

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50321.2 – Stanovení obsahu taninů spektrofotometricky	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU TANINŮ SPEKTROFOTOMETRICKY

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení obsahu taninů v zrnech čiroku a pelušky.

2 Princip

Taniny se ze vzorku extrahují roztokem dimethylformamidu. Poté se po reakci extraktu s citronanem amonno-železitým a amoniakem stanoví spektrofotometricky ve viditelné oblasti při vlnové délce 525 nm.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Dimethylformamid.
- 3 Dimethylformamid, vodný roztok, $c(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}) = 75 \text{ \% (V/V)}$.
Příprava: 750 ml dimethylformamidu (2) se přidává do asi 200 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.
- 4 Amoniak, (25 – 29)%, vodný roztok.
- 5 Amoniak, vodný roztok, $c(\text{NH}_3) = 8,0 \text{ g/l}$.
Příprava: 32 ml amoniaku (4) se přidává do asi 500 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku.
- 6 Citronan amonno-železitý, s obsahem Fe (16,5 – 18,5) %.
- 7 Citronan amonno-železitý, vodný roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{Fe} \cdot x\text{H}_3\text{N}) = 3,5 \text{ g/l}$.
Příprava: 3,5 g citronanu amonno-železitého (6) se rozpustí ve vodě (1). Poté se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní po značku vodou (1). Roztok je nutné připravit 24 h před použitím.
- 8 Kyselina taninová, $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50321.2 – Stanovení obsahu taninů spektrofotometricky	Revize	0

9 Kyselina taninová, vodný roztok, $c(C_{76}H_{52}O_{46}) = 2 \text{ g/l}$.

Příprava: 0,1 g kyseliny taninové (8) se rozpustí v asi 30 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se v 50ml odměrné baňce doplní vodou (1) po značku. Roztok se skladuje při teplotě přibližně 4 °C po dobu maximálně jednoho týdne.

Poznámky

- 1 *Obsah železa v citronanu amonno-železitém (6) má velký vliv na výsledky stanovení, proto je nutné dodržet uvedený obsah.*
- 2 *Původ kyseliny taninové (8) výrazně ovlivňuje průběh kalibrační křivky. Z důvodu možnosti provedení mezilaboratorního porovnání výsledků doporučuje norma ČSN ISO 9648 používat kyselinu taninovou od firmy Merck (referenční číslo 773).*

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Spektrofotometr.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 3 Laboratorní ultraodstředivý mlýnek, např. Retsch ZM 200, se sítem o velikosti ok 0,5 mm a 0,25 mm.
- 4 Minitřepačka typu Vortex.
- 5 Laboratorní třepačka s kývavým pohybem.
- 6 Laboratorní odstředivka, odstředivé zrychlení 3000 g.
- 7 Centrifugační zkumavky, 50 ml.
- 8 Zkumavky, asi 20 ml a 10 ml, stojan na zkumavky.
- 9 Automatické pipety s nastavitelným objemem, 1 ml, 5 ml a 10 ml.

5 Postup

5.1 Příprava zkušební vzorku

Laboratorní vzorek se po odstranění nečistot důkladně promíchá a kvartací se připraví zkušební vzorek, který se pomele na mlýnku při 1400 ot/min. Použije se síto s velikostí ok 0,5 mm pro vzorek čiroku a síto s velikostí ok 0,25 mm pro vzorek pelušky. Namletý vzorek se převede do vhodné uzavíratelné nádoby.

Vzhledem k rychlé oxidaci taninů v rozemletém zrně se ihned po pomletí vzorku přistupuje k vlastnímu stanovení.

Poznámky

- 3 *Vysušená celá zrna čiroku a pelušky, která jsou určena ke stanovení obsahu taninů, se mohou uchovávat v prachovnici po dobu několika měsíců, pokud jsou chráněna před světlem.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50321.2 – Stanovení obsahu taninů spektrofotometricky	Revize	0

5.2 Extrakce

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g. Pipetou se ke vzorku přidá 20 ml dimethylformamidu (3), zkumavka se uzavře víčkem a vzorek se extrahuje 1 h na třepačce při laboratorní teplotě. Poté se extrakt odstředí 10 min při odstředivém zrychlení 3000 g. Pro další stanovení se použije připravený supernatant.

5.3 Spektrofotometrické stanovení

Příprava slepého pokusu: Do 20ml zkumavek se nadávkuje ve dvou paralelních stanoveních 1 ml připraveného supernatantu vzorku. Poté se do každé zkumavky přidá 6 ml vody (1) a 1 ml amoniaku (5) a obsah zkumavky se několik sekund protřepává na minitřepačce. Vše je nutné provést během první minuty stanovení.

Příprava vzorku: Do dalších dvou 20ml zkumavek se opět ve dvou paralelních stanoveních nadávkuje 1 ml připraveného supernatantu vzorku. Poté se do každé zkumavky přidá 5 ml vody (1) a 1 ml roztoku citronanu amonno-železitého (7) a obsah zkumavky se několik sekund protřepává na minitřepačce. Pak se do obou zkumavek přidá 1 ml amoniaku (5) a zkumavky se znovu protřepou na minitřepačce. Vše je nutné provést během dalších dvou minut stanovení (poznámka 4).

Absorbance takto připravených vzorků a příslušných slepých pokusů se změří na spektrofotometru při vlnové délce 525 nm proti vodě, v čase (10 ± 1) min po ukončení operací v každé ze zkumavek.

Výsledkem stanovení je absorbance (A) daná rozdílem mezi absorbancí roztoku vzorku a absorbancí slepého pokusu.

Poznámky

- 4 *V jednom cyklu lze výše popsaným způsobem, při dodržení všech časových intervalů, stanovit celkem tři vzorky. Celková doba na provedení popsaných operací je 9 min. V 10. minutě se připravené roztoky převedou do kyvet nebo 10ml zkumavek, podle použitého spektrofotometru. V čase (10 ± 1) min po ukončení operací v příslušné zkumavce, se změří na spektrofotometru absorbance roztoku při 525 nm proti vodě.*
- 5 *Pokud se absorbance u takto připravených vzorků nepohybuje v rozsahu kalibrační závislosti, je nutné supernatant vhodně naředit a zopakovat celé spektrofotometrické stanovení. Ředění se zohlední při výpočtu.*

5.4 Příprava kalibrační křivky

Ke stanovení obsahu taninů se použije kalibrační křivka získaná proměřením kalibračních roztoků kyseliny taninové.

Do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5) ml roztoku kyseliny taninové (9) a poté se doplní dimethylformamidem (3) po značku. Získají se tak kalibrační roztoky o koncentraci kyseliny taninové (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9) mg/ml.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50321.2 – Stanovení obsahu taninů spektrofotometricky	Revize	0

Do 20ml zkumavek označených 0 až 9 se pipetuje vždy 1 ml z každého z kalibračních roztoků.

Poté se do první zkumavky (označené 0) pipetou postupně přidá 5 ml vody (1) a 1 ml citronanu amonno-železitého (7). Obsah zkumavky se několik sekund protřepává na minitřepačce. Pak se přidá 1 ml amoniaku (5) a zkumavka se znovu několik sekund protřepává. Uvedené operace je nutné zvládnout v průběhu jedné minuty. Poté se roztok nechá stát 10 min.

V průběhu 2. minuty se celý výše popsáný postup zopakuje s další zkumavkou (označenou 1), a tak se následně postupuje i se zkumavkami označenými 2 až 9.

Absorbance připravených kalibračních roztoků se změří v čase (10 ± 1) min po ukončení operací na spektrofotometru při 525 nm proti vodě.

Z naměřených výsledků se sestrojí kalibrační křivka.

Poznámky

- 6 *U stanovení taninů ve vzorcích čiroku postačuje připravit kalibrační roztoky v rozsahu $(0 - 0,6)$ mg/ml.*
- 7 *Při výpočtu koncentrace kalibračních roztoků je nutné zohlednit čistotu použitého standardu kyseliny taninové (obvykle 95 %).*
- 8 *Kalibrační křivka nesmí být korigována do nulového bodu.*

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah taninů, vyjádřený jako hmotnostní procento kyseliny taninové, se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{V \times c \times 10^{-3}}{V_1 \times m} \times 100$$

kde V je celkový objem extraktu v ml,

V_1 objem extraktu pipetovaný pro spektrofotometrické stanovení v ml,

c koncentrace kyseliny taninové ve zkušebním vzorku zjištěná z kalibrační závislosti v mg/ml,

m hmotnost zkušební vzorku v g,

10^{-3} konverzní faktor pro přepočet z mg na g.

Výsledek se získává jako průměr minimálně dvou paralelních stanovení za předpokladu, že je splněn požadavek na hodnotu opakovatelnosti.

7 Literatura

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50321.2 – Stanovení obsahu taninů spektrofotometricky	Revize	0

1 ČSN ISO 9648 Čirok – Stanovení obsahu taninu.