

Metodika

**STANOVENÍ OBSAHU FLUORU VE
VEDLEJŠÍCH PIVOVARSKO-SLADAŘSKÝCH
PRODUKTECH**



Metodika

Stanovení obsahu fluoru ve vedlejších pivovarsko-sladařských produktech



Autoři:

Mgr. Tomáš Horák.

Ing. Karel Štěřba, Ph.D.

RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Zástupce autorského týmu: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Poskytovatel: TAČR TE02000177 “Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků”

Recenzenti:

RNDr. Jiří Zbírál, Ph.D, ÚKZUS NRL, Hroznová 2, 65 606 Brno

Prof. Ing. Pavel Dostálek, CSc., Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, technická 5, 16628 Praha

Osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky vydal: MZe, Úsek potravinářských výrob – Úřad pro potraviny, Odbor bezpečnosti potravin, Těšnov 17, 117 05 Praha 1, V Praze dne xx.x.2016, osvědčení č. x/2016.

Uživatel metodiky: Menedelova univerzita v Brně

Číslo interní metodiky VÚPS VÚPS/2016/005-FL

Autoři:

Ing. Tomáš Horák, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, Praha 2, 120 44

Ing. Karel Štěrba, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, Praha 2, 120 44

RNDr. Jana Olšovská, Ph.D., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, Praha 2, 120 44

© Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2016

ISBN 978-80-86576-70-1

OBSAH

Problematika	4
I CÍL METODIKY	4
II VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
1. Použitelnost metody	5
2. Princip metody	5
3. Terminologie a definice	5
4. Rušivé vlivy	6
5. Přístroje a zařízení	6
6. Chemikálie, roztoky a materiály	6
7. Odběr a přechovávání vzorků	8
8. Postup stanovení	8
9. Výpočet a vyhodnocení	11
10. Parametry metody	11
III SROVNÁNÍ NOVISTI POSTUPU	13
IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	14
V EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY	14
VI SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	14
VII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	14

Problematika

Vzhledem k možným škodlivým účinkům nadměrného příjmu fluoru na zdraví zvířat a lidí je obsah fluoru ve vedlejších pivovarsko-sladařských produktech, které jsou používány pro přípravu hospodářských krmiv, (mláto, sladový květ, kvasnice), limitován v souladu s nařízením č. 356/08 právního řádu České republiky. Nařízení odráží pokyny Evropského výboru 2008/76/ES ze dne 25. července 2008 a nařízení Komise EU č. 574/2011 ze dne 16. června 2011, a stanovuje jeho limit v těchto matricích na 150 mg/kg.

Producenti krmiv, včetně výše zmíněných pivovarsko-sladařských produktů, musí věnovat pozornost obsahu fluoru v těchto komoditách, neboť u nich může docházet i k překročení tolerovaných mezí. Z tohoto důvodu je nutné mít k dispozici vhodnou metodiku pro stanovení fluoru v těchto matricích.

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je předložit rutinní, reprodukovatelný postup pro stanovení obsahu fluoru v pivovarsko-sladařských produktech jako je mláto, sladový květ a kvasnice pomocí metody plynové chromatografie, který bude reflektovat pro tyto komodity stanovený legislativní limit 150 mg/kg.

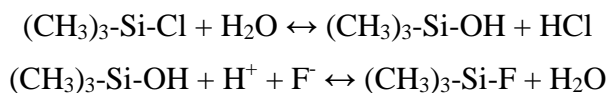
II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Použitelnost metody

Metodou lze stanovit obsah fluoru v mlátu, sladovém květu a pivovarských kvasnicích.

2. Princip metody

Zvířata jsou vystavena iontové formě prvku, fluoridovému aniontu (F^-), který může být přítomen v krmivech. Ionty fluoru, uvolněné ze snadno rozpustných sloučenin, jsou téměř zcela vstřebatelné z gastrointestinálního traktu monogastrických druhů pasivní difúzí. Extrakční postup této metody proto zahrnuje mírně kyselé působení pomocí 1 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkové, která by měla vyjadřovat koncentraci žaludeční kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l – 0,3 mol/l. Poté jsou fluoridové ionty derivatizovány a extrahovány pomocí trimethylchlorosilanu (TMCS) v toluenu. Fluoridové ionty jsou pomocí tohoto činidla převedeny na trimethylfluorosilan (TMFS). Průběh reakcí ukazuje následující schéma:



K přesné kvantifikaci se používá n-pentan jako vnitřní standard. K vlastnímu stanovení se využívá metoda plynové chromatografie za použití plamenoionizačního detektoru. Díky své jednoduchosti, přesnosti a citlivosti je právě plynová chromatografie vhodná pro stanovení i stopových množství fluoru.

3. Terminologie a definice

TMCS – trimethylchlorosilan

TMFS – trimethylfluorosilan

GC – plynová chromatografie

FID – plamenoionizační detektor

4. Rušivé vlivy

Odezvy sledovaných látek v chromatogramu jsou čistě separované a nebyly zjištěny interferující látky rušící stanovení.

5. Přístroje a zařízení

- kádinka 250 ml, 150 ml
- odměrný válec o objemu 100 ml, 50 ml, 25 ml
- pipeta o objemu 100 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml
- stříkačka o objemu 250 μ l, 100 μ l
- odměrná baňka o objemu 50 ml a 1 000 ml se zábrusem a skleněnou zátkou
- papírový filtr
- Erlenmayerova baňka o objemu 100 ml a 250 ml
- Büchnerova nálevka s membránovou vývěvou
- pasterka
- sušárna
- laboratorní mlýnek umožňující mletí na velikost částic menší nebo rovné 0,5 mm
- ultrazvuková lázeň
- lednice s mrazničkou
- váhy s přesností 0,0001 g
- pH metr
- třepačka
- kapilární kolona J&W DB-5 (20 m, 0,18 mm, 0,18 mm) nebo ekvivalent od jiného výrobce
- plynový chromatograf s nástřikem split/spitless, plamenoionizačním detektorem a datastanicí pro sběr a vyhodnocení naměřených dat.

6. Chemikálie, roztoky a materiály

- trimethylchlorsilan
- fluorid sodný
- kyselina chlorovodíková
- n-pentan
- toluen

- redestilovaná voda
- síran sodný bezvodý
- helium v kvalitě 5,0
- syntetický vzduch
- vodík v kvalitě 5,0.

Příprava roztoku A

50 μ l n-pentanu se přidá do 100 ml toluenu.

Příprava 1 M kyseliny chlorovodíkové

83 ml kyseliny chlorovodíkové se přidá do odměrné baňky o objemu 1 000 ml a doplní se redestilovanou vodou po rysku.

Příprava zásobního a pracovních roztoků standardů

Fluorid sodný se suší při teplotě 105 °C po dobu 2 h. Zásobní roztok standardu se připraví navážením 0,222 g NaF do 100 ml odměrné baňky a rozpuštěním v redestilované vodě.

Pracovní roztok standardu 1 se připraví rozpuštěním 0,1 ml zásobního roztoku v 100 ml odměrné baňce doplněné po rysku redestilovanou vodou.

Pracovní roztok standardu 2 se připraví rozpuštěním 0,5 ml zásobního roztoku v 100 ml odměrné baňce doplněné po rysku redestilovanou vodou.

Příprava kalibračních standardů

Ke 20 ml roztoku pracovního roztoku 1 nebo 2 se přidají 2 ml kyseliny chlorovodíkové a intenzivně se v ruce protřepe po dobu 1 min. Poté se přidají 2 ml chlorotrimethylsilanu. Baňka s touto směsí se umístí do ledové tříště na dobu 15 min. Následně se přidají 3 ml roztoku A a baňka se umístí na třepačku na dobu 20 min. při 250 otáček/min. Po skončení třepání se baňka opět umístí do ledové tříště, což napomůže k oddělení vodní a organické fáze. 2 μ l toluenového extraktu se poté nastříknou na kolonu plynového chromatografu k analýze.

7. Odběr a přechovávání vzorků

Vzorky mláta a pivovarských kvasnic se před stanovením uchovávají uzavřené v láhvi v chladničce, pokud doba do stanovení je delší než 2 dny, tak v zamrazeném stavu.

8. Postup stanovení

Příprava vzorku

Mláto

Vzorek mláta se nejprve suší při teplotě 60 °C po dobu 18 h, a poté se umele a homogenizuje. Do Erlenmayerovy baňky se přesně naváží 3 g výše upraveného mláta, přidá se 120 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a baňka se umístí do ultrazvukové lázně na dobu 20 min. Během sonifikace se kontroluje, aby hodnota pH byla stále menší 4, v případě nutnosti se přidá 1 M kyselina chlorovodíková. Po skončení sonifikace se vzorek zfiltruje a získaný filtrát se převede do baňky společně s kyselinou chlorovodíkovou v množství odpovídající desetíně objemu získaného filtrátu. Reakční směs se intenzivně protřepe v ruce po dobu 1 min. V následujícím kroku se přidá trichlorotrimethylsilan v množství odpovídající desetíně zfiltrovaného objemu, krátce protřepe a ponechá na ledové tříšti po dobu 15 min. Derivatizací vzniklý trimethylfluorosilan se extrahuje 3 ml *roztoku A* třepáním při 250 otáček/min po dobu 20 min. Následně se baňka umístí do lázně s ledovou tříští k oddělení vodné a toluenové fáze. V případě, že se vytvoří urputná emulze, k jejímu rozrušení se přidá bezvodý síran sodný v množství na špičce lžičky. Následně se odebere toluenová fáze a 2 µl se nastříknou na chromatografickou kolonu.

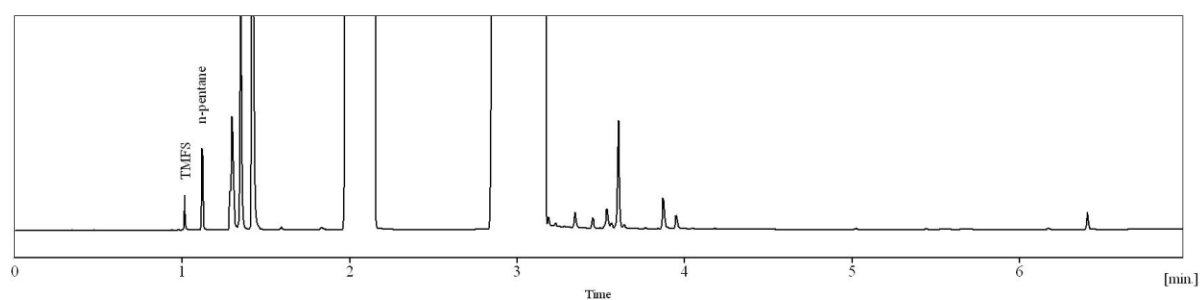
Pivovarské kvasnice

Pivovarské kvasnice se zbaví přebytku vody pomocí Büchnerovy nálevky. Poté se přesně naváží 10 g kvasnic do baňky o objemu 250 ml, přidá se 120 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a vzorek se umístí na dobu 20 min do ultrazvukové lázně. Další postup je shodný jako v případě mláta.

GC podmínky

- teplota injektoru: 200 °C
- teplota detektoru FID: 250 °C
- teplotní program: 42 °C po dobu 2 min, 20 °C/min do 150 °C, 150 °C po dobu 1 min
- split: 1:10
- tlak na hlavu kolony (helium 5.0): 200 kPa při 80 °C.

Obrázek 1. Chromatogram vzorku mláta obohaceného fluoridem



9. Výpočet a vyhodnocení

Jednotlivé látky ve vzorku jsou identifikovány podle retenčních časů. Přibližné retenční časy jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1. Přibližné retenční časy TMFS a n-pentan jako vnitřního standardu

Látka	Přibližný retenční čas (min)
TMFS	0,98
n-pentan	1,10

Výsledek se vypočte podle následujícího vzorce:

$$c = \frac{A_{vz} * A_{ISst} * c_{st} * V_{st}}{A_{st} * A_{ISvz} * m_{vz}}$$

c	koncentrace fluoridů ve zkušebním vzorku (mg/kg);
A_{vz}	plocha TMFS ve zkušebním vzorku;
A_{ISst}	plocha n-pentanu v kalibračním standardu;
c_{st}	koncentrace fluoridů kalibračního standardu (mg/l);
V_{st}	objem pracovního roztoku použitého ke kalibraci (l);
A_{st}	plocha TMFS v kalibračním standardu;
A_{ISvz}	plocha n-pentanu ve zkušebním vzorku;
m_{vz}	hmotnost vzorku použitého k extrakci (kg).

Vzhledem k dohodě, kde $V_{st} = 0,02$ l, se c vypočítá následovně:

$$c_{hmVz} = \frac{A_{vz} * A_{ISst} * c_{st} * 0,02}{A_{st} * A_{ISvz} * m_{vz}}$$

10. Parametry metody

Správnost

Správnost metody byla stanovena pomocí hodnot výtěžnosti. Nejprve byl stanoven obsah fluoru v pěti vzorcích mláta a pivovarských kvasnicích. Potom byly stejné vzorky obohaceny fluoridem sodným na čtyřech koncentračních úrovních (2,27; 41,66; 504 a 1515 mg F⁻/kg) a obsah fluoru byl stanoven opakovaně. Každý pokus byl opakován pětkrát. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2.

Tab 2. Výtěžnost metody stanovení fluoru ve vedlejších pivovarsko-sladařských produktech

Hladina obohacení (mg/kg)	Výtěžnost (%)	RSD ^a (%)
2.27	99	12
41.66	99	11
504	97	8
1515	96	5

^a RSD, relativní směrodatná odchylka

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla stanovena pomocí pětkrát opakovaných analýz jednoho a téhož vzorku mláta a pivovarských kvasnic během jednoho dne. Výsledky jsou uvedeny v tab. 3.

Mez detekce a mez stanovení

Mez detekce byl stanoven jako trojnásobek standardní odchylky získané analýzou 7 totožných vzorků o nízkém obsahu fluoru (0,1 mg/kg). Mez stanovení byl určen jako desetinásobek standardní odchylky získané analýzou 7 totožných vzorků o nízkém obsahu fluoru (0,1 mg/kg). Výsledky uvádí tab. 3.

Linearita

Byla proměřena pětibodová kalibrační křivka v rozsahu koncentrací 0 – 2 000 mg/kg. Hodnota koeficientu lineární regrese je uvedena v tab. 3.

Tabulka 3. Validacionní charakteristiky stanovení fluoru ve vedlejších pivovarsko-sladařských produktech

r^2	Výtěžnost (%)	Opakovatelnost RSD (%)	Mez detekce (mg/kg)	Mez stanovení (mg/kg)
0.9995	>96	13	0.007	0.02

^a r , regresní koeficient kalibrační křivky. ^b RSD, relativní standardní odchylka.

Nejistota metody

Tabulka 4. Rozšířená nejistota (mg/kg)

Rozšířená nejistota (mg/kg)	0,04
-----------------------------	------

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

Ke stanovení obsahu fluoridů se obvykle používá metoda iontově selektivní elektrody. Odečítání elektrodového potenciálu roztoku vzorku musí být v lineární oblasti kalibrační křivky. V opačném případě se doporučuje stanovení koncentrace fluoridů pomocí interpolačních hodnot potenciálu v nelineární oblasti kalibrační křivky.

Výše popsaná metodika stanovení fluoridu využívá oproti tomu dostupnou a více univerzálně použitelnou instrumentaci, a to plynovou chromatografii. Postup se vyznačuje rozsáhlou lineární oblastí kalibrační křivky. Při použití dávkovače vzorků lze navíc vlastní stanovení na plynovém chromatografu zautomatizovat.

Shrnutí: Nově vyvinutá metodika umožňuje stanovení fluoridů ve vedlejších pivovarsko-sladařských produktech a to v koncentracích hluboko pod limitem vyjádřeným legislativním předpisem a je jí možné používat pro rutinní kontrolu.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika bude uplatněna pro stanovení obsahu fluoru v mlátu a pivovarských kvasnicích. Tyto informace využijí pivovary pro možné využití těchto vedlejších produktů ke krmným nebo potravinářským účelům.

V EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY

Ekonomické aspekty nelze jednoznačně vyčíslit. Metodiku využije uživatel výsledku zejména pro výuku, a dále společně s poskytovatelem metodiky pro monitoring obsahu fluoru v krmivech pocházejících z pivovarských surovin v ČR.

VI SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Česká technická norma, ČSN EN 16279: Krmiva – Stanovení obsahu fluoridů po extrakci kyselinou chlorovodíkovou metodou iontově selektivní elektrody (ISE), UNMZ, 2014.
2. Nařízení komise (EU) č. 574/2011 ze dne 16. června 2011. Brusel, 2011.
3. Lipka, R., Sobezak, M., Kuš, S., Oszwaldowski, S., Jarosz, M.: Determination of fluoride impurities in Leuprolide. Comparison of analytical methods. *Microchem. J.* **65**, 2000, 51-58.
4. Yuwono, M., Ebel, S.: Determination of fluoride impurities in calcium ascorbate comparison of gas chromatography and ion selective electrode potentiometry. *Arch. Pharm. Med. Chem.* **330**, 1997, 348-352.

VII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

1. Horák, T., Štěrba, K., Olšovská, J.: The effect of fluorine on animal and human health. *Kvasny Prum.* **61**, 2015, 2-6.
2. Horák, T., Štěrba, K., Olšovská, J.: Quantitative determination of fluorine in spent grain and brewery yeast. *J. Inst. Brew.*, **121**, 2015, 193-196.

DEDIKACE:

Metodika vznikla v rámci řešení projektu TAČR TE02000177, “Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

OPONENTI METODIKY:

Oponentní posudek odborníka v daném oboru zpracoval: prof. Ing. Pavel Dostálek, CSc., Ústav Biotechnologie, VŠCHT, Technická 5, Praha, 166 28.

Oponentní posudek ze státní správy zpracoval: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D., ÚKZÚS, Hroznová 63/2, Brno, 60300.

PODÍL PRÁCE AUTORŮ METODIKY:

Mgr. Tomáš Horák	40 %
Ing. Karel Štěrba, Ph.D.	30 %
RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.	30 %

UŽIVATEL METODIKY:

Uživatelem metodiky je Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Česká republika.

Metodika: Stanovení obsahu fluoru ve vedlejších pivovarsko-sladařských produktech

Autoři: Tomáš Horák, Karel Štěrba, Jana Olšovská

Vydal Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., jako svou 85. publikaci

Redakce: Kvasný průmysl, Lípová 15, 120 44 Praha 2

Tel. 224 915 530, fax 224 920 618

e-mail kvas@beerresearch.cz

www.beerresearch.cz, www.kvasnyprumysl.cz

Odpovědný redaktor: František Frantík

Tisk: Studio SV, s.r.o., Praha

Náklad: 50 výtisků

ISBN 978-80-86576-70-1

© Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2016