

Stofnaam	Gossypol
Type methode	Extractie, extinctiemeting
Te onderzoeken in	Katoenzaad, katoenzaadmeel en –koeken, mengvoeders die katoenzaadproducten bevatten
Minimum bepaalbaarheidsgrens	20 mg/kg
Herhaalbaarheid	< 500 mg/kg 15% relatief 500-75 mg/kg 75 mg/kg absoluut > 750 mg/kg 10% relatief
Reproduceerbaarheid (binnen laboratorium)	-
Aantoonbaarheid	-
Categorie	A
Titel	Bepaling van gossypol Richtlijn 72/199/EEG

BEPALING VAN VRIJ EN TOTAAL GOSSYPOL

1 . Doel en toepassingsgebied

Het voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van het gehalte aan vrij gossypol , totaal gossypol en aan gossypol chemisch nauw verwante stoffen in katoenzaad , katoenzaadmeel en -koeken en in mengvoeders die katoenzaadprodukten bevatten . De ondergrens van de bepaalbaarheid bij de methode bedraagt 20 ppm .

2 . Beginsel

Gossypol wordt geëxtraheerd in aanwezigheid van 3-amino-1-propanol , hetzij met een mengsel van isopropanol en hexaan voor het bepalen van vrij gossypol , hetzij met dimethylformamide voor het bepalen van totaal gossypol .

Het gossypol wordt met behulp van aniline omgezet in gossypoldianiline , waarvan de extinctie gemeten wordt bij 440 nm .

3 . Reagentia

3.1 Isopropanol-hexaanmengsel : Meng 60 volumedelen isopropanol p.a . met 40 volumedelen n-hexaan .

3.2 Oplosmiddel A : Breng in een maatkolf van 1 l ongeveer 500 ml isopropanol-hexaanmengsel (3.1) , 2 ml 3-amino-1-propanol , 8 ml ijsazijn en 50 ml water . Vul aan tot 1 l met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) . Dit reagens is een week houdbaar .

3.3 Oplosmiddel B : Pipeteer in een maatkolf van 100 ml 2 ml 3-amino-1-propanol en 10 ml ijsazijn . Koel af tot kamertemperatuur en vul aan tot 100 ml met N,N-dimethylformamide . Dit reagens is een week houdbaar .

3.4 Aniline p.a . : Wanneer de extinctie van een blancobepaling meer bedraagt dan 0,022 , moet de aniline worden afgedestilleerd over zinkpoeder , waarbij 10 % voorloop en 10 % naloop worden verwijderd . Dit reagens is enige maanden houdbaar in een gesloten bruine fles , bewaard in een koelkast .

3.5 Gossypolstandaardoplossing A : Breng in een maatkolf van 250 ml 27,9 mg gossypolacetaat , los op in oplosmiddel A (3.2) , en vul hiermee aan tot de streep . Pipeteer 50 ml van deze oplossing in een maatkolf van 250 ml en vul aan tot 250 ml met oplosmiddel A (3.2) . 1 ml van deze oplossing bevat 0,02 mg gossypol . Laat de oplossing voor het gebruik 1 h staan bij kamertemperatuur .

3.6 Gossypolstandaardoplossing B : Breng in een maatkolf van 50 ml 27,9 mg gossypolacetaat , los op in oplosmiddel B (3.3) en vul hiermee aan tot de streep . 1 ml van deze oplossing bevat 0,5 mg gossypol .

De gossypolstandaardoplossingen zijn - in het donker bewaard - gedurende 24 h houdbaar .

4 . Apparatuur

4.1 Roteerapparaat met ongeveer 35 omwentelingen per minuut .

4.2 Spectrofotometer .

5 . Uitvoering

5.1 Af te wegen hoeveelheid analysemateriaal

De af te wegen hoeveelheid analysemateriaal hangt af van het te verwachten gehalte aan gossypol . Het verdient de voorkeur te werken met een kleine hoeveelheid analysemateriaal en met een relatief groot aliquoot deel van het filtraat , om een voldoende hoeveelheid gossypol te verkrijgen voor een nauwkeurige fotometrische meting .

Voor het bepalen van vrij gossypol in katoenzaad , katoenzaadmeel en -koeken mag het

gewicht van het analysemateriaal niet meer bedragen dan 1 g ; van mengvoeders kan tot 5 g worden afgewogen . In het algemeen kan een aliquoot deel van 10 ml van het filtraat worden afgepipeteerd ; het moet 50 à 100 mg gossypol bevatten .

Voor het bepalen van totaal gossypol kan de af te wegen hoeveelheid analysemateriaal variëren van 0,5 tot 5 g , opdat in een aliquoot deel van 2 ml van het filtraat 40 tot 200 mg gossypol aanwezig is .

De analyse moet worden uitgevoerd bij een omgevingstemperatuur van nabij 20 * C .

5.2 Bepaling van vrij gossypol

Breng het afgewogen analysemateriaal in een kolf van 250 ml met slijpstuk en waarvan de bodem bedekt is met glaskralen . Pipeteer hierbij 50 ml oplosmiddel A (3.2) , sluit de kolf en laat gedurende 1 h roteren . Filtreer door een droogfilter en vang het filtraat op in een kleine kolf met slijpstuk . Bedek tijdens het filtreren de trechter met een horlogeglas .

Pipeteer gelijke aliquote delen van het filtraat , die 50 tot 100 mg gossypol bevatten , in twee maatkolven van 25 ml (A en B) . Breng eventueel het volume op 10 ml met oplosmiddel A (3.2) . Vul de inhoud van maatkolf (A) aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) . Deze oplossing dient als referentieoplossing voor het monster .

Pipeteer vervolgens in twee andere maatkolven van 25 ml (C en D) 10 ml oplosmiddel A (3.2) . Vul de inhoud van kolf (C) aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) .

Deze oplossing dient als referentieoplossing voor de blanco .

Voeg aan de maatkolven (D) en (B) resp . 2 ml aniline (3.4) toe . Verwarm gedurende 30 min . op een kokend waterbad voor het ontwikkelen van de kleuring . Koel af tot kamertemperatuur , vul aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) , meng en laat gedurende 1 h staan .

Meet met behulp van de spectrofotometer de extinctie van de blanco-oplossing (D) bij 440 nm in een glascuvet van 1 cm t.o.v . de referentieoplossing (C) . Meet vervolgens de extinctie van de monsteroplossing (B) t.o.v . de referentie-oplossing (A) .

Verminder de extinctie van de monsteroplossing met die van de blanco-oplossing (= gecorrigeerde extinctie) . Bereken uit de aldus verkregen waarde het gehalte aan vrij gossypol als beschreven onder 6 .

5.3 Bepaling van totaal gossypol

Breng een hoeveelheid analysemateriaal , die 1 à 5 mg gossypol bevat , in een maatkolf van 50 ml en voeg toe 10 ml oplosmiddel B (3.3) . Bereid terzelfder tijd een blanco-oplossing , door 10 ml oplosmiddel B (3.3) in een tweede maatkolf van 50 ml te brengen .

Verwarm beide kolven gedurende 30 minuten op een kokend waterbad . Koel af tot kamertemperatuur , vul beide kolven aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) en meng . Laat na gedurende 10 à 15 minuten staan en filtreer dan af in kolfjes met ingeslepen stop .

Pipeteer 2 ml van het filtraat van het monster in resp . twee maatkolven van 25 ml en 2 ml van het filtraat van de blanco in resp . twee andere maatkolven van 25 ml . Vul van elke serie één maatkolf aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) . Deze oplossingen dienen als referentieoplossingen .

Voeg vervolgens 2 ml aniline (3.4) toe aan de beide overige maatkolven . Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad voor het ontwikkelen van de kleuring . Koel af tot kamertemperatuur , vul aan tot 25 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) , meng en laat gedurende 1 h staan .

Meet de extincties als beschreven onder 5.2 voor vrij gossypol . Bereken uit de verkregen waarde het gehalte aan totaal gossypol als beschreven onder 6 .

6 . Berekening van de resultaten

De berekening van de resultaten kan geschieden hetzij op basis van de specifieke extinctie (6.1) , dan wel m.b.v . een ijkgrafiek (6.2) .

6.1 Op basis van de specifieke extinctie

Onder de beschreven omstandigheden bedragen de specifieke extincties voor :

vrij gossypol : $E (1 \% , 1 \text{ cm}) = 625$

totaal gossypol : $E (1 \% , 1 \text{ cm}) = 600$

Het gehalte aan vrij of totaal gossypol in het monster wordt verkregen uit de onderstaande formule :

percentage gossypol = $(E * 1250) / (E (1 \% , 1 \text{ cm}) * g * v)$

waarin :

E = gecorrigeerde extinctie , als bepaald onder 5.2

g = gewicht van het analysemateriaal in grammen

v = aliquoot deel van het filtraat in ml .

6.2 Met behulp van een ijkgrafiek

6.2.1 Vrij gossypol

Neem twee series van telkens 5 maatkolven van 25 ml . Pipeteer in beide series resp . 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 en 10,0 ml gossypolstandaardoplossing A (3.5) . Verdun met oplosmiddel A (3.2) tot 10 ml . Voeg aan elke serie nog een maatkolf van 25 ml toe , die slechts 10 ml oplosmiddel A (3.2) bevat (blancoproef) . Vul de kolven van de eerste serie , met inbegrip van de blancoproef , aan tot 25 ml met isopropanolhexaanmengsel (3.1) (referentieserie) . Voeg toe 2 ml aniline (3.4) aan elke kolf van de tweede serie , inclusief de blancoproef . Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad voor het ontwikkelen van de kleuring . Koel af tot kamertemperatuur , vul aan tot de streep met isopropanolhexaanmengsel (3.1) , meng en laat gedurende 1 h staan (standaardserie) . Bepaal de extinctie van elke oplossing van de standaardserie tegen de corresponderende oplossing van de referentieserie , onder de omstandigheden als beschreven onder 5.2 . Zet de ijkcurve grafisch uit door de extincties te stellen tegenover de hoeveelheden gossypol (in mg) .

6.2.2 Totaal gossypol

Neem zes maatkolven van 50 ml . Breng in de eerste 10 ml oplosmiddel B (3.3) en in de andere resp . 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 en 10,0 ml gossypolstandaardoplossing B (3.6) . Verdun de inhoud van elke kolf tot 10 ml met oplosmiddel B (3.3) . Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad . Koel af tot kamertemperatuur , vul aan tot 50 ml met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) en meng . Pipeteer van deze oplossingen telkens 2,0 ml in resp . twee series van zes maatkolven van 25 ml . Vul de kolven van de eerste serie aan tot 25 ml met isopropanolhexaanmengsel (3.1) (referentieserie) . Voeg toe 2 ml aniline (3.4) aan elke kolf van de tweede serie . Verwarm gedurende 30 minuten op een kokend waterbad . Koel af tot kamertemperatuur , vul aan tot de streep met isopropanol-hexaanmengsel (3.1) , meng en laat gedurende 1 h staan (standaardserie) . Bepaal de extinctie van elke oplossing van de standaardserie tegen de corresponderende oplossing van de referentieserie , onder de omstandigheden als beschreven onder 5.2 . Zet de ijkcurve grafisch uit door de extincties te stellen tegenover de hoeveelheden gossypol (in mg) .

6.3 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van een bepaling in tweevoud in hetzelfde monster mag

niet meer bedragen dan :

- 15 % relatief bij gehalten van minder dan 500 ppm gossypol ;
- niet meer dan 75 ppm absoluut bij gehalten van 500 tot 750 ppm ;
- 10 % relatief bij gehalten van meer dan 750 ppm gossypol .

(1) Bepaal het gehalte aan stikstof volgens een semi-microkjeldahlmethode (theoretisch gehalte : 17,7 % N) .