez co najmniej 10 min od chwili wrzenia roztworu (nie dopuścić do całkowitego odparowania rozpuszczalnika). Po zmydleniu dodać $2 \pm 0,1 \text{ cm}^3$ metanolowego roztworu trójfluorku borowego lub chlorowodoru lub chlorku tionylu albo kwasu siarkowego i ponownie umieścić ampułkę na łaźni ogrzewając ją nie krócej niż 10 min w przypadku trzech pierwszych katalizatorów, a przez 15 min w przypadku ostatniego z nich. Dodać $1 \pm 0,1 \text{ cm}^3$ izooktanu i kilkakrotnie wstrząsnąć ampułką. Następnie dodać tyle nasyconego roztworu chlorku sodowego w wodzie, aby warstwa rozpuszczalnika zawierającego estry metylowe kwasów tłuszczowych znalazła się w szyjce ampułki. Odczekać do momentu sklarowania warstwy izooktanu, a następnie pobrać z niej mikrostrzykawką podwielokrotność do analizy chromatograficznej. W przypadku konieczności przechowywania próbki, pobrać $0,5 \div 0,7 \text{ cm}^3$ warstwy izooktanowej i przenieść do naczynka ze szczelnym zamknięciem, zawierającym około 0,1 g bezwodnego siarczanu sodowego. Przechowywać w chłodziarce nie dłużej niż 3 ÷ 4 dni. Roztwory wymagające dłuższego przechowywania należy po osuszeniu bezwodnym siarczanem sodowym przenieść do ampułki, zatopić w atmosferze azotu i umieścić w zamrażalniku chłodziarki.

2.7. Analizowanie metodą chromatografii gazowej

2.7.1. Wykonanie analizy. Za pomocą mikrostrzykawki wprowadzić na kolumnę chromatograficzną $0,003 \div 0,007 \text{ cm}^3$ roztworu estrów metylowych kwasów tłuszczowych w izooktanie stosując następujące parametry pracy:

- temperatura kolumny — izotermiczna w zakresie od 210 do 230°C w zależności od rodzaju wypełnienia i rozdzielczości kolumny; dla kolumny o długości 1,5 m i średnicy wewnętrznej 4 mm, wypełnionej 10% BDS na Diatomite C/AW, 100/120 mesh, optymalna temperatura wynosi około 217°C , a czas trwania analizy około 20 min (do kwasu erukowego włącznie); dla kolumny o długości 1,5 m i średnicy wewnętrznej 4 mm, wypełnionej 10% Silar 5CP na Gas Chrom Q, 100/120 mesh optymalna temperatura wynosi około 230°C , a czas trwania analizy około 25 min; dla kolumny o długości 2,1 m i średnicy wewnętrznej 2 mm, wypełnionej 5% BDS + 5% DEGS na Chromosorbie W/AW, 100/120 mesh optymalna temperatura wynosi 210°C , a czas trwania analizy około 30 min.

- szybkość przepływu gazu nośnego (azotu, argonu lub helu) od 30 do $60 \text{ cm}^3/\text{min}$ w zależności od średnicy wewnętrznej kolumny,

- szybkość przepływów wodoru i powietrza /tlenu
- zgodnie z instrukcją obsługi chromatografu,

- wzmocnienie zależne od ilości wprowadzonych estrów; dostosować tak, aby najwyższy pik na chromatogramie sięgał co najmniej 50% skali rejestratora; w przypadku rzepaków niskoerukowych przełączyć wzmocnienie sygnałów po kwasie C_{20}^1 tylokrotnie, aby sygnał dla estru metylowego kwasu erukowego sięgał co najmniej 10% skali rejestratora; w przypadku stoso-

wania integratora przełączenie przed kwasem erukowym nie jest konieczne.

2.7.2. Przygotowanie wypełnienia kolumny. Do kolby kulistej pojemności $750 \div 1000 \text{ cm}^3$ wsypać ilość nośnika potrzebną do wykonania wypełnienia (uprzednio wyprażony w temperaturze 150°C przez 3 h). Rozpuścić fazę stacjonarną w takiej ilości rozpuszczalnika, aby po przeniesieniu do kolby znajdowało się ponad nośnikiem swobodne lustro cieczy. Kolistym ruchem wymieszać zawartość kolby i po 5 min podłączyć kolbę do próżni. Usuwać rozpuszczalnik, stosując łagodny strumień azotu oraz podwyższoną temperaturę, nie doprowadzając do wrzenia. Przez cały okres odparowywania rozpuszczalnika należy mieszać zawartość kolby. Po usunięciu rozpuszczalnika (do zaniku jego zapachu) należy wypełnienie umieścić na płytce Petriego i wygrzewać w suszarce w temperaturze 60°C . Zaleca się stosowanie 10-procentowej impregnacji nośnika.

2.7.3. Napełnianie kolumny chromatograficznej. Jeden koniec kolumny zabezpieczyć tamponem z waty szklanej i podłączyć do pompki wodnej, natomiast przez drugi koniec kolumny wsypywać wypełnienie. Podczas napełniania należy wypełnienie ubijać za pomocą wibratora mechanicznego. Po całkowitym napełnieniu kolumny odłączyć ją od pompki wodnej i zabezpieczyć otwarty jej koniec, stosując tampon z waty szklanej. Umieścić kolumnę w termostacie chromatografu nie podłączając do detektora. Kondycjonować kolumnę w temperaturze możliwie jak najwyższej, nie przekraczającej jednak temperatury termostabilności fazy stacjonarnej, przy przepływie gazu nośnego $20 \div 60 \text{ cm}^3/\text{min}$, w temperaturze 220°C przez co najmniej 24 h. Po tym czasie należy kolumnę powtórnie ubijać za pomocą wibratora, a w razie potrzeby uzupełnić brakującą część wypełnienia.

2.7.4. Wyznaczanie sprawności i rozdzielczości kolumny. Wykonać analizę mieszaniny stearynianu i oleinianu metylu w proporcjach możliwie równych (estry metylowe kwasów tłuszczowych), tak dobierając warunki pracy, aby pik stearynianu metylu został zarejestrowany po około 15 min od piku rozpuszczalnika i aby jego wielkość stanowiła $\frac{3}{4}$ skali rejestratora. Obliczyć sprawność i rozdzielczość kolumny. Warunki pracy powinny być tak dobrane, aby rozdzielczość była nie mniejsza niż 1,25. Wymaga to w większości przypadków sprawności wynoszącej co najmniej 2000 pól teoretycznych.

2.8. Obliczanie wyniku oznaczania

2.8.1. Interpretacja jakościowa chromatogramu. Wykonać analizę roztworu wzorcowego estrów metylowych kwasów tłuszczowych lub estrów metylowych otrzymanych z próbki o znanym składzie kwasów tłuszczowych. Zmierzyć odległości retencji pików dla roztworu wzorcowego i porównać z odległościami retencji pików otrzymanych w wyniku analizowania badanej próbki. Na tej podstawie wykonać interpretację jakościową. Dopuszczalne rozbieżności w odległościach retencji wynoszą $\pm 2\%$.

2.8.2. Interpretacja ilościowa wyników. Obliczyć ilości dla wysokości pików i odpowiadających im od-

ległości retencji. Obliczyć udziały poszczególnych kwasów tłuszczowych metodą normalizacji wewnętrznej, nie stosując współczynników korekcyjnych. Udział procentowy dowolnego kwasu tłuszczowego (X) w odniesieniu do sumy pól wszystkich składników mieszaniny obliczyć wg wzoru

$$X = \frac{P}{\Sigma P} \cdot 100 \quad (3)$$

w którym:

P — wartość iloczynu dla wysokości pików i jego odległości retencji,

ΣP — suma iloczynów wysokości i odległości retencji obliczonych dla wszystkich pików na chromatogramie.

Można obliczać udział procentowy estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych za pomocą szablonu integracyjnego lub integratora elektronicznego.

2.8.3. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń podając z następującą ilością cyfr znaczących:

- a) dla estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych o zawartości powyżej 10% — 3 cyfry znaczące,
- b) dla estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych o zawartości od 1 do 10% — 2 cyfry znaczące,
- c) dla estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych poniżej 1% — 1 cyfra znacząca.

Uzyskane w wyniku działań matematycznych liczby zaokrąglić zgodnie z PN-70/N-02120. Tak obliczone wyniki przedstawiają skład kwasów tłuszczowych badanej próbki wyrażony procentowym udziałem ich estrów metylo- wych.

2.9. Powtarzalność oznaczeń składu kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku. Powtarzalność oznaczeń wyrażona błędem względnym (%) nie może przekraczać wartości podanych w tabl. 1.

Tablica 1

Zawartość estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych, %	Dopuszczalna wartość błędu względnego, %
poniżej 2	do 15
od 2 do 10	do 10
powyżej 10	do 5

2.10. Powtarzalność oznaczeń składu kwasów tłuszczowych w roślinnych tłuszczach jadalnych. Powtarzalność oznaczeń wyrażona błędem względnym nie może przekraczać wartości podanych w tabl. 2.

Tablica 2

Zawartość estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych, %	Dopuszczalna wartość błędu względnego, %
poniżej 2	26
od 2 do 5	16
powyżej 5 do 10	8,5
powyżej 10 do 20	5
powyżej 20 do 30	3
powyżej 30 do 50	2

2.11. Odtwarzalność oznaczeń składu kwasów tłuszczowych w roślinnych tłuszczach jadalnych. Odtwarzalność oznaczeń wyrażona współczynnikiem zmienności nie może przekraczać wartości podanych w tabl. 3.

Tablica 3

Zawartość estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych, %	Dopuszczalna wartość błędu względnego, %
powyżej 2 do 5	20
powyżej 5 do 10	10
powyżej 10 do 20	7
powyżej 20 do 30	4
powyżej 30 do 50	3
powyżej 50	2

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucje opracowujące normę — Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa.

2. Normy związane

PN-76/A-86910 Tłuszcze roślinne jadalne. Pobieranie próbek i przygotowanie próbki laboratoryjnej

PN-76/A-86911 Tłuszcze roślinne jadalne. Metody badań. Przygotowanie próbek do analizy

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

PN-76/R-66146 Nasiona przemysłowe oleiste. Pobieranie próbek i przygotowanie próbki średniej

3. Normy zagraniczne i zalecenia międzynarodowe

IUPAC II.D.19 Preparatyka estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych — 1973

IUPAC II.D.25 Analiza metodą chromatografii gazowej estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych — 1973

4. Autorzy projektu normy — Wanda Kubacka, — Stanisław J. Kubacki, — Mieczysław Obiedziński.