

Obsah dusičnanů ve varních vodách a v pivech východočeských pivovarů

663.41

Doc. Ing. JAROSLAV ČEPIČKA, CSc., Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Ing. PETR BAUDYŠ, Česká zemědělská a potravinářská inspekce Pardubice, Ing. ELLY VÍZNEROVÁ, Pivovary Hradec Králové, s. p., Ing. JANA KRAUSOVÁ, Česká zemědělská a potravinářská inspekce, Praha

Klíčová slova: *dusičnany, pivo, varní voda, iontová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

1. ÚVOD

Nebezpečí zvýšeného obsahu dusičnanů v potravinách lze posuzovat z různých hledisek. Necitlivá chemizace zemědělství v minulé době se projevila ve zhoršené kvalitě řady zemědělských produktů a následně i v kvalitě pitné vody. Vysoký obsah dusičnanů je za určitých okolností zdravotně povážlivý [1]. Potenciální toxicita dusičnanů spočívá v jejich možné redukci na dusitany, které mohou být příčinou závažných zdravotních poruch. V pivovarství jsou jejich negativní účinky znásobeny ještě nebezpečím

následné tvorby N-nitrososloučenin, které vykazují silné karcinogenní účinky a působí toxicky na játra [2].

Problematika obsahu dusičnanů v pivovarství se týká nejen surovin a hotového piva, ale i metodik jejich reprodukovatelného stanovení. V odborné literatuře je obsahu dusičnanů v pivovarských surovinách i výrobcích věnována řada prací [3, 4, 5, 6, 7].

V současné době neexistují právně závazné předpisy pro maximální povolený obsah dusičnanů v pivu, všeobecně se však respektují limity povolené pro pitnou vodu, které u nás činí 50 mg/l [8]. Vzhledem k vysoké spotřebě piva

v Československu a s ohledem na doporučení světové zdravotnické organizace FAO (doporučená maximální denní spotřeba dusičnanů odpovídající 5 mg dusičnanu sodného na 1 kg tělesné hmotnosti) je nezbytné sledovat a případně snižovat jejich obsah ve vyráběných pivech.

Pro tyto účely je nezbytná rychlá a reprodukovatelná analytická metoda. Z analytického hlediska patří stanovení dusičnanů v rostlinných materiálech k metodám, které pro složitost matrice vyžadují buď složitější pracovní postupy nebo náročnou analytickou instrumentaci. Pro stanovení dusičnanů v pivovarských materiálech byla vyzkoušena řada metod [6, 9, 10, 11], prakticky se však nejvíce uplatňuje fotometrická metoda [12] a v poslední době i chromatografická metoda [13].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

U vybraných pivovarských materiálů (varní vody a hotová piva) byl sledován obsah dusičnanů iontovou chromatografickou metodou v provedení HPLC v laboratoři České zemědělské a potravinářské inspekce v Pardubicích. Část vzorků byla dále analyzována v podnikové laboratoři s. p. Pivovary Hradec Králové klasickou fotometrickou metodou podle Postela a v laboratoři Ústředního inspektariátu ČZPI Praha fotometrickou metodou v technice průtokové injekční analýzy FIA.

Zpracované vzorky

V oblasti východočeského kraje bylo z 12 pivovarů analyzováno 40 vzorků varních vod a 94 vzorků lahvového piva. Chromatografickou metodou v technice HPLC byly analyzovány všechny vzorky, ostatními uvedenými jen část vzorků.

Stanovení dusičnanů fotometricky

Principem fotometrického stanovení dusičnanů podle Postela je redukce přítomných dusičnanů na dusitany zinkem a octanem kadmatným přímo v analyzovaném vzorku, který se předem vyčistí roztokem ferrokyanidu draselného. Dusitany se poté kvantitativně stanoví fotometricky po diazotaci kyselinou sulfanilovou a kopulací s α -naftylaminem. Vzniklé červené zbarvení se měří při vlnové délce 530 nm [12]. Měření byla prováděna na spektrálním fotometru SPEKOL 211 (Carl Zeiss, Jena) [6].

Stanovení dusičnanů technikou FIA

Stanovení dusičnanů po redukci na dusitany reakcí s kyselinou sulfanilovou a α -naftylaminem technikou průtokové injekční analýzy (FIA) je v principu stejné s Postelovou fotometrickou metodou. Analyzovaný vzorek se nastříkuje do proudu nosného roztoku, dusičnany se redukují na dusitany v kadmiovém reduktoru a po smíšení s proudy roztoků reagentů se automaticky měří zabarvení roztoku. Měření byla prováděna na přístrojích firmy Tecator FIA STAR 5007 SAMPLER, 5020 ANALYZER a 5022 DETECTOR CONTROLLER [6, 14].

Stanovení dusičnanů technikou HPLC

Iontová chromatografie využívající techniky HPLC s dělicí fází, která obsahuje anex s nízkou kapacitou, je progresivní metoda přímého stanovení dusičnanového iontu.

K selektivní a citlivé detekci je zde uplatněna absorpce dusičnanového iontu v blízké UV oblasti (205–214 nm). Principem metody je vratná výměna iontů mezi roztokem a tuhrou fází, kterou je prostorový ionexový polymer nebo krystalová mřížka s ionizovatelnými funkčními skupinami, jejichž náboje se kompenzují ionty opačného náboje (protionty). Účinnost separace při iontové chromatografii závisí na ionexu, pH, typu a iontové síle tlumivého roztoku [15].

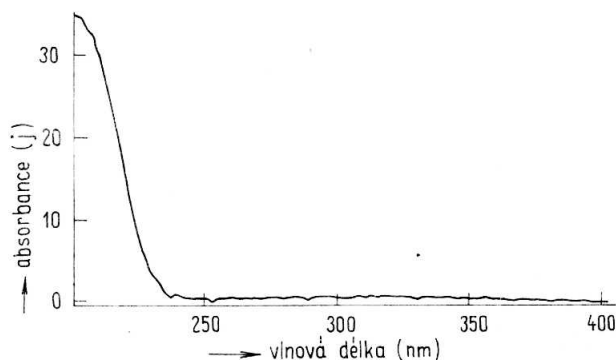
Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu Spectra-Physics se skleněnou separační kolonou (3×150 mm) s náplní Separon-HEMA BIO 1000 Q a mobilní fází (0,015 mol/l NaClO_4 o pH 2,5) s průtokem 0,5 ml/min, při citlivosti přístroje 2,0, tlaku 2 MPa, a UV detekci při 210 nm. Analyzovaný vzorek se po 10minutovém až 15minutovém odplynění zfiltraval přes membránový filtr a dával se v množství 5 μl přímo do chromatografu.

Použité chemikálie a pomůcky: dusičnan sodný, NaNO_3 p. a. (Merck), chloristan sodný, NaClO_4 p. a. (Lachema), kyselina fosforečná, H_3PO_4 85 % p. a. (Lachema) a membránové filtry Synpor č. 5 (velikost pórů 0,60 μm).

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Optimalizace chromatografických podmínek

Optimalizace chromatografických podmínek byla provedena nejprve s modelovým roztokem dusičnanu sodného ve vodě [$\text{c}(\text{NaNO}_3) = 50 \text{ mg/l}$] a poté s pivem. Byla provedena postupná změna pH (2,2 až 4,0) a koncentrace mobilní fáze [$\text{c}(\text{NaClO}_4) = 0,01$ až 0,3 mol/l] s cílem dosáhnout uspokojivé separace a optimální kapacitní poměr. Pro detekci dusičnanového iontu byla zvolena vlnová délka 210 nm (obrázek 1).



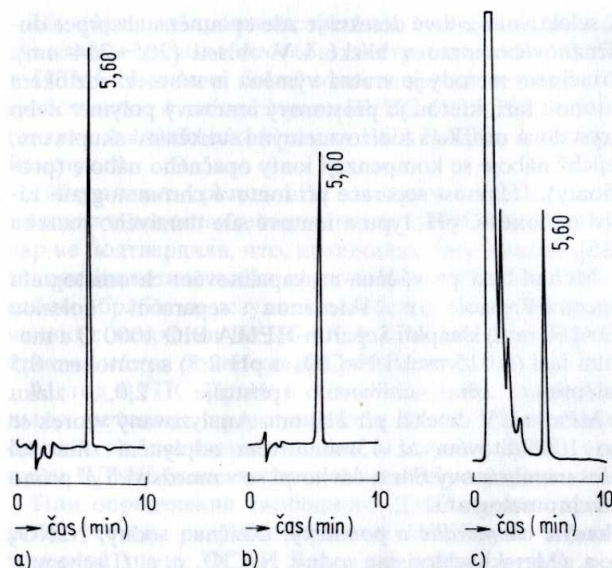
Obr. 1. UV spektrum dusičnanového iontu

Optimální podmínky separace byly nalezeny při mobilní fázi o koncentraci 0,015 mol/l a pH = 2,5. Ukázkové chromatogramy standardního roztoku dusičnanu sodného ve vodě, varní vody a piva jsou znázorněny na obrázku 2.

Vzorek varní vody a odplyněného piva (10 až 15 min třepání) se po membránové filtraci dával do chromatografu.

Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno z ploch píků metodou externího standardu. Hodnoty obsahu dusičnanů jsou uvedeny jako obsah dusičnanu sodného v mg/l.

Pro ověření přesnosti stanovení dusičnanů metodou HPLC bylo provedeno deset analýz u dvou vzorků varní



Obr. 2. Chromatogram standardního roztoku dusičnanu sodného (a), varní vody (b) a vzorku piva (c)

vody a dvou vzorků piva. Výsledky jsou shrnuty do tabulek 1 a 2.

Tab. 1. Statistické zhodnocení přesnosti výsledků stanovení dusičnanů technikou HPLC ve vzorcích pivovarských varních vod

Číslo měření	Varní voda 1	Varní voda 2
	Obsah dusičnanů (mg/l)	
1.	31,1	7,6
2.	30,4	7,4
3.	30,2	7,4
4.	31,1	7,5
5.	30,8	7,9
6.	31,3	7,3
7.	31,2	7,8
8.	30,4	7,3
9.	30,3	7,8
10.	30,0	7,8
Aritmetický průměr	30,68	7,58
Relativní směrodatná (%) odchylka	1,53	3,03
Interval spolehlivosti	30,68 ± 0,3	7,58 ± 0,1
Opakovatelnost	1,31	0,64

Tabulka 2. Statistické zhodnocení přesnosti výsledků stanovení dusičnanů metodou HPLC ve vzorcích lahvových piv

Číslo měření	PIVO 1	PIVO 2
	Obsah dusičnanů (mg/l)	
1.	5,8	58,3
2.	6,6	56,9
3.	6,0	56,8
4.	8,0	58,9
5.	7,8	56,4
6.	5,6	56,4
7.	6,3	59,1
8.	7,0	56,0
9.	7,7	56,1
10.	6,2	59,8
Aritmetický průměr	6,7	57,48
Relativní směrodatná (%) odchylka	13,00	2,44
Interval spolehlivosti	6,7 ± 0,63	57,48 ± 1,0
Opakovatelnost	2,4	3,9

Vypočtené hodnoty statistických veličin, zejména směrodatné odchylky, intervalu spolehlivosti a opakovatelnosti ukazují na vysokou reprodukovatelnost stanovení dusičnanů technikou HPLC ve varních vodách a velmi dobrou reprodukovatelnost v hotových pivech [16, 17].

Správnost naměřených hodnot obsahu dusičnanů ve varních vodách byla ověřena srovnáním s hodnotami zjištěnými fotometrickou metodou podle Postela. Vypočtený korelační koeficient 0,9992 ukazuje na velmi dobrou shodu mezi oběma porovnávanými metodami. Pro vzorky analyzovaných piv bylo srovnání výsledků rozšířeno ještě

Tabulka 3. Porovnání výsledků stanovení dusičnanů ve varních vodách metodou HPLC s výsledky dosaženými fotometrickou metodou podle Postela

Číslo vzorku	METODA	
	HPLC (X)	Fotometr. (Y)
	Obsah dusičnanů (mg/l)	
1.	2,3	2,1
2.	14,4	15,0
3.	14,4	15,0
4.	5,3	5,1
5.	24,6	24,6
6.	54,9	54,9
7.	47,8	47,7
8.	7,7	6,5
9.	2,4	3,0
10.	5,0	5,3
11.	12,1	13,1
12.	13,0	13,2
13.	30,8	29,7
14.	8,3	8,1
15.	16,0	16,5

Tabulka 4. Porovnání výsledků stanovení dusičnanů v pivu metodou HPLC s výsledky dosaženými fotometrickou metodou podle Postela

Číslo vzorku	METODA	
	HPLC (X)	Fotometr. (Y)
	Obsah dusičnanů (mg/l)	
1.	7,4	7,6
2.	2,3	2,9
3.	11,7	15,3
4.	13,4	13,9
5.	23,3	25,9
6.	5,8	4,4
7.	22,9	23,5
8.	14,3	17,2
9.	25,2	30,2
10.	16,5	18,8
11.	18,8	20,3
12.	39,9	36,8
13.	42,3	44,1
14.	33,1	29,4
15.	39,4	39,2
16.	68,7	67,6
17.	69,1	72,5
18.	60,9	70,0
19.	32,7	35,1
20.	33,4	34,9
21.	7,5	9,0
22.	5,2	6,3
23.	11,0	12,0
24.	11,6	12,0
25.	6,4	7,1
26.	31,2	26,7
27.	39,8	42,4
28.	42,3	39,1
29.	21,7	20,7
30.	2,8	5,1
31.	26,4	23,4
32.	32,7	28,9
33.	37,2	28,3
34.	6,4	7,4
35.	11,5	12,4
36.	16,7	15,8
37.	11,7	11,5
38.	26,0	30,8
39.	40,5	41,9
40.	55,9	72,4
41.	37,5	43,5
42.	53,7	59,4

na metodu FIA. I v tomto případě ukazují lineární regresí vypočtené korelační koeficienty (HPLC – Postelova metoda 0,9794 a HPLC – FIA 0,9898) na velmi dobrou shodu výsledků všech tří porovnávaných metod. Výsledky jsou shrnuty v *tabulkách 3 až 6*.

Tabulka 5. Porovnání výsledků stanovení dusičnanů v pivu metodou HPLC s výsledky dosaženými metodou FIA

Číslo vzorku	METODA	
	HPLC (X)	FIA (Y)
	Obsah dusičnanů (mg/l)	
1.	4,7	6,0
2.	8,5	10,2
3.	12,3	12,1
4.	8,6	10,1
5.	13,7	12,0
6.	20,9	20,2
7.	15,3	15,6
8.	19,1	17,6
9.	29,7	31,4
10.	41,0	36,0
11.	20,8	20,2
12.	27,5	25,4
13.	39,4	35,4
14.	4,7	4,0
15.	10,4	11,0
16.	15,8	13,2

Tabulka 6. Přehled statistických veličin získaných porovnáním výsledků obsahu dusičnanů ve varních vodách a v pivech metodou HPLC (X) a srovnávacími metodami (Y)

	Fotometrická metoda podle Postela	Fotometrická metoda technikou FIA
A – varní vody		
Korelační koeficient	0,9992	–
Rovnice regresní přímky	$Y = 0,08 + 1,00 X$	–
Studentův test pro $\alpha = 0,05$ tj. 95 % IS	$t = 3,84$ $t_{krit} = 2,06$ $t > t_{krit}$	– – –
B – lahvové piva		
Korelační koeficient	0,9794	0,9898
Rovnice regresní přímky	$Y = 0,16 + 1,05 X$	$Y = 1,30 + 0,88 X$
Studentův test pro $\alpha = 0,05$ tj. 95 % IS	$t = 0,3$ $t_{krit} = 1,99$ $t < t_{krit}$	$t = 0,2$ $t_{krit} = 2,04$ $t < t_{krit}$

IS = interval spolehlivosti

Velkou předností stanovení dusičnanů v pivovarských varních vodách a v pivech iontovou chromatografií technikou HPLC je velmi snadná a jednoduchá příprava vzorku zahrnující pouze membránovou filtraci a dále skutečnost, že se jedná o přímé stanovení na rozdíl od obou srovnávacích metod. To umožňuje nejen analyzování většího množství vzorků v krátkém časovém úseku při vysoké selektivitě a citlivosti, ale vytváří předpoklady i pro větší přesnost a reprodukovatelnost stanovení.

Obsah dusičnanů ve varních vodách a pivech východočeských pivovarů

Výsledky analytického sledování dusičnanů ve varních

vodách a lahvočných pivech různé koncentrace ve s. p. Pivovary Hradec Králové shrnuje *tabulka 7*, kde jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahu dusičnanů získané změřením 2 až 4 vzorků odebraných v jednotlivých pivovarech v období od července do září 1990.

Osm pivovarů východočeského kraje používá varní vodu s obsahem dusičnanů pod 25 mg/l (tj. 61 % pivovarů východočeského kraje). Tři pivovary používají vodu s obsahem dusičnanů v rozmezí od 25 do 42 mg/l (tj. 25 % pivovarů). Jediný pivovar používá varní vodu, která neodpovídá ČSN pro pitnou vodu v obsahu dusičnanů (tj. 8,3 % pivovarů východočeského kraje).

Tabulka 7. Analytický monitoring obsahu dusičnanů ve varních vodách a lahvočných pivech s. p. Pivovary Hradec Králové

Pivovar	Varní voda	Obsah dusičnanů (mg/l)		
		Druh světlého lahvového piva		
		10%	11%	12%
A	2,5	–	7,4	16,7
B	13,7	–	9,1	13,4
C	3,3	5,8	–	22,9
D	12,9	20,8	18,8	–
E	30,1	–	42,2	39,4
F	56,0	–	67,6	70,1
G	42,0	–	37,5	53,7
H	16,6	–	32,7	33,4
I	31,9	6,3	11,0	6,5
J	24,6	–	31,2	41,0
K	7,7	21,6	26,5	34,9
L	8,3	–	–	40,6
Pivovar	Druh piva	Obsah dusičnanů (mg/l)		
A	DIA pivo	6,4		
B	PITO	23,3		
F	11% tmavé	69,1		

Z naměřených hodnot obsahu dusičnanů vyplývá, že obsah dusičnanů v lahvočném pivu se ve východočeském kraji pohybuje v rozmezí 6,5 až 70,1 mg/l. Z 28 průměrných hodnot obsahu dusičnanů v pivech mělo čtrnáct piv (tj. 50 %) hodnoty nižší než 25 mg/l, deset druhů piv (tj. 37,5 %) vykazovalo hodnoty v rozmezí od 25 do 50 mg/l a pouze čtyři piva měla obsah dusičnanů nad hranici 50 mg/l. Z *tabulky 7* je dále patrné, že obsah dusičnanů v hotových pivech je vyšší než obsah dusičnanů ve varních vodách, z nichž jsou piva vyrobena. Tato skutečnost je způsobena obsahem dusičnanů v chmelu a chmelových výrobcích [6, 13]. Výjimkou byla pouze piva pivovaru I. Se způsobem chmelení souvisí i to, že většina 12% piv obsahuje vyšší hladinu dusičnanů než piva 11% a 10%.

Literatura

- [1] PRUGAR, J., PRUGAROVÁ, A.: Dusičnany v zelenině, 1. vyd., Příroda Bratislava, 1985.
- [2] ELIS, J., ELISOVÁ, K.: Pokroky ve farmácii, 4, Avicenum Praha, 1983.
- [3] CERRUTTI, G. et al.: Mschr. Brauwiss., 40, 1987, s. 416.
- [4] FOSTER, A.: Brauwelt, 128, 1988, s. 188.
- [5] SCHMIDT, G.: Brauindustrie, 75, 1990, s. 942.
- [6] SKALICKÁ, J.: Stanovení dusičnanů a dusitanů v pivovarech

- ských surovinách, meziproduktech a pivu (Diplomová práce) VŠCHT, Praha, 1990.
- [7] TASCHAN, H.: Brauwelt, **130**, 1990, s. 1368.
 - [8] ČSN 83 0611
 - [9] ISO, Fruits, vegetables and derived products. Determination of nitrite and nitrate contents. Molecular absorption spectrometric method, 1984.
 - [10] ŠAVAL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 128.
 - [11] COX, R. D.: Anal. Chem., **52**, 1980, s. 332.
 - [12] POSTEL, W.: Brauwissenschaft, **29**, 1976, s. 39.
 - [13] BORCHERT, C., JORGE-NOTHAFT, K., KRÜGER, E.: Mschr. Brauwiss., **41**, 1988, s. 112.
 - [14] Tecator Goeteborg: Application note ASN 62 — 02/83, 1989.
 - [15] GARAJ, J., BUSTIN, D., HLADKÝ, Z.: Analytická chemie, 1. vyd., SNTL, Praha 1987, s. 158.
 - [16] ECKSCHLAGER, K., HORSÁK, I., KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování výsledků a metod, 1. vyd., SNTL Praha, 1980.
 - [17] ČSN 01 0251

Lektoroval Ing. J. Šrogl

Čepička, J.—Baudyš, P.—Víznerová, E.—Krausová, J.: Obsah dusičnanů ve varných vodách a v pivech východočeských pivovarů. Kvas. prům., **37**, 1991, č. 8—9, s. 230—234.

Byly vymezeny chromatografické podmínky pro stanovení obsahu dusičnanů ve varné vodě a pivu metodou iontové chromatografie technikou HPLC. Správnost naměřených hodnot byla ověřena srovnáním s výsledky fotometrické metody podle Postela v klasickém provedení i v technice FIA. Praktickou shodu výsledků všech tří metod prokázaly naměřené hodnoty i vypočtené korelační koeficienty v rozsahu od 0,9794 do 0,9992 a další statistické veličiny. Předností stanovení dusičnanů ve varné vodě a v pivu technikou HPLC je jednoduchá příprava vzorku k analýze, vysoká selektivita a reprodukovatelnost stanovení. Při monitorizaci obsahu dusičnanů ve varných vodách a v pivech východočeských pivovarů byl zjištěn pouze u dvou pivovarů obsah překračující povolenou hranici 50 mg/l. Okolo 50 % pivovarů vykazovalo obsah dusičnanů v pivech pod hladinou 25 mg/l.

Чепичка, Я.—Баудыш, П.—Визнерова, Е.—Краусова, Я.: Содержание нитратов в варочных водах и пивах предприятий восточной Чехии. Квас. прум., **37**, 1991, № 8—9, стр. 230—234.

Были установлены хроматографические условия для определения содержания нитратов в варочной воде и пиве методом ионной хроматографии способом HPLC. Правильность величин, полученных при измерении была сопоставлена с результатами фото-

метрического метода по Постелу в классическом проведении и в способе FIA проверена. Практическое сходство результатов всех трех методов доказали данные по измерению и рассчитанные корреляционные коэффициенты в диапазоне от 0,9794 до 0,992 и другие статистические величины. Преимуществом определения нитратов в варочной воде и пиве способом HPLC является простое приготовление образца для анализа, высокая селективность и воспроизводимость определения. При текущем исследовании содержания нитратов в варочных водах и пивах предприятия восточной Чехии в только на двух пивоваренных заводах было найдено содержание, превышающее разрешенный предел 50 мг/л. Около 50 % пивоваренных заводов показывало содержание нитратов в пиве ниже 25 мг/л.

Čepička, J.—Baudyš, P.—Víznerová, E.—Krausová, J.: Nitrate Content in Brewing Waters and Beers of Eastern Bohemian Breweries. Kvas. prům., **37**, 1991, No. 8—9, pp 230—234.

Described HPLC ion chromatography method enables to measure the nitrate content of brewing water and bottled beer. The accuracy of this method has been verified by comparison with photometric Postel's and flow injection methods. High values of correlation coefficients in extent 0.9794 to 0.9992 and other statistics has confirmed high agreement of results of all three methods. Compared with other used methods for nitrate measurement HPLC ion chromatography is considerably faster, easier to perform, more specific and enables high reproducibility of results.

Analytical monitoring of nitrate contents of brewing waters and bottled beers in the east bohemian region has shown that only in two breweries were found values over 50 mg/l. About 50 % of breweries have shown nitrate content less than 25 mg/l.

Čepička, J.—Baudyš, P.—Víznerová, E.—Krausová, J.: Nitratgehalt der Brauwasser und der Biere der ostböhmischen Brauereien. Kvas. prům., **37**, 1991, Nr. 8—9, s. 230—234.

Mit der vorgestellten ionenchromatographischen Methode ist es möglich den Nitratgehalt von Brauwasser und Bier schnell und sicher zu bestimmen. Die Richtigkeit der abgemessenen Werte wurde durch Vergleichung mit den Ergebnissen der photometrischen Methode nach Postel und FIA (Flow Injection Analyse) bestätigt. Die praktische Übereinstimmung der Ergebnisse aller drei Methoden wurde durch die abgemessenen Werte auch ausgerechnete Korrelationskoeffiziente im Bereich von 0,9794 bis 0,9992 erwiesen. Der Vorrang der ionenchromatographischen Nitratbestimmungsmethode ist eine einfache und schnelle Durchführung, hohe Selektivität und Reproduzierbarkeit der Bestimmung.

Die Ergebnisse der Nitratbestimmung in Brauwasser und Biere der ostböhmischen Region haben gezeigt, daß nur in zwei Brauereien die Werte höher als 50 mg/l waren. In etwa 50 % der Brauereien war der Nitratgehalt der Biere unter 25 mg/l.