

Project 505 5021

Ontwikkeling en verbetering van methoden van onderzoek voor de bepaling van antinutritionele factoren (ANF)

Projectleider: ir P.C.H. Hollman

Rapport 90.34

Juli 1990

Bepaling van het tanninegehalte in  
Vicia faba bonen met de vanilline-  
 $H_2SO_4$  methode

D.P. Venema

Goedgekeurd door ir P.C.H. Hollman

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

#### VERZENDLIJST

##### INTERN

directeur

sectorhoofden

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

afd. Micronutriënten en Natuurlijke Stoffen (3x)

ir P.C.H. Hollman

mw D.P. Venema

circulatie

bibliotheek

##### EXTERN

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Veehouderij en Zuivel

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Directie Instituut voor Veevoedingsonderzoek

Directie Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek

Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek, drs C. Grashoff

Directie ATO Agrotechnologie

ir G. Meyer (ATO)

Directie Centrum voor Plantenveredelingsonderzoek

Centrum voor Plantenveredelingsonderzoek, dr J. Helsper

Directie Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor en Pluimveehouderij "Het Spelderholt"

Agralin

ABSTRACT

Bepaling van het tanninegehalte in *Vicia faba* bonen met de vanilline- $H_2SO_4$  methode.

Determination of tannins in faba beans (*Vicia Faba*) by the vanillin- $H_2SO_4$  method (in Dutch)

Report 90.34

July 1990

D.P. Venema, P.C.H. Hollman

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)  
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

6 figures, 10 tables , 1 appendix

A spectrophotometric method for the determination of tannins in faba beans based on the vanillin- $H_2SO_4$  reaction and dimethylformamide (DMF) extraction, was optimised. Factors affecting the results, grinding, DMF purity, concentration of  $H_2SO_4$  and vanillin, temperature, and concentration range of sample extracts were investigated. Based on this experience, an analytical method was laid down. The method proved to give reproducible results within the laboratory with CV(repeatability) = 2.5% and CV(reproducibility within lab)= 3.8% at a level of 0.56% catechin-equivalents.

Keywords: Tannins, *Vicia Faba*, spectrophotometric determination, vanillin- $H_2SO_4$ , Antinutritional Factors, ANF, dimethylformamide, DMF.

( )

( )

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	6
2 LITERATUURONDERZOEK	6
2.1 Tanninen in de veldboon (Vicia Faba)	6
2.2 Klassieke methoden voor de bepaling van tanninen	7
2.3 Factoren die van invloed kunnen zijn op de analyse van tanninen	8
2.3.1 Deeltjesgrootte van het monster	9
2.3.2 De extractie	9
2.3.3 De stabiliteit van het gemalen monster	10
2.3.4 Relatieve vochtigheid	11
2.3.5 De keuze van de standaard	11
3 EXPERIMENTEEL	12
3.1 Optimaliseren van de maaltechniek	12
3.2 Het effect van de zuurconcentratie	13
3.2.1. Invloed van een klein verschil in de zuurconcentratie	15
3.3 De stabiliteit van de gemalen bonen tijdens bewaren	16
3.4 De kwaliteit van de dimethylformamide	17
3.5 Invloed van de monsterconcentratie en de vanillineconcentratie	19
3.6 De temperatuur van het koelwaterbad en het effect van filtreren of centrifugeren	19
3.7 Verkleinen en extraheren met de Prolabo kogelschudder	20
3.8 Enkele maatregelen ter verbetering van de nauwkeurigheid	21
3.9 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid binnen het laboratorium	22
4 CONCLUSIE	23

5 LITERATUUR

25

BIJLAGEN

1 INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT

2 FIGUREN

## SAMENVATTING

Bepaling van het tanninegehalte van veldbonen is noodzakelijk in het kader van onderzoek naar het terugdringen van ANF's in bepaalde veevoedergrondstoffen zoals veldbonen, dat plaatsvindt op diverse DLO-instituten. Voor dit onderzoek is een eenvoudig uitvoerbare screeningsmethode nodig. Uit literatuuronderzoek blijkt dat hiervoor een aantal klassieke spectrofotometrische, in principe niet-specifieke, methoden in aanmerking komen, waarbij de vanilline- $H_2SO_4$  methode relatief gezien het meest specifiek is. Tanninegehalten bepaald met deze klassieke methoden en gerapporteerd in de literatuur, zijn echter moeilijk vergelijkbaar. Het blijkt dat behalve het gekozen principe van de methode, een groot aantal factoren, zoals deeltjesgrootte, de extractieduur, bewaaromstandigheden van het monster, en de modificatie van de methode een rol spelen.

Op basis van literatuuronderzoek werd gekozen voor de vanilline- $H_2SO_4$  methode met dimethylformamide (DMF) extractie, waardoor het tijdrovende ontschillen van de bonen achterwege kan blijven. Deze methode werd geoptimaliseerd, waarbij de volgende factoren onderzocht werden: het malen van het monster, de kwaliteit van het DMF, de zwavelzuur- en vanillineconcentratie van het kleurreagens, de lineairiteit van het extinctiegebied voor monsteroplossingen en de temperatuur waarbij de kleurreactie plaatsvindt. Op basis van dit onderzoek werd een analysevoorschrift opgesteld, waarmee binnen het laboratorium reproduceerbare resultaten verkregen worden. Voor een monster veldbonen met een gehalte van 0,56% catechine-equivalenten werd een CV(herhaalbaarheid) van 2,5% en een CV(reproduceerbaarheid binnen lab) van 3,8% vastgesteld.

## 1 INLEIDING

Eiwitrijke gewassen die in de EG verbouwd kunnen worden zijn in potentie belangrijke grondstoffen voor mengvoeders. De in deze gewassen aanwezige zgn. Anti Nutritionele Factoren (ANF's) beperken echter de toepassing ervan in de veevoeding. Door diverse DLO-instituten (CPO, IVVO, COVP, ATO, CABO en RIKILT) wordt, in onderling overleg, onderzoek verricht naar het terugdringen van ANF's in veevoedergrondstoffen. Een van de gewassen die hierbij aandacht krijgt is de veldboon. Tanninen behoren tot de groep van ANF's van veldbonen (*Vicia Faba*). Tot op heden is er binnen DLO geen expertise op het gebied van de analyse van tanninen. Behoeftte bestaat aan een specifieke methode bijvoorbeeld gebaseerd op HPLC. Deze methoden bevinden zich nog in een vroeg ontwikkelingsstadium. Daarnaast worden in de literatuur een aantal klassieke niet-specifieke methoden beschreven voor de bepaling van tanninen. Deze methoden, zoals de vanilline- $H_2SO_4$  methode, zijn gebaseerd op een relatief eenvoudige spectrofotometrische bepaling van een 'tanninegetal', en zijn geschikt voor screeningsdoeleinden. Aangezien het hierbij om empirische methoden gaat, is speciale aandacht nodig om ervoor te zorgen dat de resultaten behaald door verschillende personen en/of in verschillende laboratoria vergelijkbaar zijn. In dit rapport wordt onderzoek beschreven naar factoren die van invloed zijn op de resultaten van de vanilline- $H_2SO_4$  methode.

## 2 LITERATUURONDERZOEK

### 2.1 Tanninen in de veldboon (*Vicia Faba*)

Tanninen vormen een heterogene groep van verbindingen, die in het algemeen erg reactief zijn. Tanninen worden ingedeeld in twee hoofdgroepen, de hydrolyseerbare en de gecondenseerde tanninen. De *Vicia faba* boon, een peulvrucht die gebruikt wordt als veevoer, bevat voor zover bekend uitsluitend gecondenseerde tanninen, ook wel proanthocyanidinen genoemd. De proanthocyanidinen behoren tot de polyfenolen en zijn opgebouwd uit polymeren van flavanolen, waarbij de meest voorkomende bouwstenen (+)-catechine en (-)-epicatechine zijn (zie Figuur 1).



Binding kan op verschillende manieren plaatsvinden. De polymerisatiegraad kan tot heel hoog oplopen (molecuulgewichten tot 20000 worden wel genoemd). Enkele voorbeelden van polymeren staan in Figuur 2. Tanninen staan in de belangstelling, omdat ze de vervelende eigenschap bezitten om zich zeer stevig aan eiwitten en ook wel koolhydraten te binden. De gecomplexeerde eiwitten en koolhydraten zijn vervolgens niet meer beschikbaar als voedingsstof omdat ze niet of slecht verteerd kunnen worden. Dergelijke stoffen worden ook wel anti-nutritieve factoren (ANF's) genoemd. Van de proanthocyanidinen binden de polymeren met molecuulgewichten van 500 - 5000 het sterkst en zijn dus het meest schadelijk. De monomeren kunnen geen binding vormen en de polymeren met MW > 5000 zijn slecht oplosbaar, waardoor het eiwitbindende vermogen vermindert. Een ander probleem bij de toepassing van gewassen met hoge tanninegehalten als veevoer is de wrange smaak, die eetlustbelemmerend werkt.

Bij de veldboon bestaan bontbloeiende rassen met een hoog tanninegehalte en witbloeiende rassen met een laag tanninegehalte, maar die vooralsnog een lagere opbrengst hebben. De tanninen bevinden zich uitsluitend in de schillen van de bonen.

## 2.2 Klassieke methoden voor de bepaling van tanninen

De meest gebruikte methoden voor het bepalen van tanninen zijn de vanilline test, de Folin-Denis test en de Pruisisch blauw test. De Folin-Denis en de Pruisisch blauw methode zijn gebaseerd op het reducerend vermogen van fenolische hydroxylgroepen. Deze methoden zijn niet erg specifiek en bepalen alle fenolische verbindingen (fenolische zuren, flavonoiden, tanninen), waarbij de respons van stof tot stof verschilt. De vanilline methode is specifiek voor flavanolen, zowel monomeren als polymeren, en enkele nauw verwante verbindingen zoals dihydrochalconen. Essentieel voor de reactie met vanilline zijn vrije OH-groepen in de metapositie aan de A ring (Figuur 1) en een enkelvoudige binding op de 2,3 positie (Desphande, 1986). De reactie vindt plaats in zuur milieu. Het reactieproduct is rood gekleurd en de extinctie van de oplossing wordt bij 500 nm gemeten. Er zijn methoden die van zoutzuur en methoden die van zwavelzuur gebruik maken. Als

uitgangspunt is gekozen voor de vanilline/zwavelzuur methode volgens Kuhla (1981) om de volgende redenen.

- Er is al cijfermateriaal beschikbaar in Nederland met deze methode.
- De methode is gevoeliger dan de zoutzuur methode (Scalbert 1989).
- De methode is door Kuhla voor bonen geoptimaliseerd.
- De methode is door het gebruik van dimethylformamide als oplosmiddel geschikt voor het analyseren van hele bonen, omdat in dit oplosmiddel geen reactie van de tanninen uit de schil met eiwitten uit de kern kan plaatsvinden. Bij gebruik van andere oplosmiddelen zoals water en methanol kunnen deze reacties wel plaatsvinden en moeten de bonen eerst ontschild worden.

De analyse van tanninen wordt sterk bemoeilijkt door de grote reactiviteit. Ze vormen onoplosbare neerslagen met eiwitten en met metaalionen. Ze kunnen polymeriseren (zowel enzymatisch als door zwak zure hydrolyse) en onoplosbaar worden, ook oxideren ze erg makkelijk. In al deze gevallen is het niet meer mogelijk de betreffende tanninen te bepalen. Een monsteropwerking moet er dus op gericht zijn om de tanninen aan de ene kant zo kwantitatief mogelijk vrij te maken uit de matrix en aan de andere kant zo goed mogelijk te beschermen tegen reacties.

Een ander probleem bij het optimaliseren van methoden is dat bij vergelijkende proeven van bijvoorbeeld extractieprocedures, er verschillende resultaten worden gevonden voor verschillende rassen. Kennelijk hebben deze rassen tanninen van verschillende samenstelling en met verschillende eigenschappen.

### 2.3 Factoren die van invloed kunnen zijn op de analyse van tanninen

Daar de meeste factoren ook produktafhankelijk zijn, zullen hoofdzakelijk de effecten bij peulvruchten besproken worden.

De tanninen bevinden zich uitsluitend in de schillen van de bonen. Deze schillen zijn erg moeilijk te verkleinen omdat ze erg hard en taai zijn.

### 2.3.1 Deeltjesgrootte van het monster

De gehalten gevonden met vanilline methode kunnen onder andere sterk beïnvloed worden door de deeltjesgrootte van het monster.

Desphande (1986), vindt dat de tanninegehalten in "dry beans" met 25-50% afnemen wanneer de deeltjesgrootte van 820 naar 250  $\mu\text{m}$  verkleind wordt. Als mogelijke oorzaak noemt hij de toenemende tijden die nodig zijn om de vereiste deeltjesgrootte te bereiken en de daarmee gepaard gaande warmteontwikkeling (tijdens het malen werd niet gekoeld). Hij vindt een hoge correlatie tussen de toenemende oppervlakte en afnemende tannineconcentraties. De maalomstandigheden zouden zorgen voor oxidatie, polymerisatie en/of complexeringsreacties met de aanwezige eiwitten.

Kuhla et al vinden juist iets toenemende tanninegehalten in "Ackerbohnen" met een afnemende deeltjesgrootte (0,8-1,0 mm geeft 1,60 eq, 0,5 mm geeft 2,22 eq en 0,3 mm geeft 2,38 eq). Over de wijze van malen wordt niets vermeld.

Price (1978) beveelt aan dat ieder lab zijn eigen optimale maaltechniek bepaalt.

Mogelijk bestaat er een verband tussen warmteontwikkeling tijdens het malen en de tijd nodig om de gewenste deeltjesgrootte te bereiken enerzijds, en het vinden van lagere gehalten bij een kleinere deeltjesgrootte anderzijds. Wanneer er onder optimale omstandigheden gemalen wordt (bijv. kort en gekoeld) zou een ander effect de overhand krijgen, namelijk een betere extraheerbaarheid van de tanninen bij een kleinere deeltjesgrootte.

### 2.3.2 De extractie

Bij de extractie van tanninen moet een compromis bereikt worden tussen enerzijds de slechte oplosbaarheid van bepaalde groepen tanninen, waardoor lange extractietijden noodzakelijk zijn en anderzijds de reactiviteit van de opgeloste tanninen, waardoor weer verlies optreedt bij lange extractietijden.

Tanninen zijn goed extraheerbaar met oplosmiddelen als aceton, methanol, ethanol, water of dimethylformamide. Waterige aceton is een goed extractiemiddel omdat het oxidatie van tanninen minimaliseert (Mueller-Harvey, 1987). Aceton is echter helaas niet geschikt in combinatie met de vanilline methode omdat aceton met vanilline reageert. Methanol is een veelgebruikt extractiemiddel. Desphande (1985), vindt voor methanol een optimale extractietijd van 20 minuten (roeren bij kamertemperatuur) en voor 1% HCl in methanol een optimale extractietijd van 60 minuten (roeren bij kamertemperatuur).

In methanol lossen de tanninen van "Ackerbohlen" niet goed op, wel in methanol/water=50/50 (Kuhla, extractie 20 minuten bij 65°C). In deze vloeistoffen is echter complexvorming tussen tanninen en eiwitten mogelijk. Veel onderzoekers ondervangen dit door niet de hele bonen te onderzoeken maar alleen de schillen. De tanninen zitten namelijk uitsluitend in de schillen en de meeste eiwitten zitten in de kernen. Een nadeel hiervan is, dat het scheiden van kernen en schillen een tijdrovende bezigheid is.

Kuhla et al. vinden de hoogste gehalten met waterige dimethylformamide als extractiemiddel. De structuur van dimethylformamide maakt het vormen van waterstofbruggen onmogelijk, zodat complexvorming van eiwitten en tanninen vermeden wordt. Zij vinden in tegenstelling met onderzoekers die gebruik maken van methanol als extractiemiddel, gelijke gehalten in hele bonen en in apart geanalyseerde schillen en kernen. Om oxidatie tegen te gaan worden soms reducerende middelen toegevoegd. Ascorbinezuur wordt soms toegevoegd bij langdurige extracties, maar deze stof stoort bij de vanilline bepaling. Kuhla (1980) gebruikt sulfiet in de waterige fase (dimethylformamide/0,01 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in water = 80 / 20).

### 2.3.3 De stabiliteit van het gemalen monster

Vrij algemeen wordt aangenomen, dat de monsters snel na malen geanalyseerd moeten worden. De maximum bewaartijden die genoemd worden zijn onder meer: zo snel mogelijk analyseren, binnen enkele uren, binnen 8 uur, binnen 24 uur of binnen enkele dagen.

Desphande et al. vonden bij verschillende rassen bonen een afname van tanninegehalte na 7 dagen bewaren (afname 16-60% afhankelijk van het ras).

Price (1978) vond een grotere afname in tanninegehalte bij gemalen sorghum bewaard in papieren zakjes (zuurstofdoorlatend), dan in plastic zakjes (niet zuurstofdoorlatend).

#### 2.3.4 Relatieve vochtigheid

Desphande (1985) heeft bonen bewaard bij verschillende % relatieve vochtigheid en vond weinig verschil voor "normale" luchtvochtigheden. Van sorghum is bekend dat bij zeer hoge luchtvochtigheid de polymerisatie, die normaal is tijdens het rijpingsproces, doorgaat. Deze methode kan eventueel gebruikt worden als middel om de schadelijke tanninegehalten in sorghum te verlagen.

#### 2.3.5 De keuze van de standaard

Catechine is de meest gebruikte standaard bij de vanilline methode. Bekend is echter dat de gevoeligheid van de vanillinemethode beïnvloed wordt door de polymerisatiegraad van de proanthocyanidinen. Ook de reactiekinetiek is anders, zodat de reactieomstandigheden binnen nauwe grenzen constant gehouden moeten worden om reproduceerbare gehalten te kunnen vinden. Dit probleem is te omzeilen door een gezuiverde tanninefractie uit het te bepalen produkt te gebruiken als standaard. De samenstelling hiervan kan echter ook van de wijze van zuivering, van batch tot batch of van ras tot ras verschillen, zodat deze oplossing de resultaten van verschillende laboratoria moeilijk vergelijkbaar maakt.

Van alle kanten blijkt dat de analyse van tanninen bijzonder lastig reproduceerbaar te krijgen is.

Desphande (1986) beveelt dan ook aan bij onderzoeksresultaten altijd de deeltjesgrootte, extractietijd enz. te vermelden en in ieder geval binnen een laboratorium zo reproduceerbaar mogelijk te werken ten aanzien van maal- en extractieomstandigheden.

### 3 EXPERIMENTEEL

Voor de bepaling van tanninen met het vanilline-reagens is als uitgangspunt de methode van Kuhla gebruikt, deze methode is een modificatie van de methode van Swain (1959). Van de uiteindelijk gebruikte methode is een Intern Voorschrift gemaakt. Het voorschrift is als bijlage toegevoegd aan dit verslag.

Catechine werd gebruikt als standaard, ondanks de hieraan verbonden nadelen ( zie: 2.3.5 Keuze van de standaard).

In Figuur 3a en b zijn de spectra te zien van catechine na kleuring met vanilline en van een monster veldbonen na kleuring met vanilline. De absorptiemaxima verschillen maar liefst 8 nm. De oorzaak is onbekend. Besloten werd om bij 500 nm te blijven meten, zoals door Kuhla (1980) en Swain (1959) aangegeven wordt.

#### 3.1 Optimaliseren van de maaltechniek

Bij de door ons gebruikte maaltechnieken bleken de bereikte deeltjesgrootte en de verdeling van de deeltjesgrootte de belangrijkste factoren. Met een koffiemolen waren de bonen bijzonder moeilijk klein te krijgen. Daarom werd overgestapt naar een centrifugaalmolen (Retsch). Het bleek noodzakelijk om de bonen eerst grof voor te malen, omdat anders een zodanige warmteontwikkeling ontstond, dat het meel tegen de wanden van de molen ging plakken. Om een zo homogeen mogelijk monster te krijgen werd uiteindelijk gekozen voor: Grof voormalen over een 2 mm zeef, dan malen over een 0,2 mm zeef in de centrifugaalmolen. Door de grote krachten tijdens het malen werden er toch nog grotere deeltjes door de zeef heen geperst, daarom werd het meel hierna met de hand gezeefd over een 0,2 mm zeef. De grove fractie werd nogmaals gemalen in de centrifugaalmolen. Het meel werd hierna door middel van uitkruisen gehomogeniseerd. Voorzichtige behandeling van het monster is daarna geboden om ontmengen te voorkomen.

### 3.2 Het effect van de zuurconcentratie

In de methode Kuhla komt een onduidelijkheid voor ten aanzien van de zwavelzuurconcentratie. Deze wordt beschreven als 70 %, waarbij niet aangegeven wordt of dit gewichts- of volumepercenten zijn. Beide mogelijkheden geven een andere eindconcentratie zwavelzuur dan de oorspronkelijke Swain methode. De diverse concentraties zijn vermeld in tabel 1. De drie eindconcentraties zwavelzuur zijn met elkaar vergeleken. Hierbij is de verhouding monster/reagens van Kuhla (1 + 9) aangehouden, zodat de beginconcentratie zwavelzuur voor c. 19,6 N wordt.

Tabel 1: Overzicht van de onderzochte zuurconcentraties van het vanillinereagens.

	ml monster + ml reagens	eindconc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
a. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70 % v/v (26,4 N) (Kuhla)	1 + 9	23,4 N
b. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70 % w/w (14,2 N) (Kuhla)	1 + 9	12,8 N
c. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70 % v/v (26,4 N) (Swain)	2 + 4	17,7 N
(in verhouding Kuhla: 19,6 N	1 + 9	17,7 N)

a. Eindconcentratie zwavelzuur 23,4 N:

- Tijdens het mengen van monster en reagens loopt de temperatuur op tot ongeveer 35°C.
- Mengen gaat moeilijk omdat het zwavelzuur nogal visceus is.
- Zoals uit Figuur 4 en tabellen 2 en 3 blijkt, blijven de extincties sterk oplopen en zijn de duplo's slecht.

b. Eindconcentratie zwavelzuur 12,8 N:

- De vanilline lost slecht op in zwavelzuur 12,8 N.

- Het reagens ziet veel minder geel, dan wanneer aangemaakt met een hogere concentratie zwavelzuur.
  - De extinctie van de standaard loopt terug, terwijl de extinctie van het monster zo goed als gelijk blijft, zodat het gevonden gehalte sterk afhankelijk is van de tijd. Naarmate later gemeten wordt, wordt een hoger gehalte gevonden (zie Figuur 4 en tabel 3).
- c. Eindconcentratie zwavelzuur 17,7 N:
- De temperatuur loopt niet of nauwelijks op tijdens het mengen.
  - Naarmate later gemeten wordt, wordt een iets hoger gehalte gevonden.

Tabel 2: De invloed van de keuze van zuurconcentratie, volgens Kuhla of volgens Swain, op de duploverschillen. extincties gemeten na 15 min

catech. 17,7 N conc. ug/ml	zwavelzuurconcentratie								
	23,4 N			12,8 N					
	extinctie a	extinctie b	versch	extinctie a	extinctie b	versch	extinctie a	extinctie b	versch
20	0,250	0,236	0,014	0,068	0,068	0,000	0,064	0,063	0,001
40	0,490	0,498	0,008	0,181	0,158	0,023	0,147	0,149	0,002
100	1,258	1,272	0,014	0,257	0,398	0,141	0,329	0,324	0,005
200	2,501	2,544	0,043	0,568	0,594	0,026	0,847	0,849	0,002
400				1,288	1,158	0,130	1,668	1,677	0,009
schil	1,016	1,035	0,019	0,254			0,460	0,460	0,000



Tabel 3: De invloed van de zuurconcentratie op de gevonden gehalten aan catechine-equivalenten in schillen van *Vicia faba* bonen.

zuur conc	extinctie na 15 min	extinctie na 30 min	extinctie na 90 min
17,7 N st. cat. 100 ug/ml	1,265	1,242	1,146
monster schillen	1,026	1,053	1,060
cat.eq. ug/ml	82	85	92
23,4 N st. cat. 100 ug/ml	0,328	0,442	
monster schillen	0,254		
cat.eq.ug/ml	79		
12,8 N st. cat. 100 ug/ml	0,848	0,766	0,525
monster schillen	0,460	0,468	0,441
cat.eq.ug/ml	56	62	86

Aldus geeft de eindconcentratie zwavelzuur 17,7 N de beste resultaten, de duplospreiding is klein en de extincties zijn het meest stabiel. Bij de beide andere zwavelzuurconcentraties moet exact op tijd gemeten worden om reproduceerbare gehalten te vinden. Alle verdere metingen worden met deze zuurconcentratie uitgevoerd.

### 3.2.1. Invloed van een klein verschil in de zuurconcentratie

Van de beste concentratie is bovendien nog bepaald hoe nauwkeurig de zwavelzuurconcentratie moet zijn door een meetfout van + of - 5 ml in een maatcilinder van 250 ml na te bootsen. De hoeveelheden zwavelzuur werden in dit geval afgewogen.

Om de stabiliteit van de extinctie te bepalen zijn de extincties gemeten na precies 15 minuten (de normale reactietijd), 30 en 90 minuten.

Tabel 4: Het effect van een klein verschil in de zuurconcentratie op de gevonden tanninegehalten in schillen van *Vicia faba* bonen uitgedrukt in % ten opzichte van de normale procedure van 19,6 N  $H_2SO_4$  en na 15 minuten meten.

zuurconc	15 min	30 min	90 min
normaal (19,6 N)	100	101	103
hoog (20,3 N)	103	102	106
laag (18,9 N)	86	89	91

Uit tabel 4 blijkt dat ook een klein verschil (4%) in zuurconcentratie redelijke grote gevolgen heeft voor de gevonden gehalten, omdat het monster anders reageert dan de standaard. Vooral de laagste zuurconcentratie geeft veel lagere gehalten. Gekozen werd voor een zuurconcentratie van 20 N.

De zuurconcentratie moet dus nauwkeurig ingesteld worden op 20 N. De vereiste nauwkeurigheid kan alleen bereikt worden door het zwavelzuur door middel van afwegen te verdunnen.

### 3.3 De stabiliteit van de gemalen bonen tijdens bewaren

Gemalen monsters werden variërend van een dag tot zes weken in het donker en bij kamertemperatuur bewaard in goed afgesloten monsterpotjes. Alle monsters bestonden uit 100 gram gemalen bonen en kwamen uit dezelfde partij.

Voor de langer bewaarde monsters worden significant lagere gehalten gevonden ( $\alpha < 0,05$ ) (zie tabel 5).

Tabel 5: De invloed van bewaren van gemalen monsters op de gevonden

vers / kort bewaard		lang bewaard	
bewaartijd in dagen	% catechine equivalenten	bewaartijd in dagen	% catechine equivalenten
0	0,568	14	0,548
0	0,573	15	0,554
1	0,528	16	0,506
1	0,546	27	0,502
2	0,576	47	0,510
2	0,548	48	0,520
2	0,561		
gem 0,557 sem= 0,008		gem 0,523 sem= 0,010	
significant verschillend ( $\alpha < 0,05$ )			

### 3.4 De kwaliteit van de DMF

Kuhla benadrukt het feit, dat de DMF van goede kwaliteit moet zijn. Er mogen vooral geen sporen formaldehyde inzitten, omdat formaldehyde evenals vanilline reageert met tanninen (er bestaat zelfs een oude bepalingsmethode die hiervan gebruik maakt).

Dat de kwaliteit van de DMF inderdaad erg nauw luistert, bleek toen in plaats van pro analyse kwaliteit, een aantal analyses met een restant van een andere kwaliteit werden uitgevoerd. Vergeleken werden DMF pro analyse (Merck 3053) en DMF zur Rückstandsanalyse (Merck 10983).

Tevens werd de houdbaarheid van een eenmaal geopende fles bekeken tot 2 weken.

De gehalten verkregen met DMF zur Rückstandsanalyse lagen veel lager (zie tabel 6). Zowel de ijkfactor (richtingscoëfficiënt ijklijn) van de catechinestandaard, als de gevonden gehalten waren veel te laag.

Tabel 6: De invloed van de kwaliteit DMF.

Monster	DMF kwaliteit	ijk- factor	% catech. <sup>1)</sup> equival.	DMF	ijk- factor	% catech. equival.
A	DMF 10983	0,0199	0,388 0,378	DMF p.a. 3053	0,0253	0,499 0,514
B	DMF 10983	0,0194	0,473 0,464	DMF p.a. 3053	0,0245	0,567 0,584

1) alle opgegeven % catechine-equivalenten zijn gemiddelden van duplo's

Tussen een nieuw geopende fles en een fles van dezelfde batch, die al 2 weken open was werd geen verschil gevonden (zie tabel 7).

Tabel 7: De houdbaarheid van de DMF pro analyse.

Tijd na openen fles	% catechineequivalenten
direct	0,555
1 uur	0,554
3,5 uur	0,562
1 dag	0,551
13 dagen	0,569

In het algemeen kan gesteld worden, dat wanneer er een afwijkende ijk-factor gevonden wordt, de resultaten met wantrouwen bekeken moeten worden. Dit geldt vooral wanneer een te lage ijkfactor gevonden wordt.

### 3.5 Invloed van de monsterconcentratie en de vanillineconcentratie

Op een gegeven moment bleek dat de catechine-ijklijn weliswaar over een zeer groot gebied lineair liep, maar de gehalten gevonden bij verschillende verdunningen van het monster niet. Bij hogere concentraties monster in de meetoplossing werden lagere gehalten gevonden (Figuur 5). Een eventuele oorzaak zou kunnen zijn, dat de vanilline bij de meer geconcentreerde monsteroplossingen in onvoldoende overmaat aanwezig is om een aflopende reactie te garanderen. Daarom is een experiment gedaan met verschillende concentraties vanilline in het reagens en verschillende concentraties monster in de meetoplossing. In Figuur 6a en 6b zijn de resultaten weergegeven van de gehalten die aldus gevonden worden. Bij hogere concentraties vanilline worden er over de hele linie hogere tanningehalten gevonden. De gehalten gevonden in de meest geconcentreerde meetoplossingen liggen echter nog steeds te laag. Bovendien zijn bij de hoogste vanillineconcentraties de blancowaarden erg hoog. Daarom is besloten om de vanillineconcentratie te handhaven op 0,2% zoals aangegeven door Kuhla (1981). Uit Figuur 5 blijkt dat bij een vanillineconcentratie van 0,2% boven een extinctie van 0,5, een afwijking van het lineair verband optreedt en de gevonden gehalten in monsteroplossingen niet meer constant zijn. De extincties van de meetoplossingen van de monsters dienen dus tussen de 0,2 en 0,5 te liggen.

Vanillineoplossingen van 1 en 2 dagen oud gaven nog dezelfde resultaten, de blanco loopt echter wat op en de kleur verloopt van helder geel naar geelbruin. Besloten werd om de oplossing toch iedere dag vers te maken.

### 3.6 De temperatuur van het koelwaterbad en het effect van filtreren of centrifugeren

Bij het mengen van de monsteroplossing en vanilline/ $H_2SO_4$  reagens ontstaat wat warmte. Om de temperatuur tijdens de reactie constant te houden, wordt het reactiemengsel direct na mengen in een koelwaterbad gezet. Onderzocht is of de temperatuur van het waterbad van invloed is op het eindresultaat, met als doel na te gaan of het noodzakelijk is

een gethermostreerd waterbad hiervoor te gebruiken of dat volstaan kan worden met een waterbad op kamertemperatuur. Vergeleken werden 20°C en 30°C.

Volgens Delcour (1988) kunnen polyfenolen aan papier adsorberen. Daarom werd een proef gedaan waarbij een gefiltreerd extract vergeleken werd met een gecentrifugeerd extract. In tabel 8 zijn de resultaten vermeld.

Tabel 8: Vergelijking van de reactie bij 20°C of 30°C en gecentrifugeerd of gefiltreerd. Resultaten uitgedrukt in % catechineequivalenten.

---

Extract	20°C	20°C	30°C	30°C
	centrifugeren	filtreren	centrifugeren	filtreren
A	0,517	0,515	0,572	0,562
B	0,542	0,541	0,570	0,592
C	0,560	0,542	0,575	0,570

---

De reactie bij 30°C levert hogere gehalten op. Analoog aan Kuhla (1981) is ervoor gekozen om de reactie bij een vaste temperatuur, namelijk  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , te laten verlopen. De gecentrifugeerde extracten leverden geen hogere gehalten op dan de gefiltreerde extracten.

### 3.7 Verkleinen en extraheren met de Prolabo kogelschudder

De mogelijkheid van een gecombineerde verkleining en extractie met een Prolabo kogelschudder werd onderzocht. Tien bonen werden eerst met een hamer verkleind en vervolgens met 25 ml DMF/sulfietoplossing 10 minuten geschud, afgefiltreerd en aangevuld tot 100 ml.

In de eerste proef werden de schillen goed verkleind, maar het bleek, dat de kogels zodanig slecht waren, dat er metaalschilfers afkwamen. Toen de proef herhaald werd met nieuwe kogels lukte het niet meer om met name de schillen (die de tanninen bevatten) voldoende te verkleinen. Er werden geen reproduceerbare resultaten verkregen.

### 3.8 Enkele maatregelen ter verbetering van de nauwkeurigheid

Kuhla voegt 25 ml DMF toe aan de inweeg. Na extractie wordt niets meer gedaan om voor het volumeverlies tijdens het koken te compenseren. Dit volumeverlies zou nogal kunnen verschillen, onder andere doordat het waterbad niet erg konstant en niet erg homogeen van temperatuur was. Dit probleem kon worden ondervangen door de extractie in een maatkolf van 50 ml uit te voeren. Na de extractie met 25 ml DMF/ sulfiet oplossing werd het volume aangevuld met DMF/sulfiet oplossing tot 50 ml. Ook werd een roermotor in het waterbad gehangen, waardoor een betere beheersing van de watertemperatuur verkregen werd.

Het toevoegen van het vanilline/ $H_2SO_4$  reagens gebeurde met een Gilson pipet. Het bleek dat de pipet met eenzelfde pipetpunt na een aantal malen pipetteren steeds minder toevoegde. Na 11 maal pipetteren werd er ongeveer 2% minder toegevoegd (zie ook tabel 9). Proeven met andere pipetten leverden geen echte verbetering op, zodat besloten werd met dezelfde pipet door te gaan, maar om na een paar maal pipetteren de punt te vervangen.

Tabel 9: De invloed van het herhaald pipetteren van de vanillinezwa-  
velzuuroplossing met eenzelfde pipetpunt.

	van/ $H_2SO_4$ in g	afname t.o.v. vorige	afname cumulatief
1	6,9514		
2	6,8895	0,0619	0,0619
3	6,9050	-0,0155	0,0464
4	6,8803	0,0247	0,0711
5	6,8726	0,0077	0,0788
6	6,8491	0,0235	0,1023
7	6,8454	0,0037	0,1060
8	6,8433	0,0021	0,1081
9	6,8314	0,0119	0,1200
10	6,8045	0,0269	0,1469
11	6,8055	-0,0010	0,1459

Tenslotte is er ook nog gekeken naar het effect op het resultaat van de manier van toevoegen van het reagens. Mengen al tijdens het toevoegen en mengen direct na het toevoegen bleek geen verschil in resultaat te geven.

### 3.9 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid binnen het laboratorium

Aan de hand van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten werd de methode geoptimaliseerd en vastgelegd in een intern voorschrift (Bijlage 1). Met behulp van dit voorschrift werd een identiek monster veldbonen op verschillende dagen geanalyseerd, waarbij tevens de kleurreactie en spectrofotometrische meting in duplo in identieke extracten werd uitgevoerd.

Uit tabel 10 blijkt dat de spreiding tengevolge van de kleurreactie en -meting,  $s(\text{reactie})$ , klein is t.o.v. de totale analytische variatie,  $s(\text{herhaalbaarheid})$ . Hierbij is  $s(\text{herhaalbaarheid})$  gecorrigeerd voor de meting in duplo in één extract. Tevens blijkt dat, zoals verwacht kan worden, de variatie van dag tot dag,  $s(\text{reproduc.lab})$ , groter is dan  $s(\text{herhaalbaarheid})$ . Dit verschil is echter zeer acceptabel, zodat geconcludeerd kan worden dat deze methode reproduceerbare resultaten binnen het laboratorium geeft.



Tabel 10: Analyseresultaten van een identiek monster veldbonen verkregen met de geoptimaliseerde methode beschreven in Bijlage 1.

datum	ijk-factor	% cat extr A	% cat extr B	% cat extr C
31/1	0,0278 0,573	0,578 0,575	0,570 0,574	0,577
2/2	0,0245	0,563 0,567 0,571	0,581 0,584 0,587	
9/2	0,0276	0,571 0,577 0,583	0,558 0,554 0,550	0,568 0,574 0,581
21/2	0,0267	0,517 0,518 0,518	0,542 0,542 0,541	0,560 0,551 0,542
-----				
x(gem)		= 0,562		
s(reactie)		= 0,0066		
s(herhaalbaarheid)		= 0,0140	CV(herhaalbaarheid)	= 2,5%
s(reproduc.lab)		= 0,0215	CV(reproduc.lab)	= 3,8%
x(gem ijkfactor)		= 0,0267		
s(ijkfactor)		= 0,0015		

#### 4 CONCLUSIE

Bij de bepaling van tanninen in veldbonen met behulp van de vanilline- $H_2SO_4$  methode spelen een groot aantal factoren een rol, die zowel de analysespreiding als het analyseiniveau beïnvloeden.

- Voor het malen van de bonen is een centrifugaalmolen noodzakelijk; een tweestaps procedure is hierbij vereist. De gemalen bonen zijn na enkele dagen niet meer geschikt voor de analyse.
- Het extractiemiddel DMF moet ten minste van pro analysekwaliteit zijn. Slechte kwaliteit DMF kan herkenbaar zijn aan een te lage richtingscoëfficiënt van de ijklijn. De resultaten zijn in dat geval onbetrouwbaar.
- De zwavelzuurconcentratie in het kleurreagens blijkt een belangrijke factor, omdat de standaard catechine die gebruikt wordt voor de ijklijn, anders reageert op verschillen in zuurconcentratie dan het monster. De concentratie zuur aangegeven door Swain (1959), gaf de beste resultaten. Bij deze zuurconcentratie wordt tussen 15 en 30 min een stabiele extinctie gemeten. Omdat de zwavelzuurconcentratie de helling van de ijklijn sterk bepaalt, moet deze zuurconcentratie nauwkeurig worden ingesteld. De vereiste nauwkeurigheid kan alleen via afwegen worden bereikt.
- Het gemeten tanninegehalte is afhankelijk van de concentratie vanilline in het kleurreagens: bij hogere vanillineconcentraties worden hogere tanninegehalten gevonden. Conform Kuhla (1981) wordt gekozen voor een concentratie van 0,2% vanilline in de meetoplossing.
- In tegenstelling tot de ijklijn voor catechine, die over een zeer groot gebied lineair is, wordt bij hogere 'monsterconcentraties' in de meetoplossing geen lineair verband meer gevonden. De extincties van de meetoplossingen van de monsters dienen derhalve beneden 0,5 te blijven.
- De vanillinereactie moet bij een vaste temperatuur plaatsvinden. Temperatuursverhoging leidt tot hogere gehalten. Conform Kuhla (1981) wordt gekozen voor  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Met een op bovenstaande conclusies gebaseerd voorschrift (Bijlage 1) konden binnen het laboratorium reproduceerbare resultaten verkregen worden. Voor een monster veldbonen met een gehalte van 0,56% catechine-equivalenten werd een CV(herhaalbaarheid) van 2,5% en CV(reproduceerbaarheid binnen lab) van 3,8% vastgesteld.

5 LITERATUUR

Desphande S.S., M. Cheryan, J. Food Science, 50, (1985), 905-910.

Pilnik W., Diktaat LUW vakgroep Levensmiddelentechnologie, (1978), Polyfenolen.

Desphande S.S., M. Cheryan, D.K. Salunkhe, CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutrition, 24, (1986), 401-449.

Scalbert A., B. Monties, G. Janin, J. Agric. Food Chem., 37, (1989), 1324-1329.

Kuhla S., C. Ebmeier, Arch. Tierernahrung, 31, (1981), 573-588.

Price M.L., S. van Scoyoc, L.G. Butler, J. Agric. Food Chem., 26, (1978), 1214-1218.

Self R., J. Eagles, G.C. Galetti, I. Mueller-Harvey, R.D. Hartley, A.G.M. Lea, D. Magnolato, U. Richli, R. Gujer, E. Haslam, Biomed. Environm Mass Spectrometry, 13, (1986), 449-468.

Castele K. van de , H. Geiger, R. de Loose, C.F. van Sumere, J. Chrom. 259, (1983), 291-300.

Swain T., W.E. Hillis, J. Sci. Food Agric., 10, (1959), 63-68.

Doorn W. van, stageverslag ATO: Tannine analyse in veldbonen (1989).

Delcour J.A., In: Modern methods of plant analysis Springer Verlag, Berlin (1988), vol 7.

Intern analysevoorschrift.  
(2<sup>e</sup> versie)

28/02/90

De bepaling van het gehalte aan gecondenseerde tanninen (volgens Kuhlmann).

## 1 PRINCIPE

De gecondenseerde tanninen worden geëxtraheerd met dimethylformamide/0,01 m natriummetabisulfaat = 80/20. Na uitvoeren van een kleurreactie met vanilline/zwavelzuur reagens wordt de extinctie gemeten bij 500 nm. Deze extinctie wordt vergeleken met de extinctie van een catechine ijkoplossing.

## 2 REAGENTIA

Alle reagentia dienen van analysekwaliteit te zijn tenzij anders voorgeschreven.

2.1 Dimethylformamide DMF (Merck 3053).

2.2 Natriummetabisulfaat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) 1 m (stockoplossing): Los op 19,0 g natriummetabisulfaat en vul aan tot 100 ml. Deze oplossing is in de koelkast een week houdbaar. Verdun voor gebruik 100 keer tot 0,01 m.

2.3 DMF/0,01 m  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  = 80/20 oplossing. Meng 80 delen dimethylformamide (2.1) met 20 delen natriummetabisulfaatoplossing (2.2). Maak deze oplossing iedere dag vers.

2.4 Standaardoplossing catechine: Los op 106,6 mg catechine. $\text{H}_2\text{O}$  in water en vul aan tot 100 ml. Deze oplossing bevat 1 mg/ml catechine. Maak deze oplossing iedere dag vers en bewaar de oplossing in het donker.

## 2.5 Zwavelzuur 95-97%.

2.5.1 Zwavelzuur 20 N: Weeg af 446 g water en weeg af 1020 g zwavelzuur (2.5). Voeg voorzichtig al roerend het zwavelzuur bij het water. Breng het restant zwavelzuur kwantitatief over met behulp van het verdunde zwavelzuur, zodat alle zwavelzuur en alle water opgenomen wordt in het mengsel.

Opmerking: Gebleken is dat een nauwkeurige zwavelzuurconcentratie erg belangrijk is. Daarom worden de hoeveelheden afgewogen en niet afgemeten met een maatcilinder.

2.6 Vanilline/zwavelzuur oplossing: Weeg af 0,220 g vanilline en los op in de zwavelzuuroplossing 20 N (2.5.1) en vul aan tot 100 ml. Maak deze oplossing iedere dag vers.

## 3. APPARATUUR

3.1 Centrifugaalmolen met 2 mm en 0,2 mm zeven.

3.2 Waterbad van 100°C voorzien van roermotor, terugvloeikoelers en stikstofgasinlaat.

3.3 Press-to-mix apparaat voor het mengen van de inhoud van reageerbuizen. (Vortex-mixer).

3.4 Waterbad 20°C voorzien van roermotor.

3.5 Spectrofotometer of colorimeter geschikt voor het meten bij een golflengte van 500 nm.

## 4. UITVOERING

#### 4.1 Monstervoorbewerking

Maal met behulp van de centrifugaalmolen (3.1) een representatief monster bonen van tenminste 100 g door de zeef van 2 mm. Maal het verkregen meel opnieuw in de centrifugaalmolen, die nu echter voorzien is van de 0,2 mm zeef. Zeef het meel vervolgens met de hand over een 0,2 mm zeef (3.2), en maal de achterblijvende grove fractie opnieuw met de centrifugaalmolen (0,2 mm zeef). Homogeniseer het meel door middel van uitkruisen. Behandel het verkregen monster voorzichtig om ontmengen te voorkomen.

N.B.: Gemalen bonen/schillen zijn na enkele dagen niet meer geschikt voor de analyse!

4.2.1 Weeg af circa 0,500 g versgemalen bonen of 100,0 mg schillen in een 50 ml maatkolf met ingeslepen stop. Voeg toe 25,0 ml DMF/0,01 m  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 = 80/20$  (2.3). Verwarm 10 minuten in het kokende waterbad (3.2) onder terugvloeiakoeling en onder stikstof, zwenk regelmatig om. Koel af en vul aan met DMF/ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (2.3). Filtreer over vouwfilter, en gooi de eerste paar ml van het filtraat weg.

4.2.2 Pipetteer afhankelijk van het te verwachten gehalte (bij gehalte van ongeveer 0,25% catechine-equivalenten) 0,5 ml filtraat of minder in twee reageerbuizen, vul aan tot 0,5 ml met DMF/sulfiet oplossing (2.3). Voeg aan de ene buis tijdens het "vortexen" met behulp van een mechanische pipet 4,5 ml vanilline/zwavelzuur (2.6) toe. (N.B.: vervang de pipetpunt in ieder geval na vier keer pipetteren om onnauwkeurig doseren te voorkomen). Plaats de buis direct hierna in het waterbad van 20°C (3.4). Voeg aan de andere buis (blanco monster) 4,5 ml zwavelzuuroplossing 20 N (2.5.1) toe, meng goed en plaats de buis eveneens in het waterbad. Meet na minimaal 15 en maximaal 30 minuten bij 500 nm de extinctie van monster (E) en blanco monster (E(b)).

N.B.: De extinctie van de meetoplossing dient beneden 0,5 te blijven.

## 5 IJKLIJN

Pipetteer uit de standaardoplossing catechine 1 mg/ml (2.4): 0, 1, 0, 2, 0 en 3, 0 ml in maatkolven van 50 ml. Vul aan met DMF/0,01 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  = 80/20 (2.3). Voer voor elk van de aldus verdunde standaardoplossingen de kleurreactie uit zoals beschreven onder punt 4.2.2. Bereken voor elk van de vier ijkpunten E - E(b) en bepaal door middel van lineaire regressie de ijklijn. (De asafsnede komt overeen met de extinctie veroorzaakt door de vanilline). De punten van de standaardreeks komen overeen met 0, 10, 20 en 30 ug catechine.

De richtingcoëfficiënt van de ijklijn behoort  $0,0267 \pm 0,0030 \text{ ug}^{-1}$  te bedragen. Een afwijkende waarde kan wijzen op een ongeschikte kwaliteit DMF. Resultaten verkregen met een afwijkende ijklijn moeten met wantrouwen bekeken worden.

## 6 BEREKENING

Bereken E - E(b) bepaald in 4.2.2, en bepaal hieruit m.b.v. de ijklijn het aantal ug catechine (m).

Bereken het gehalte aan gecondenseerde tanninen als % catechine-equivalenten met de volgende formule:

$$\frac{m * 50}{v * w} * \frac{100 \%}{1.000.000} = \% \text{ catechine-equivalenten.}$$

waarbij :

m = aantal ug catechine gevonden met de ijklijn.

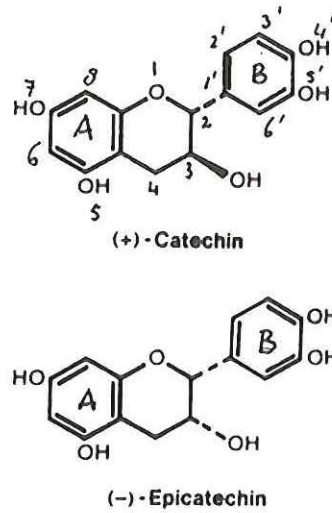
v = volume filtraat in ml.

w = inweeg in grammen.

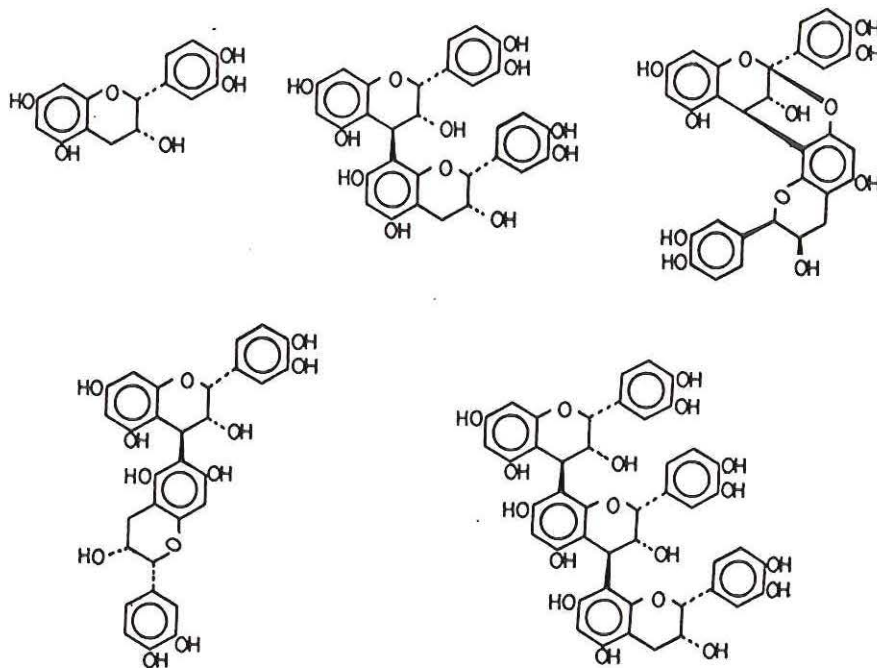
## 7 LITERATUUR

S.Kuhla, C.Ebmeier, Arch. Tierernahrung, (1981), 31, 573-588.

Untersuchungen zum Tanningehalt in Ackerbohnen.



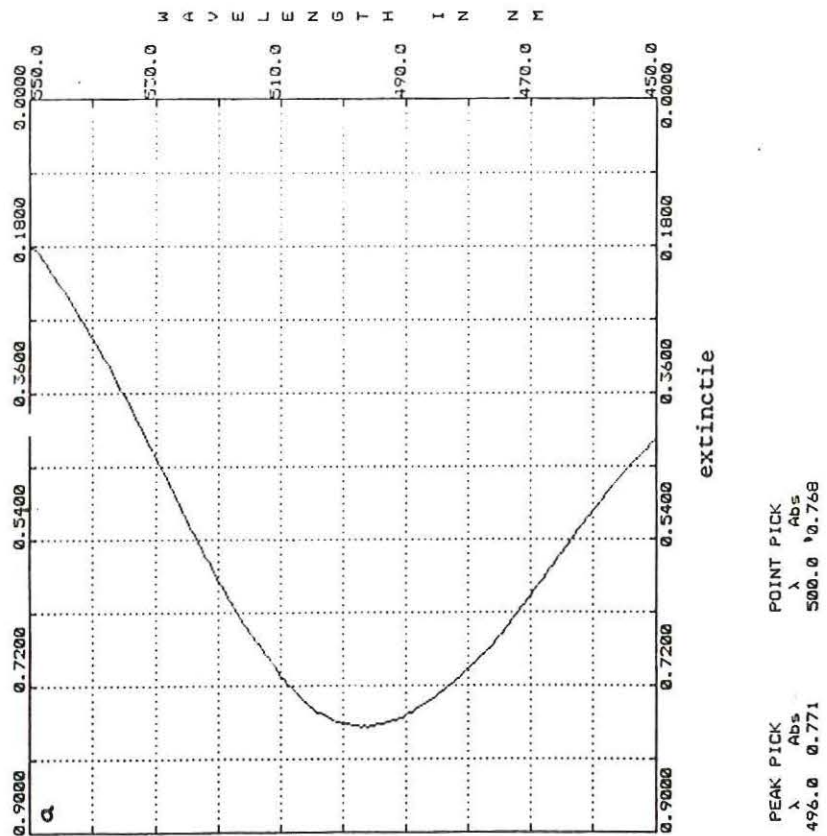
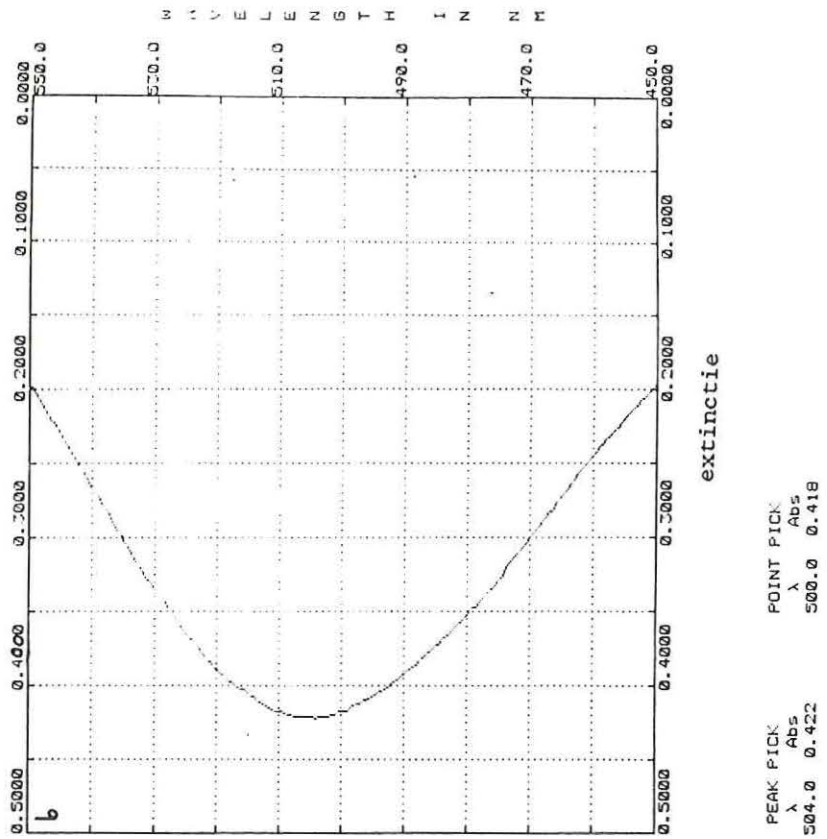
Figuur 1: De structuurformules van catechine en epicatechine.



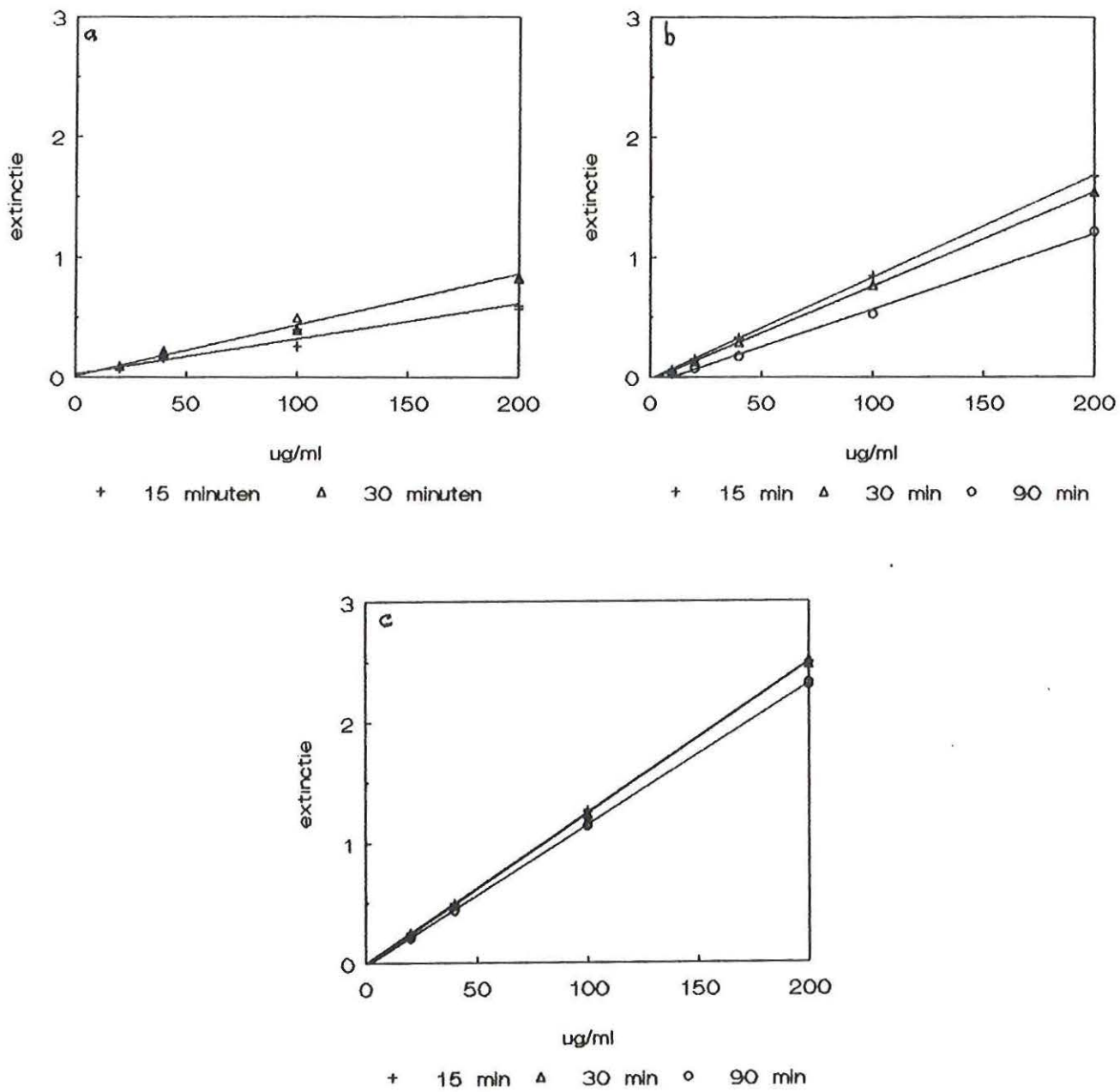
Figuur 2: Enkele voorbeelden van polymeren van proanthocyanidinen.

Uit: S.Morimoto et al Chem. Pharm. Bull. (1986), 34, 633-642.



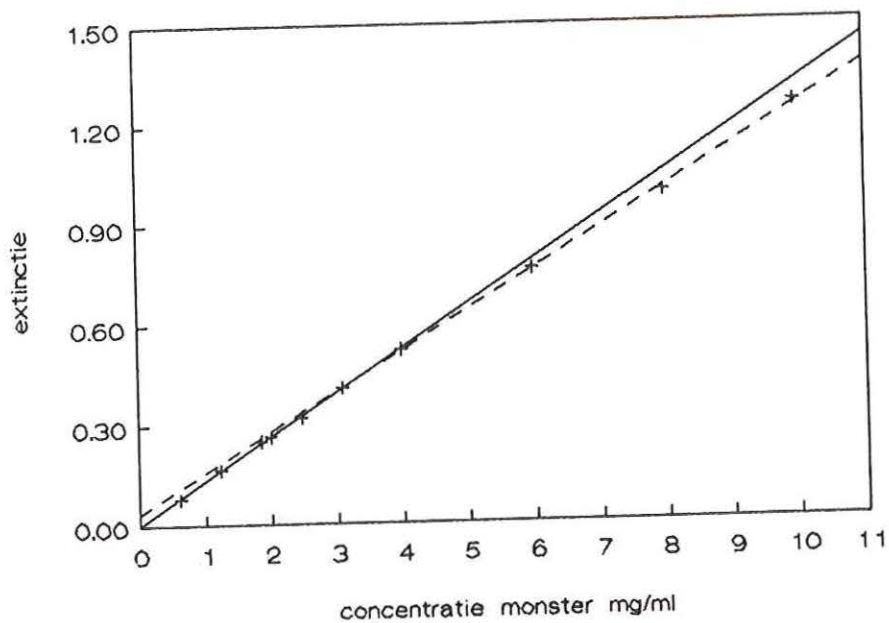


Figuur 3: a. Absorptiespectrum van standaardcatechine na reactie met vanilline.  
b. Absorptiespectrum van een monster schillen van *Vicia faba* bonen na reactie met vanilline.

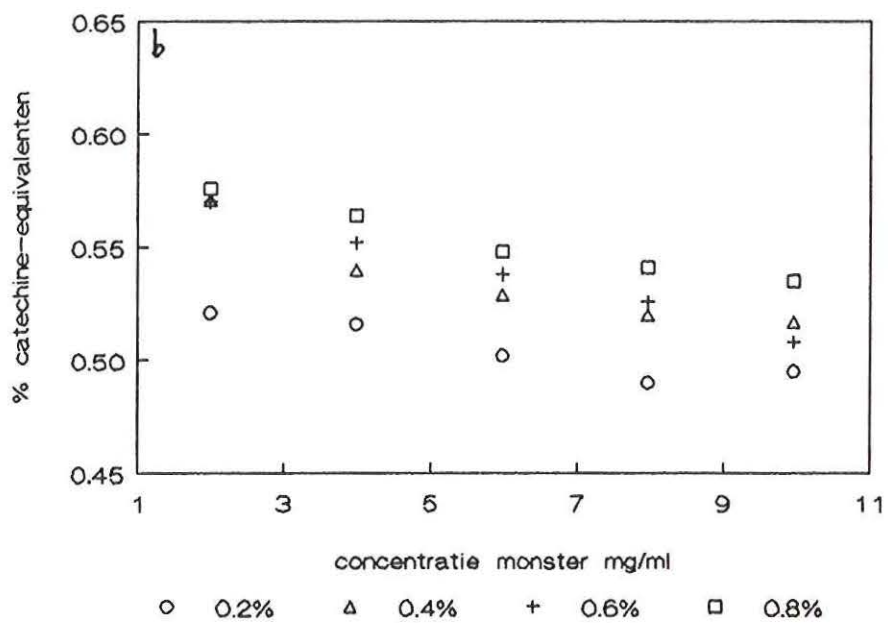
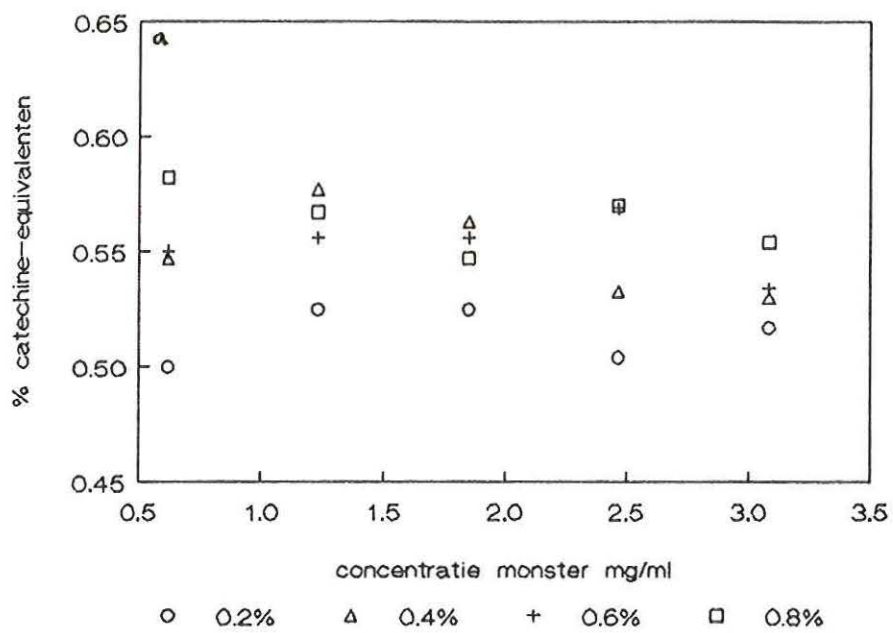


Figuur 4: De invloed van de zwavelzuurconcentratie op het verloop van de ijklijn.

- a. Eindconcentratie zwavelzuur 23,4 N.
- b. Eindconcentratie zwavelzuur 12,8 N.
- c. Eindconcentratie zwavelzuur 17,7 N.



Figuur 5: Het verband tussen de extinctie van verschillende verdunningen van een identieke monsteroplossing en de concentratie van het monster in de meetoplossing, gemeten bij een vanillineconcentratie van 0.2%.



Figuur 6a en 6b: De invloed van de concentratie vanilline op het tanninegehalte bepaald bij verschillende verdunningen van een identieke monsteroplossing.