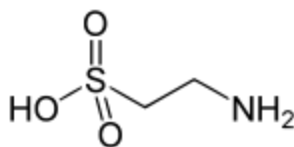
	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10024.1 – Stanovení obsahu taurinu	Vydání	2
		Revize	0

## STANOVENÍ OBSAHU TAURINU

### 1 Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení taurinu v krmivech metodou ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem.



Obrázek 1. Taurin.

### 2 Princip


Volný, nejčastěji do krmných směsí přidávaný taurin, se ze vzorku vyextrahuje roztokem kyseliny chlorovodíkové.

Obsah taurinu se stanoví metodou ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Kyselina chlorovodíková, 35%.
- 2 Kyselina chlorovodíková, roztok  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: Do dvoulitrové odměrné baňky se nalije 1 l vody (10), přidá se 17,2 ml kyseliny chlorovodíkové (1) a poté se doplní po značku vodou (10). Směs se pak převede do tmavé zásobní lahve. Uchová se při laboratorní teplotě po dobu maximálně 6 měsíců.
- 3 Dusík (čistoty 5.0).
- 4 Citronan sodný, dihydrát,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- 5 Kyselina citronová, monohdrát,  $\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH}) \cdot (\text{COOH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .
- 6 Chlorid sodný,  $\text{NaCl}$ .
- 7 Azid sodný,  $\text{NaN}_3$ .
- 8 Hydroxid sodný,  $\text{NaOH}$ .
- 9 Hydroxid sodný,  $\text{NaOH}$ , roztok o koncentraci 0,5 g/ml.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10024.1 – Stanovení obsahu taurinu	Vydání	2
		Revize	0

Příprava: Do 200ml kádinky se naváží 50 g hydroxidu sodného (8). Navážka se rozpustí asi ve 40 ml vody (10). Po ochlazení se převede do 100ml odměrné baňky a doplní se po značku vodou (10). Roztok se uchovává v plastové nádobě při laboratorní teplotě po dobu maximálně 6 měsíců.

- 10 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) odpovídající stupni 1 podle EN ISO 3696.
- 11 Thiodiglykol, koncentrovaný,  $C_4H_{10}O_2S$ . Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.
- 12 Ninhydrin,  $C_9H_6O_4$ . Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.
- 13 Ninhydrin, zásobní roztok.


Příprava: Naváží se 20 g ninhydrinu (12), který se převede do tmavé zásobní lahve o objemu 2,5 l a rozpustí v 750 ml methylcellosolvu (15). Rozpouštění probíhá za probublávání inertním plynem (3) pod dvoucestným kohoutem. Po rozpuštění se přidá 250 ml acetátového tlumivého roztoku (16) a dále 1 g hydrindantinu (14) rozpuštěného v malém množství methylcellosolvu (15). Po uzavření se roztok nechá ještě asi 10 min probublávat inertním plynem (3) a pak se výstup ze zásobní lahve připojí na zásobní měch inertního plynu v přístroji.

- 14 Hydrindantin,  $C_{18}H_{14}O_8$ . Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.
- 15 Methylcellosolv,  $C_3H_8O_2$ , Dodává se komerčně od ověřeného výrobce.
- 16 Acetátový tlumivý roztok,  $pH = 5,5$ , dodává se komerčně, např. firma ZMBD Chemik.
- 17 Taurin, standardní látka,  $\geq 99,5 \%$ , Sigma Aldrich,  $NH_2CH_2CH_2SO_3H$ ,  $M_r = 125,15$ .
- 18 Taurin, standardní roztok taurinu,  $2,5 \mu\text{mol/ml}$ , ředěný tlumivým roztokem (25).

Příprava: Pro přípravu 100 ml standardního roztoku taurinu se přesně naváží 0,0313 g taurinu (17), navážka se kvantitativně převede do 100ml odměrné baňky a přidá se 50 ml vody (10) a 1 ml kyseliny chlorovodíkové (1), po rozpuštění se doplní vodou (10) po značku. Při uchovávání při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně 6 měsíců.

- 19 Taurin, pracovní standardní roztok taurinu –  $0,25 \mu\text{mol/ml}$ , ředěný tlumivým roztokem (25).  
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se odpipetuje přesně 5 ml standardního roztoku taurinu (18), poté se doplní po značku tlumivým roztokem (25). Při uchovávání při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně 6 měsíců.
- 20 Ionexová kolona s náplní Poly 8. Dodává se od ověřeného výrobce.
- 21 Ionexová předkolona s náplní Ostion KS 0804. Dodává se od ověřeného výrobce.
- 22 Ethanol, čistý, 96%.
- 23 Tlumivý roztok,  $pH = 2,6$ . V programu je označován jako tlumivý roztok č. 1 (Tabulka 1).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 11,54 g kyseliny citronové (5), 3,45 g citronanu sodného (4), 9,65 g chloridu sodného (6), 0,1 g azidu sodného (7), pipetou se odměří 2,5 ml thiodiglykolu (11), přidá se asi 500 ml vody (10) a obsah se nechá rozpustit. Poté se baňka doplní po značku vodou (10).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10024.1 – Stanovení obsahu taurinu	Vydání	2
		Revize	0

- 24 Regenerační tlumivý roztok. V programu je označována jako tlumivý roztok č. 6 (Tabulka 1).  
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 8 g hydroxidu sodného (8), poté se přidá asi 500 ml vody (10), po rozpuštění se baňka doplní po značku vodou (10).
- 25 Tlumivý roztok, pH = 2,2.  
Příprava: Do 2000ml odměrné baňky se naváží se 28 g kyseliny citronové (5), 23 g chloridu sodného (6) a 0,2 g azidu sodného (7). Přidá se 10 ml thiodiglykolu (11), asi 500 ml vody (10) a obsah se nechá rozpustit. Poté se doplní po značku vodou (10).
- 26 Tlumivý roztok, pH = 7,9. V programu je označován jako tlumivý roztok č. 4 (Tabulka 1).  
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se naváží se 9,8 g citronanu sodného (4), 26,3 g chloridu sodného (6) 0,05 g azidu sodného (7), 1,025 g kyseliny borité (27), přidá se 300 ml vody (10) a pipetou se odměří 0,75 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 g/ml (9), obsah se nechá se rozpustit. Poté se doplní po rysku vodou (10).
- 27 Kyselina boritá, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

#### 4 Přístroje a pomůcky


- 1 Automatický analyzátor aminokyselin, např. AAA 400, Ingos s.r.o.
- 2 Váhy analytické s přesností na 0,0001 g
- 3 Váhy analytické s přesností na 0,01 g.
- 4 Filtrační papír, filtrační rychlost velmi vysoká, např. KA 1 – M, průměr 150 mm.
- 5 Filtrační papír, filtrační rychlost střední, např. KA 5, průměr 150 mm.
- 6 Filtrační nálevka se skleněnou fritou S3.
- 7 Laboratorní mlýn.
- 8 Erlenmayerova baňka, NZ 29/32, 100 ml, 250 ml.
- 9 Třepačka horizontální.

#### 5 Postup

##### 5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti (0,5 – 1,0) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace. Vzorek s vysokou vlhkostí se musí předsušit 12 h při teplotě, která nepřesáhne 50 °C. Vzorky s vyšším obsahem tuku (nad 100 g/kg) se odučňují.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10024.1 – Stanovení obsahu taurinu	Vydání	2
		Revize	0

## 5.2 Extrakce taurinu


Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží přiměřené množství vzorku s přesností na 0,0001 g s ohledem na předpokládané množství taurinu ve vzorku. Pro obsahy do 1000 mg/kg se navažují 3 g vzorku, pro obsahy (1000 – 5000) mg/kg se navažuje (1 – 2) g a pro obsahy nad 5000 mg/kg se navažuje (0,25 – 0,5 g vzorku). Vzorek se zakápně třemi kapkami ethanolu (22) a extrahuje se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (2) na třepače (30 – 60) min. Suspenze se zfiltruje nejprve přes řídký filtrační papír a pak znovu přes filtr střední hustoty do 100ml Erlenmayerovy baňky. Výrazně se tak urychlí rychlost filtrace. Po případném naředění tlumivým roztokem (25) se obsah taurinu stanoví na analyzátoru aminokyselin podle bodu 5.3. V každé sérii vzorků se provede stanovení taurinu u vhodného IRM.

## 5.3 Stanovení taurinu ve vzorku

Obsah taurinu se stanoví metodou ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a fotometrickým detektorem na analyzátoru aminokyselin. Příklad podmínek analýzy je uveden v tabulce 1. Podmínky analýzy je nutno přizpůsobit stavu náplně kolony. Objem nástřiku do analyzátoru je stabilně 100  $\mu$ l. Současně se provádí jednobodová kalibrace pomocí pracovního standardního roztoku taurinu o koncentraci 0,25  $\mu$ mol/ml (19).

**Tabulka 1. Program pro stanovení taurinu – příklad nastavení pro přístroj AAA 400 .**

Čas (min)	Teplota kolony (° C)	Tlumivý roztok č.	Příkaz	Poznámka
0,00	57	1	Inject	pH = 2,6
5,00	57	1	Zero	
6,00	57	4	StartEquil	
10,00	74	No Change	None	
11,00	74	6	None	0,2M NaOH
18,00	74	1	None	pH=2,6
22,00	74	1	H <sub>2</sub> O	
27,00	57	1	Load	
29,00	57	1	NHD	
33,00	57	1	AcqStop	
35,00	57	1	None	

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10024.1 – Stanovení obsahu taurinu	Vydání	2
		Revize	0

**Tabulka 2. Program pro stanovení taurinu – příklad nastavení pro přístroj AAA 500 .**

Čas (min.)	Teplota kolony (°C)	Příkaz	Poznámka
0,00	57	SetColumnTemp - 57 °C	
0,00	57	SetBuffer 1	pH = 2,60
5,00	57	ZeroDetector	
6,00	57	SetBuffer 4	pH = 7,90
10,00	74	SetColumnTemp - 74 °C	
11,00	74	SetBuffer 6	0,2M NaOH
18,00	74	SetBuffer 1	pH = 2,60
18,00	74	NoCommand	
22,00	74	SetNHDRatio - Water	pouze voda
27,00	57	SetColumnTemp - 57 °C	
29,00	57	SetNHDRatio – NHD	pouze NHD
97,00	57	NoCommand	

## 6 Výpočet

Obsah taurinu ( $X$ ) vyjádřený v g/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{A \times c \times V \times M \times R}{B \times m_a \times 1000}$$

kde

- $A$  je plocha píku taurinu v extraktu,
- $B$  plocha píku kalibračního standardu,
- $c$  koncentrace standardu taurinu v  $\mu\text{mol/ml}$ ,
- $V$  objem extraktu v ml,
- $M$  molární hmotnost taurinu ( $M_{\text{taurin}} = 125,15 \text{ g/mol}$ ),
- $m_a$  hmotnost zkušební vzorku v g,
- $R$  ředění.

## 7 Literatura

- 1 Prováděcí nařízení komise (EU) 2015/722, o povolení taurinu jako doplňkové látky pro psovitě (*Canidae*), kočkovitě (*Felidae*), lasicovitě (*Mustelidae*) a pro masožravé ryby.