

I. Vliv pesticidů a dusíkatých hnojiv aplikovaných ve vegetačním období na obsah těkavých N-nitrosaminů v ječmeni a sladu

Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., Ing. BOHUMIL ŠPINAR, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Ing. JOSEF PROKEŠ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský Praha, pracoviště Brno

Prof. Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, DrSc., Vysoká škola chemickotechnologická, Praha, Katedra kvasné chemie a bioinženýrství

Klíčová slova: N-nitrosaminy, NDMA, slad, pesticidy, dusíkatá hnojiva, oxidy dusíku

ÚVOD

Hlavní podíl karcinogenních N-nitrosaminů vzniká ve sladu během technologického procesu výroby, působením vhodného nitrosacího činidla za příznivých reakčních podmínek na přirozené aminy ječmene [1].

Obecnými otázkami možnosti vzniku těkavých N-nitrosaminů a jejich hlavního představitele N-nitrosodimethylaminu (NDMA) ve sladu se zabývá publikace *Kellner et al.* [2].

N-nitrosaminy mohou být obsaženy i v zeleném sladu a v některých případech i ve sladovnickém ječmeni. V ječmeni se však vyskytují pouze v nepatrných množstvích pohybujících se na mezi detekce ($0,1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Jejich přítomnost lze vysvětlit jako důsledek aplikace dusíkatých hnojiv nebo pesticidů [3], v nichž mohou být nitrosaminy obsaženy, nebo jejichž kombinací mohou následně vznikat.

I když se zvýšeným úsilím pracovníků podařilo v celosvětovém měřítku snížit obsahy NDMA ve sladu, je možno konstatovat, že některé otázky spojené s mechanismem vzniku NDMA nebyly dosud uspokojivě vyřešeny. Nedostatečné znalosti, mnohdy empirické povahy, často způsobují, že návrhy technologických zásahů vedoucích ke snížení obsahu NDMA v jedné sladovně, na jiné sladovně selhávají.

Je tedy zřejmé, že bez detailních poznatků týkajících se všech otázek vzniku NDMA a ostatních těkavých N-nitrosaminů, není možno racionálně využít prostředky, které jsou v současné době k dispozici.

Z těchto důvodů jsme se zabývali některými aspekty dané problematiky, a to studiem vlivu aplikace pesticidů, dusíkatých hnojiv a jejich kombinací při pěstování sladovnického ječmene na vznik těkavých N-nitrosaminů.

Cohen et al. [3] uvádějí, že existují tři cesty, kterými dochází ke kontaminaci průmyslově vyráběných pesticidů N-nitrosaminy:

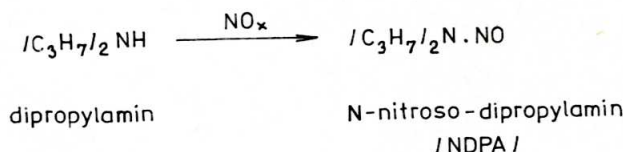
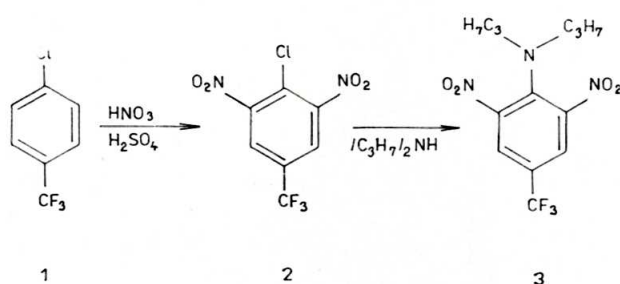
- a) tvorba N-nitrosaminů vlivem nevhodné technologie zvolené při syntéze pesticidu (nitrosace, aminace), např. u herbicidů dinitroanilinového typu;
- b) nitrosace „in situ“, tj. vznikem N-nitrosaminů z pesticidu reakcí buď zbytků aminů (sekundárních a terciárních) nebo některé aminosoli pesticidu s nitrosacím činidlem;
- c) použitím kontaminovaných chemikálií při výrobě pesticidů.

Naše pozornost byla proto věnována zejména těm pesticidům, u nichž existoval oprávněný předpoklad, že buď jsou již N-nitrosaminy kontaminovány, nebo je mohou reakcí s příslušným nitrosacím činidlem poskytovat [4]. Typickým představitelem pesticidu, při jehož syntéze může vznikat N-nitrosodipropylamin (NDPA), je Trifluralin. Postup syntézy Trifluralinu s možným mechanismem vzniku příslušného N-nitrosaminu uvádí reakční schéma na *obr. 1*.

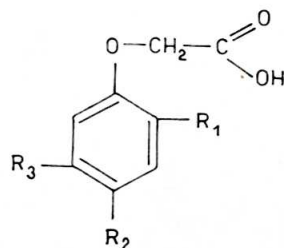
Námi získané výsledky rozboru Trifluralinu potvrdily platnost předpokládaného reakčního mechanismu, neboť např. ve vzorcích obchodního preparátu Trifluralinu z NSR bylo stanoveno $2,1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NDMA, $180 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NDPA, $110 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NDBA [N-nitrosodibutylamin] a stopy NDEA [N-nitrosodiethylamin].

Značnou pozornost dále zasluhuje skupina pesticidů na bázi substituované fenoxycetové kyseliny. Jedná se o následující typy lišící se druhem substituentů R_1 , R_2 a R_3 (*obr. 2*).

Pro zvýšení rozpustnosti jsou tyto herbicidy vyráběny ve formě aminosoli (*obr. 3*).

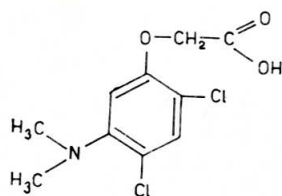


1/ = 4-chlor-trifluormethylbenzen
2/ = 2-chlor-1,3-dinitro-5-trifluormethylbenzen
3/ = 2-(N,N'-dipropylamino)-1,3-dinitro-5-trifluormethylbenzen
Obr. 1



$R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{Cl}$ $R_3 = \text{H}$ 2-methyl-4-chlorofenoxyoctová kyselina (MCPA)
 $R_1 R_2 = \text{Cl}$ $R_3 = \text{H}$ 2,4-dichlor-fenoxyoctová kyselina (2,4 DCPA)
 $R_1, R_2, R_3 = \text{Cl}$ 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina (2,4,5 TCPA)

Obr. 2



5-dimethylamino-2,4-dichlor-fenoxyoctová kyselina (DMA-2,4-DCPA)

Obr. 3

V preparátu Aminex-Pur, obsahujícím jako účinnou látku 5-dimethylamino-2-methyl-4-chlor-fenoxyoctovou kyselinu, jsme např. stanovili až $660 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NDMA. Zvýšená koncentrace NDMA v tomto preparátu je tedy převážně způsobena kontaminací NDMA obsaženého v syntetickém dimethylaminu. U těchto látek tudíž existuje nejen předpoklad zvýšeného obsahu NDMA přímo v herbicidu jako výsledek jejich kontaminace nečistým technickým dimethylaminem použitým při výrobě, ale i možnost následné nitrosace herbicidu v půdě nebo při výrobě sladu např. působením oxidů dusíku při hvozďení. Zvýšený obsah NDMA ve sladu by však vyžadoval v tomto případě buď přímou translokaci pesticidu do zrna a jeho následnou nitrosaci během klíčení a hvozďení nebo translokaci NDMA bez potřeby následné nitrosace.

Současným předmětem výzkumu zemědělských odborníků jsou možnosti aplikace směsných postřiků tvořených tekutými hnojivy a roztokem herbicidů či jiných pesticidů.

Vzhledem k předpokládanému vzniku N-nitrosaminů vzájemnou reakcí některých složek hnojiva s přítomným

herbicidem byly provedeny ve spolupráci s ÚKZÚZ Brno pokusy, zabývající se vlivem těchto směsných postřiků na obsah NDMA a ostatních těkavých N-nitrosaminů v ječmeni a sladu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Agrochemické pokusy

Čtvrtprovozní pokusy probíhaly na zkušebních pozemcích ÚKZÚZ Brno v brněnské oblasti.

Kombinované přípravky byly aplikovány na porosty jarních ječmenů v době, kdy ještě nebyly plně vyvinuty klasy.

Směsný postřik se skládal z pesticidu na bázi amino-soli MCPA a tekutého hnojiva DAM 390. Hnojivo DAM 390 je kapalné hnojivo na bázi vodného roztoku dusičnanu amonného s průměrným obsahem 30 % hm. dusíku, a to asi 25 % ve formě dusičnanů, 25 % ve formě amonných solí a 50 % jako amidů.

Při sledování vlivu kombinovaného preparátu na vznik N-nitrosaminů v ječmeni a sladu byly odzkoušeny tyto varianty ošetření ječmene:

1. Aminex ($3,5 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$) a DAM 390 ($77 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$)
2. Aminex ($3,5 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$)
3. Kontrola—nešetřeno
4. Dikotex P ($1,5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) a DAM 390 ($77 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$)
5. Dikotex P ($1,5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)
6. DAM 390 ($77 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$)
7. Kontrola—nešetřeno

Část sklizených ječmenů s aplikací i bez aplikace uvedených přípravků byla sladována a hvozďena v mikroskladovně Seeger, zbývající část byla hvozďena v provozní sladovně s přímým ohřevem zemním plynem.

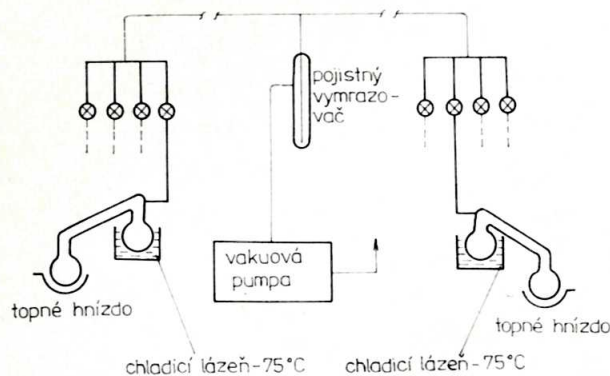
Mikroskladovna Seeger

Kapacita mikroskladovny činí $8 \times 8 \text{ kg}$ vzorků (rok výroby 1975). Dílčí technologické úseky jsou umístěny v jednotlivých skříních, s možností automatizovaného nebo ručního provozu. Konstruktivní řešení umožňuje nezávislou volbu teploty máčecí vody, teploty klíčení a možnost odsávání oxidu uhličitého. Hvozď je jednolískový s elektrickým ohřevem.

Režim hvozďení: sušení 12 hodin při teplotě 40 až 60°C dotahování 4 hodiny při 80°C .

Analytický postup stanovení těkavých N-nitrosaminů

Obsah NDMA a dalších těkavých N-nitrosaminů byl stanoven pomocí spojení plynového chromatografu Hewlett-Packard 5880 A a chemiluminiscenčního detektoru TEA [5], metodou vypracovanou Spiegelhalderem et. al. [6, 7]. Tato metoda je založena na několikastupňové izolaci těkavých N-nitrosaminů z přírodní matrice. V první fázi jsou těkavé N-nitrosaminy včetně přidaného vnitřního standardu oddestilovány metodou vakuové destilace s vodní párou z prostředí minerálního oleje a zachy-



Obr. 4

ceny ve vymrazovači (obr. 4). Destilát je zalkalizován a extrahován 4 X 5 ml dichlormethanu (DCM). Spojené extrakty jsou po přidavku 2 ml n-hexanu zahuštěny na vodní lázni při teplotě 55 °C na objem 5 ml. Finální za-koncentrování na 1 ml je prováděno výhradně odfoukáním mírným proudem dusíku. Koncentrát je poté přenesen do ampulek, které jsou ihned hermeticky uzavřeny. Vlastní analýza probíhá na přístrojovém spojení GC-TEA.

Podmínky na plynovém chromatografu

kolona: ocelová (nerez), délka 3 m, vnitřní průměr 2,1 mm
náplň: 13% Carbowax 20M-TPA na Chromosorbu WAW, zrnitost 0,15 až 0,18 mm (80/100 mesh)
teplota nástřiku: 200 °C
teplota pece: 185 °C
teplota pomocného výstupu do TEA: 195 °C
nosný plyn argon (helium), 30 ml.min⁻¹

Podmínky na TEA

teplota pyrolyzní pece: 475 °C
teplota vymrazovače —158 °C (2-methylbutan ochla-zený tekutým dusíkem)
průtok kyslíku 20 ml.min⁻¹
citlivost 20 až 40 pg NDMA (signál : šum 5:1) pro ná-střík 3 až 5 µl

VÝSLEDKY A DISKUSE

Sklizené ječmeny s aplikací i bez aplikace herbicidu, dusíkatého hnojiva nebo směsného preparátu obsahova-ly nejvýše 0,3 µg.kg⁻¹ NDMA. Sladováním a sušením ve skříňové mikroskladovně Seeger v atmosféře s nízkým obsahem oxidů dusíku (NO_x) byl zjištěn pouze nepatrný nárůst obsahu NDMA (tab. 1 a 2).

Tabulka 1. Vliv aplikace pesticidu Aminex a dusíkatého hnojiva DAM 390 na obsah NDMA v ječmeni a sladu

| vzorek | koncentrace NDMA / µg.kg ⁻¹ / | | | |
|-------------|--|-----|-----|-----|
| | A | B | C | D |
| ječmen | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| zelený slad | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,4 |
| hotový slad | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,7 |

A — Aminex a DAM 390, B — Aminex, C — DAM 390, D — bez ošetření
Obsah NO_x v hvozdicím vzduchu nepřekročil 0,08 mg.m⁻³ (vztaženo na NO₂)

Tabulka 2. Vliv aplikace pesticidu Dikotex P a dusíkatého hnojiva DAM 390 na obsah NDMA v ječmeni a sladu

| vzorek | koncentrace NDMA / µg.kg ⁻¹ / | | | |
|-------------|--|-----|-----|-----|
| | A | B | C | D |
| ječmen | 0,2 | 0,3 | 0,2 | ND |
| zelený slad | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,3 |
| hotový slad | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,8 |

A — Dikotex P a DAM 390, B — Dikotex P, C — DAM 390, D — bez ošetření, ND — nedetekováno (pod hranici detekce)
Obsah NO_x v hvozdicím vzduchu nepřekročil 0,08 mg.m⁻³ (vztaženo na NO₂)

Určitý podíl zeleného sladu vyrobeného v mikroskla-dovně byl převezen na provozní jednolískový hvoz-d s přímým ohřevem a zde hvozděn v atmosféře obsahu-jící zvýšenou koncentraci NO_x (tab. 3 a 4).

Slady vyrobené z chemicky ošetřených i neošetřených ječmenů vykazovaly po hvozdění v atmosféře bohaté na

Tabulka 3. Vliv aplikace pesticidu Aminex a dusíkatého hnojiva DAM 390 na obsah NDMA v ječmeni a sladu při hvozdění v atmosféře bohaté NO_x

| vzorek | koncentrace NDMA / µg.kg ⁻¹ / | | | |
|--------------|--|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D |
| ječmen | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| zelený slad | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,4 |
| hotový slad | 5,9 | 5,2 | 6,3 | 6,6 |
| sladový květ | 123,6 | 114,0 | 216,8 | 194,9 |

A — Aminex a DAM 390, B — Aminex, C — DAM 390, D — bez ošetření
Obsah NO_x v hvozdicím vzduchu kolísal v rozmezí 0,8 až 1,2 mg.m⁻³ (vztaženo na NO₂)

Tabulka 4. Vliv aplikace pesticidu Dikotex P a dusíkatého hnojiva DAM 390 na obsah NDMA v ječmeni a sladu při hvozdění v atmosféře bohaté NO_x

| vzorek | koncentrace NDMA / µg.kg ⁻¹ / | | | |
|--------------|--|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D |
| ječmen | 0,2 | 0,3 | 0,2 | ND |
| zelený slad | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,3 |
| hotový slad | 7,1 | 7,1 | 6,3 | 6,7 |
| sladový květ | 233,2 | 194,5 | 216,8 | 209,2 |

A — Dikotex P a DAM 390, B — Dikotex P, C — DAM 390, D — bez ošetření
Obsah NO_x v hvozdicím vzduchu kolísal v rozmezí 0,8 až 1,2 mg.m⁻³ (vztaženo na NO₂)

NO_x podstatně vyšší obsahy NDMA, nebyl však zjištěn statisticky významný rozdíl mezi chemicky ošetřenými a neošetřenými vzorky (tab. 3 a 4). Nárůst obsahu NDMA lze v tomto případě vysvětlit účinky NO_x na přirozené prekurzory NDMA ve sladu.

ZÁVĚR

Na základě získaných výsledků za uvedených podmí-nek prováděných pokusů lze vyloučit zásadní podíl apli-kovaných směsných přípravků při pěstování sladovnic-kého ječmene na zvýšení obsahu těkavých N-nitrosami-nů ve sladu. Nebyly potvrzeny předpoklady o možné translokaci pesticidu do zrna a jeho následné nitrosaci během klíčení a hvozdění. Obdobně nebyla pozorována přímá translokace NDMA do zrna.

PODEKOVÁNÍ

Autoři děkují za nezištnou pomoc RNDr. J. Lunerovi a dalším pracovníkům ÚKZÚZ Brno, kterou poskytli při zajištění agrochemických pokusů.

LITERATURA

- [1] CHAPPEL, C.: Current Research on Nitrosamines in Beer, To-xicology Forum Arlington, Virginia, USA, 1980
- [2] KELLNER, V., ČULÍK, J., BASAŘOVÁ, G.: Kvas. prům. **29**, 1983, s. 28
- [3] COHEN, S., ZWEIG, G., LAW, M., WRIGHT, D., BONTROYAN, W. R.: IARC Sci. Publ. No. 19, 1978, s. 333
- [4] KELLNER, V., ŠPINAR, B., ČULÍK, J., FRANTIČ, F.: Kvas. prům. **30**, 1984, s. 145
- [5] KELLNER, V., ČULÍK, J., BASAŘOVÁ, G.: Kvas. prům. **28**, 1982, s. 99
- [6] SPIEGELHALDER, B.: IARC Sci. Publ. No. 45, 1983, s. 103
- [7] SPIEGELHALDER, B., EISENBRAND, G., PREUSSMANN, R.: IARC Sci. Publ. No. 45, 1983, s. 115

Lektoroval doc. Ing. Jaroslav Čepička, CSc.

Čulík, J. - Kellner, V. - Špinar, B. - Prokeš, J. - Basařová, G.: Těkavé N-nitrosaminy ve sladu. I. Vliv pesticidů a dusíkatých hnojiv aplikovaných ve vegetačním období

na obsah těkavých N-nitrosaminů v ječmeni a sladu. Kvas. prům., 35, 1989, č. 10, s. 289—292.

Ve čtvrtprovozních a provozních podmínkách byl sledován vliv směsných postřiků tvořených hnojivem DAM 390 a roztokem herbicidu na bázi fenoxycetové kyseliny na obsah N-nitrosaminů v ječmeni a sladu. Obsah těkavých N-nitrosaminů byl stanoven ve vzorcích sladu hvozdeného v atmosféře s nízkým a vysokým obsahem NO_x .

Na základě získaných výsledků lze vyloučit zásadní podíl aplikovaných chemických přípravků při pěstování sladovnického ječmene na zvýšení obsahu těkavých N-nitrosaminů ve sladu.

Чулик, И. - Келлер, В. - Шпинар, Б. - Прокеш, И. - Басаржова, Г.: Летучие N-нитрозамины в солоде. I. Влияние применения пестицидов и азотосодержащих удобрений в период вегетации на содержание летучих N-нитрозаминов в ячмене и солоде. Квас. прум., 35, 1989, № 10, стр. 289—292

В стендовом производстве и в производстве исследовалось влияние смесных поливов, образуемых удобрением DAM 390 и раствором гербицида на базе феноксиуксусной кислоты, на содержание N-нитрозаминов в ячмени и солоде. Содержание N-нитрозаминов было определено в образцах солода, высушиваемых в атмосфере с низким и высоким содержанием NO_x .

На основе полученных результатов можно исключить основное участие приложенных химических препаратов при выращивании пивоваренного ячменя в повышении содержания N-нитрозаминов в солоде.

Čulík, J. - Kellner, V. - Špinar, B. - Prokeš, J. - Basařová, G.: Volatile N-Nitrosamines in Malt. I. Effect of Ap-

plication of Pesticides and Nitrogen Fertilizers in Vegetative Season on Content of Volatile N-Nitrosamines in Barley and Malt. Kvas. prům., 35, 1989, No. 10, pp. 289—292.

The effect of mixed sprays formed by the fertilizer DAM 390 and the herbicide solution of phenoxyacetic acid on the content of N-nitrosamines in barley and malt was studied on a pilot- and an industrial scale. The level of volatile N-nitrosamines was determined in malt samples being dried in an atmosphere with low and high contents of NO_x . The results showed that the addition of chemical compounds applied during growth of malting barley have no principle effect on the level of volatile N-nitrosamines in malt.

Čulík, J. - Kellner, V. - Špinar, B. - Prokeš, J. - Basařová, G.: Flüchtige N-Nitrosamine im Malz. I. Einfluß der Applikation der Pestizide und Stickstoffdüngemittel in der Vegetationszeit auf den Gehalt der flüchtigen N-Nitrosamine in Gerste und Malz. Kvas. prům. 35, 1989, Nr. 10, S. 289—292.

In Klein- und Großbetriebsbedingungen wurde der Einfluß der Mischspritzmittel, kombiniert aus Düngemittel DAM 390 und Lösung eines Herbizids auf Basis der Fenoxiessigsäure, auf den Gehalt der N-Nitrosamine in Gerste und Malz verfolgt. Der Gehalt an flüchtigen N-Nitrosaminen wurde in Proben von Malz bestimmt, das in Atmosphäre mit niedrigem und hohem NO_x -Gehalt gedarrt wurde.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse kann ein grundsätzlicher Anteil der beim Braugerstenanbau applizierten chemischen Präparate an der Erhöhung des Gehalts der flüchtigen N-Nitrosamine im Malz eliminiert werden.