

PASZE	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-82
	Pasze	9160-22
	Oznaczanie witaminy D ₃ w premiksach	Grupa katalogowa 1549

1. WSTĘP

Przedmiotem normy jest ilościowe oznaczanie zawartości witaminy D₃ w premiksach.

2. METODA BADANIA

2.1. Zasada metody polega na wyekstrahowaniu witaminy D₃ z próbki premiksu za pomocą mieszaniny heksanu i eteru naftowego, przeprowadzeniu witaminy A w formę aldehydową, wyodrębnieniu witaminy D₃ przez rozdział na kolumnie oraz spektrofotometrycznym oznaczeniu w zakresie światła UV.

2.2. Aparatura i przyrządy

- Chłodnica Liebiga.
- Obrotowy odparowywacz próżniowy.
- Kolumny chromatograficzne 20 ÷ 25 cm wysokości, średnicy 1 cm oraz 10 cm wysokości, średnicy 1 cm.
- Kolby stożkowe pojemności 200 i 300 cm³.
- Pipety pomiarowe pojemności 1, 2 i 5 cm³.
- Lejki szklane.
- Spektrofotometr z zakresem światła UV.

2.3. Odczynniki

- Alkohol etylowy bezwodny, cz. d. a.
- Wodorotlenek potasowy, 1N roztwór alkoholowy.
- Pirogallol, 5-procentowy roztwór alkoholowy.
- Heksan cz. d. a.
- Eter naftowy cz. d. a.
- Eter etylowy cz. d. a.
- Siarczan sodowy bezwodny cz. d. a.
- Tlenek manganowy (MnO₂) cz. d. a.

i) Tlenek glinowy (Aluminium Oxid 90 Aktiv) obojętny, stopień aktywności I, grubość ziarna 0,063 ÷ 0,200 mm (70-230 mesh ASTM) Merck, Aktywować 8 procentami wody w stosunku do masy.

j) Wzorzec witaminy D₃ (USP), roztwór alkoholowy zawierający w 1 cm³ - 1000 j. m. D₃.

2.4. Wykonanie oznaczenia

2.4.1. Przygotowanie próbki do badania. Średnią próbkę laboratoryjną, pobraną zgodnie z PN-75/R-64769, rozdrobnić na młynku laboratoryjnym i przesiać przez sito o średnicy oczka 0,5 mm.

2.4.2. Zmydlanie i ekstrakcja. Odważyć z dokładnością do 0,01 g 10 g premiksu, przenieść do kolby stożkowej pojemności 300 cm³, dodać 100 cm³ 1N alkoholowego roztworu wodorotlenku potasowego, 5 cm³ 5-procentowego alkoholowego roztworu pirogallolu i zmydląć na wrzącej łaźni wodnej w atmosferze azotu w ciągu 20 min. Mieszaninę oziębic do temperatury pokojowej, dodawać taką samą objętość wody destylowanej i wytrząsać z 50 cm³ mieszaniny heksanu i eteru naftowego (1:1), w ciągu 5 min. Po rozdzieleniu faz, warstwę organiczną zdekantować do rozdzielacza zawierającego 50 cm³ wody, a hydrolizat w kolbie ekstrahować jeszcze dwukrotnie z 30 i 20 cm³ eteru naftowego. Połączone ekstrakty przemyć wodą destylowaną (5×100 cm³) do odczynu obojętnego i przenieść ilościowo do kolby stożkowej pojemności 300 cm³, osuszając ekstrakt przez sączenie przez warstwę bezwodnego siarczanu sodowego (5g). Rozpuszczalnik odparować w łaźni wodnej w temperaturze 50 °C, pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość rozpuścić w 20 cm³ eteru naftowego.

Zgłoszona przez Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego dnia 30 grudnia 1982 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 lipca 1983 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 4/1983 poz. 6)

2.4.3. Utlenianie. Na kolumnę o wymiarach 20 × 25 × 1 cm wprowadzić 1 g dobrze rozdrobnionego tlenku manganowego (MnO_2). Ekstrakt naftowy dozować na kolumnę porcjami, a następnie przemyć trzykrotnie 5 cm³ eteru naftowego.

Eluat odparować do suchej pozostałości w zestawie do odparowywania rozpuszczalników w temperaturze 50 °C, pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie rozpuścić w 3 cm³ eteru naftowego (roztwór A).

2.4.4. Chromatografia kolumnowa. Na kolumnę o wymiarach 10 × 1 cm, wypełnioną tlenkiem glinowym do wysokości 2/3, nanieść 1 cm³ roztworu A i prowadzić rozdzielnie 150 cm³ eteru naftowego, utrzymując szybkość przechodzenia rozpuszczalnika 2 cm³/min. Następnie wymywać witaminę D₃ za pomocą 50 cm³ eteru etylowego, odrzucając pierwsze 10 cm³ eluatu, a pozostałość zbierać w kolbie stożkowej pojemności 200 cm³ i odparować do sucha w zestawie do odparowywania rozpuszczalników w temperaturze 50 °C, pod zmniejszonym ciśnieniem.

Po wymyciu witaminy D₃ przepuścić przez kolumnę 40 cm³ eteru etylowego, eluat odparować i traktować jako próbę odniesienia.

2.4.5. Pomiar. Suchą pozostałość próby oraz próby odniesienia rozpuścić w 10 cm³ alkoholu etylowego bezwodnego. W spektrofotometrze zmierzyć ekstynkcję roztworów w 1 cm kuwetach kwarcowych, przy długości fali 265 nm wobec próby odniesienia sporządzonej jak wyżej.

2.4.6. Sporządzanie krzywej wzorcowej. Z roztworu wzorcowego witaminy D₃ pobrać do probówek pojemności 10 cm³ kolejno: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 i 3,5 cm³ i uzupełnić alkoholem etylowym bezwodnym do kreski.

Ekstynkcje roztworów zmierzyć w 1 cm kuwetach kwarcowych, przy długości fali 265 nm, wobec alkoholu jako próby odniesienia. Wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi rzędnych wartości ekstynkcji, a na osi odciętych - zawartość witaminy D₃ w j. m.

2.4.7. Obliczanie wyniku oznaczania. Zawartość witaminy D₃ w j. m. na 1 kg paszy obliczyć wg wzoru

$$X = \frac{C \cdot R}{m} \cdot w$$

w którym:

C - zawartość witaminy D₃ odczytana z krzywej wzorcowej w j. m.,

R - rozcieńczenie (3-krotne),

m - odważka próbki, g,

w - współczynnik korekcyjny wyliczony ze stopnia odzysku.

2.5. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników dwu równoległych oznaczeń, różniących się nie więcej niż o 10 % błędu względnego.

KONIEC

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę - Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego w Lublinie z siedzibą w Snopkowie.

2. Normy związane

PN-75/R-64769 Pasze. Pobieranie próbek

3. Autorzy projektu normy - dr Krystyna Tyczkowska, mgr Alicja Burczyńska-Niedziątek - Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego w Lublinie.