

# Stanovení dimethylnitrosaminu v pivu a sladu metodou diferenčně pulsní polarografie

663.41:543.8  
663.439.1

Ing. VLADIMÍR PEČENKA, ZDENĚK SÁGNER, Ing. VIKTOR MEJSTRÍK, CSc., Výzkumný ústav organických syntéz Pardubice-Rybitví, oddělení toxikologie

## ÚVOD

Stanovení stopových koncentrací dimetylnitrosaminu (NDMA) v pivu a sladu je složitý analytický problém. V současné době existuje v republice jediné pracoviště schopné provádět tyto analýzy: oddělení speciálních analýz ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze. Na tomto pracovišti je od roku 1981 v provozu speciální zařízení pro stanovení nitrosaminů — tzv. TEA detektor (Thermal Energy Analyser, výrobce Thermo Electron Corp., Waltham, USA), připojený na plynový chromatograf. Metoda stopové analýzy nitrosaminů v potravinách detektorem TEA je ve světě nejrozšířenější a postupně vytlačuje ostatní způsoby stanovení. Její výhodou proti ostatním metodám je rychlost, jednoduchost a spolehlivost stanovení, nevýhodou jsou vysoké investiční náklady: nynější cena kompletu plynový chromatograf-TEA detektor je asi 1 300 000 devizových korun.

Toto sdělení podrobně popisuje polarografickou metodu na stanovení NDMA v pivu a sladu vyvinutou v naší laboratoři, která nevyžaduje nákladné vybavení — cena potřebného zařízení (polarografický analyzátor PA 2 s příslušenstvím, Laboratorní přístroje, Praha) je 48 000 Kčs. Polarografie byla již na stanovení nitrosaminů po-

užita [1, 2, 3], navržené metody však mají pro stopovou analýzu v komplexních směsích zcela nedostatečnou citlivost i selektivitu. Zlepšení citlivosti i selektivity naší metody proti dříve publikovaným bylo dosaženo dokonalým odstraněním látek interferujících při polarografii, použitím diferenčně pulsní polarografie (což je selektivnější a řádově citlivější modifikace klasické polarografie) a optimalizací podmínek při polarografii (silně kyselé prostředí a snížená teplota).

## PRINCIP METODY

Analytická metoda záleží v izolaci NDMA ze vzorku piva či sladu složitým postupem do malého objemu zředěné kyseliny sírové, kde je pak stanoven diferenčně pulsní polarografií (DPP) a kvalitativně dokázán fotochemickým rozkladem. Cílem izolace je vedle zkoncentrování přítomného NDMA především odstranění všech látek interferujících při polarografii. Podle charakteru analyzovaného substrátu musí být modifikovány počáteční kroky izolačního postupu. Pro pivo a slad byly vyvinuty tři postupy: postup A pro rozbor piva s obsahem 0 až 5 obj. % alkoholu (tj. pro nealkoholická až 12% piva), postup B pro rozbor vícestupňových piv se

4 až 9 objemovými procenty alkoholu a postup C pro rozbor sladu.

Metoda se skládá z těchto operací:

1. *Postupy A a B:* destilace vzorku piva a odstranění alkoholu z destilátu odpařením ve formě azeotropu s tetrachlormetanem.

*Postup C:* extrakce vzorku sladu směsí chloroformu a metanolu v Soxhletově extraktoru, převedení extraktu do vodné fáze odpařením rozpouštědla po přidavku vody a destilace této vodné fáze.

2. *Čištění získaného vodného roztoku* promytím tetrachlormetanem, extrakcí do dichlormetanu po přidání hydroxidu sodného do koncentrace  $c$  ( $\text{NaOH}$ ) = 5 mol/l, promytím extraktu zředěnou kyselinou sírovou o  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 4 mol/l a extrakcí z dichlormetanu do koncentrovanější kyseliny sírové o  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 8 mol/l.

3. *Oxidace takto vyčištěného vzorku* manganistanem draselným v kyselém prostředí.

4. *Redukce nadbytečného manganistanu* a další čištění vzorku destilací a extrakcí destilátu chloroformem po přidavku hydroxidu sodného do koncentrace  $c$  ( $\text{NaOH}$ ) = 5 mol/l.

5. *Odpaření extraktu v chloroformu* na malý objem a extrakce do velmi malého objemu kyseliny sírové o  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 10 mol/l.

6. *Zředění vodou* na koncentraci  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 2,5 mol/l a stanovení NDMA pomocí DPP metodou standardního přídávku.

7. *Kvalitativní důkaz NDMA* zmizením jeho píku při DPP po ozařování světlem vlnové délky 360 nm.

## ZPRACOVÁNÍ VZORKU

Analýza vzorků piva (postupy A, resp. B) probíhala takto:

Do 1 litrové destilační baňky bylo předloženo 200 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 250 ml odpěněného vzorku piva a obsah baňky byl destilován přes sestupný Liebigův chladič. Prvních 50 ml destilátu (resp. 55 ml destilátu při analýze víceupňového piva — postup B) bylo spolu s 80 ml  $\text{CCl}_4$  (resp. 130 ml  $\text{CCl}_4$  — postup B) odpařováno v 250 ml destilační baňce připojené k sypané destilační koloně [Berlova sedělka] výšky 50 cm a šířky 2,5 cm při refluxu 4:1. Protože azeotrop  $\text{CCl}_4$  — etanol —  $\text{H}_2\text{O}$  se ochlazením rozdělí na organickou fázi a vodně etanolickou fázi, nebylo možno reflux v hlavě kolony odebrat z vrcholu sloupce kondenzátu (jak je obvyklé), ale byl získáván rozdělením průtoku par do dvou chladičů. Kondenzát z prvního chladiče tvořil reflux, kondenzát z druhého byl sbírán do odměrného válce. Po oddestilování 70 ml destilátu (resp. 130 ml — postup B) byl destilační zbytek protřepán ve 250 ml dělicí nálevce a po rozdělení fází byla spodní organická vrstva vypuštěna. Vodná fáze byla promyta 20 ml  $\text{CCl}_4$  a po přidání 40 ml roztoku  $\text{NaOH}$  [ $c$  ( $\text{NaOH}$ ) = 10 mol/l] byla extrahována 2x15 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . (Dělení NDMA mezi fázemi při promývání či extrakci je ukončeno dříve než za 30 sekund třepání.) Spojený extrakt byl ve 100 ml dělicí nálevce promyt 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [ $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 4 mol/l] a kyselá vodná fáze byla reextrahována 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Spojené organické fáze, po přidavku 0,1 ml nasyceného roztoku síranu amonného na neutralizaci stržené kyseliny sírové, byly odpařeny na objem 20 ml ve 100 ml destilační baňce připojené k sypané destilační koloně výšky 25 cm a šířky 2,5 cm při refluxu 4:1. Další postup je shodný s postupem C a je uveden za popisem zpracování vzorku sladu.

Analýza vzorku sladu (postup C) probíhala takto: 50 g mletého sladu bylo extrahováno 2 hodiny ve 250 ml Soxhletově extraktoru směsí 250 ml  $\text{CHCl}_3$  a 30 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Extrakt v 500 ml destilační baňce byl odpařen na objem

40 ml pod sypanou destilační kolonou výšky 50 cm a šířky 2,5 cm při refluxu 4:1. Destilační zbytek byl společně s 50 ml vody odpařován ve 250 ml destilační baňce na rotační vakuové odparce do vydestilování organické fáze (tlak 35 kPa, teplota lázně 40 °C). Poté bylo přidáno 20 ml n-hexanu a bylo pokračováno v odpařování stejným způsobem. Zbývající vodná fáze v destilační baňce byla po přidání 30 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  destilována přes sestupný Liebigův chladič. Prvních 15 ml destilátu (nepočítaje zbytky organické fáze) bylo v 50 ml dělicí nálevce promyto 2x5 ml  $\text{CCl}_4$  a vodná fáze byla po přidání 20 ml roztoku  $\text{NaOH}$  [ $c$  ( $\text{NaOH}$ ) = 10 mol/l] extrahována 2x5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Spojený extrakt byl v 50 ml dělicí nálevce promyt 4 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [ $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 4 mol/l] a kyselá vodná fáze byla reextrahována 10 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Další část popisu platí pro postupy A, B i C:

Vzorek (tj. 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) byl v 50 ml dělicí nálevce zředěn 10 ml n-hexanu a extrahován 2x5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [ $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 8 mol/l]. Spojený extrakt v  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byl ve 250 ml destilační baňce smísen s 5 ml 5% vodného etanolu a 50 ml roztoku  $\text{KMnO}_4$  [ $c$  ( $\text{KMnO}_4$ ) = 0,2 mol/l]. Pro zachování reprodukovatelnosti čištění vzorku a výtěžku NDMA během oxidace musela být teplota roztoků před smíšením 20–23 °C. Oxidací alkoholu stoupla asi na 35 °C a postupně klesala asi na 28 °C ve 30. minutě. Přesně po 30 minutách od smíšení s  $\text{KMnO}_4$  bylo přidáno 40 ml roztoku  $\text{FeSO}_4$  [ $c$  ( $\text{FeSO}_4$ ) = 1 mol/l] a 60 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a obsah baňky byl destilován přes sestupný Liebigův chladič. Prvních 30 ml destilátu bylo po smíšení s 30 ml roztoku  $\text{NaOH}$  [ $c$  ( $\text{NaOH}$ ) = 10 mol/l] ve 100 ml dělicí nálevce extrahováno 2x10 ml  $\text{CHCl}_3$ . Spojený extrakt byl odpařen na objem 2 ml v 50 ml srdcové baňce připojené k trubcové destilační koloně výšky 60 cm a světlostí 4 mm při refluxu 2:1. Destilační zbytek byl po zředění 1 ml n-hexanu extrahován 0,2 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [ $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 10 mol/l] během pětiminutového probublávání vzduchem v extrakční nádobce tvaru zabroušené zkumavky s kónickým dnem, postranním tubusem pro připojení vakua a kapilárou sahající ke dnu. Vyextrahovaná organická fáze byla odsáta, extrakt byl zbaven zbytků organické fáze dalším probubláváním vzduchem a zfiltrován přes skelnou vatou v miniaturní nálevce pomocí vakua. Extrakční nádobka byla vypláchnuta 0,6 ml vody a výplach byl připojen filtrací ke vzorku. K přenosu vzorku byla používána kapilára extrakční nádoby. Ve spojeném filtrátu, jímáném do zkumavky o průměru 10 mm, bylo provedeno stanovení NDMA.

## STANOVENÍ NDMA

Získaný konečný vzorek byl ochlazen na 0 °C, zbaven  $\text{O}_2$  probubláváním medicínálním dusíkem a analyzován DPP běžným způsobem metodou standardního přídávku. Přídatek byl aplikován konstričními mikropipetami (2, 5 či 10  $\mu\text{l}$ ) ve formě vodných roztoků NDMA [ $c$  (NDMA) =  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  a  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l]. Měření probíhalo na polarografickém analyzátoru PA 2 ve spojení se souřadnicovým zapisovačem XY 4103 (výrobky Laboratorních přístrojů, Praha) za těchto podmínek:

pracovní elektroda: rtuťová kapková podle Novotného  
výška rtuťového sloupce: 60 cm  
průtoková rychlost: 1 mg/s  
srovnávací elektroda: normální kalomelová  
operace: DPP  
počáteční napětí: — 450 mV  
měřicí rozsah: 750 mV  
nárůst lineárního napětí: — 5 mV/s  
doba řízené kapky: 1 s  
amplituda pulsu: 50 mV  
citlivost analyzátoru: 14 až 17

citlivost zapisovače: 100 mV/cm pro obě souřadnice.  
Potenciál píku NDMA je za těchto podmínek — 750 mV.

Pokud konečný vzorek pro DPP obsahoval více než  $2 \mu\text{g}$  NDMA (tj. tehdy, když výška píku daná výše uvedenými podmínkami měření přesahovala při citlivosti 14 stupnicí zapisovače), byl vzorek před stanovením NDMA zředěn  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [ $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2,5 \text{ mol/l}$ ]. Zředěním byla zajištěna podmínka pro použití metody standardního přídatku: lineární závislost proudu na koncentraci. Optimální zředění je na cca  $0,5 \mu\text{g}$  NDMA/ml, což odpovídá měření při citlivosti analyzátoru 15. Redění vzorku lze obejít použitím korekčních grafů, odvozených ze závislosti polarografického proudu na koncentraci NDMA. Je výhodné zavést do korekčních grafů též opravu na zředění standardním přídatkem a aplikovat přídatvek přesněji mikropipetami větších objemů (10, 20 a  $50 \mu\text{l}$ ) [4, 5].

V případě, že nebyly používány korekční grafy, byl obsah NDMA v původním vzorku určen podle vzorce:

$$C_{\text{NDMA}} (\mu\text{g/kg resp. } \mu\text{g/l}) = \frac{1000}{m_{\text{vz.}} (\text{g resp. ml})} \cdot \frac{100}{\eta (\%)} \cdot \frac{h_{\text{v}} + h_{\text{s}}}{H_{\text{v}} + H_{\text{s}} - (h_{\text{v}} + h_{\text{s}})} \cdot V_{\text{st.}} (\mu\text{l}) \cdot c_{\text{st.}} (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

kde:

- $m_{\text{vz.}}$  je množství vzorku vzatého k analýze,
- $\eta$  — výtěžek NDMA během zpracování vzorku (musí být zjištěn samostatnými pokusy),
- $V_{\text{st.}}$  — objem standardního přídatku,
- $c_{\text{st.}}$  — koncentrace NDMA ve standardním přídatku,
- $h, H$  — výšky píků NDMA přepočtené na jednu zvolenou citlivost analyzátoru,
- $h$  — odečteno ze záznamu DPP vzorku,
- $H$  — odečteno ze záznamu DPP po aplikaci standardního přídatku,
- $H_{\text{v}}, h_{\text{v}}$  jsou výšky vzestupné větve píku,
- $H_{\text{s}}, h_{\text{s}}$  jsou výšky sestupné větve píku.

U vybraných vzorků byl proveden kvalitativní důkaz: konečný vzorek po polarografickém stanovení NDMA byl za chlazení vodou v plášťované nádobce 45 minut ozářován světlem vlnové délky 360 nm (UV lampa s filtrem — Narva HOV 125 24 II), přičemž byl umístěn ve vzdálenosti 10 cm od středu lampy v komoře vyložené hliníkovou fólií. Za těchto podmínek byl poločas fotochemického rozkladu NDMA roven 10 minutám. Po fotolýze byl proveden záznam DPP — zmizení píku měřené látky bylo důkazem, že jde o NDMA.

Vzhledem k citlivosti NDMA vůči UV záření v oblasti 300 až 400 nm (které je součástí slunečního světla a prochází okenním sklem) byly veškeré práce prováděny v místnosti s okny zakrytými žlutou fólií, nepropouštějící vlnové délky pod 500 nm. Stejnou službu poskytně úplné zatemnění a osvětlení běžnými wolframovými žárovkami, které mají v oblasti pod 400 nm zanedbatelnou svítivost.

## VÝSLEDKY

Popsanou metodou bylo analyzováno osm vzorků 12% světlého piva, dva vzorky 18% tmavého piva, jeden vzorek nealkoholického piva a čtyři vzorky sladu. Souběžně s analýzami byly měřeny výtěžky NDMA během zpracování vzorku — aplikací standardního přídatku do výchozího vzorku a vyhodnocením přírůstku NDMA v konečném vzorku pro DPP. Standardní přídatvek do piva byl dodán ve formě vodného roztoku NDMA, přídatvek do sladu ve formě roztoku NDMA v  $\text{CHCl}_3$  (nástříkem konstriční mikropipetou do osy extrakční patrony ve 2/3 výšky vrstvy sladu těsně před vložením patrony do extraktoru). Teprve na základě zjištěných

průměrných výtěžků byly vyhodnoceny analýzy piva a sladu. Výsledky shrnují *tabulky 1 až 4* a dokumentuje *obr. 1*.

Nálezy NDMA jsou v souladu s výsledky již dříve publikovanými [9]. Tmavá piva mají výrazně vyšší obsah NDMA než světlá (jako důsledek jiné technologie zpracování sladu) a použití přímého ohřevu při hvozdění sladu zvyšuje obsah NDMA proti klasickému způsobu až o dva řády.

## HODNOCENÍ METODY A DISKUSE

Postup izolace NDMA ze substrátu do konečného vzorku pro DPP byl navrhován na základě znalosti rozdělovacích poměrů NDMA mezi rozpouštědly a různými vodnými fázemi, chování NDMA při destilaci s různými rozpouštědly a s vodou (po nasycení anorganickými solemi), stability vůči oxidaci manganistanem apod. [5–7]. Izolační postup byl obměňován a optimalizován se zřetelem na dva protichůdné parametry: pracnost postupu a mez detekce v konečném vzorku. Jednotlivé operace byly upraveny tak, aby se při nich dosahovalo výtěžku asi 97% — kromě promývání vodného vzorku tetrachlormetanem (výtěžek asi 90%) a oxidace manganistanem (výtěžek asi 75%), účinnost uvedených dvou operací je pro čistotu konečného vzorku rozhodující. Dosahované celkové výtěžky dobře odpovídají součinu výtěžků při jednotlivých operacích. Z výsledků v *tab. 1 až 4* je zřejmé, že výtěžek je ovlivňován složením analyzovaného substrátu (při zpracování čistého vodného roztoku NDMA je výtěžek 55%). Rozdílné výtěžky jsou způsobeny zejména rozdílnými podmínkami při oxidaci manganistanem [6]. Kromě toho výtěžek jistě závisí i na použité aparatuře a preciznosti práce. Proto je nutné ověřit si výtěžek NDMA pro každý typ analyzovaného substrátu před zavedením této metody pro sériovou analýzu.

Mez citlivosti (chápaná jako nejnížší koncentrace NDMA ve výchozím vzorku, jež ještě vytvoří při DPP konečného vzorku odlišitelný pik NDMA na vzestupné větvi rozkladného proudu elektrolytu) je závislá na typu analyzovaného substrátu a ani u stejného vzorku nebyla zcela reprodukovatelná [5]. Pro nedostupnost příslušných substrátů, jež by neobsahovaly NDMA, byla mez citlivosti odhadována z křivek DPP při analýze vzorků s nízkým obsahem NDMA. Při analýze čistého vodného roztoku NDMA byla nejnížší stanovitelná koncentrace  $0,1 \mu\text{g/l}$ , u nízkostupňových piv kolísala mezi  $0,1$  až  $0,6 \mu\text{g/l}$  a u sladu byla  $0,6 \mu\text{g/kg}$ . Při rozboru 18% tmavého piva nemohla být mez citlivosti odhadnuta pro vysoký obsah NDMA; zaručeně je však nižší než  $1 \mu\text{g/l}$ .

Mez citlivosti pro NDMA je určována interferujícím rozkladným proudem elektrolytu při DPP. Rozkladný proud je ovlivňován látkami pocházejícími z analyzovaného substrátu (částečně i z použitých chemikálií), které snižují přepětí vodíku na rtuti, což se projevuje posunem tangenciálního rozkladného napětí elektrolytu (*obr. 2*). Posun odpovídá 100 až 200 mV k pozitivním hodnotám (proti čisté  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a má za následek zhoršení meze citlivosti pro NDMA. Protože citované látky působí jako katalyzátory („katalytické proudy vodíku“) [8] projevují se již v extrémně nízkých koncentracích. Zřejmě se vytvářejí i při fotolýze (*obr. 1*).

Vzdálenost píku NDMA od rozkladného napětí elektrolytu závisí v podstatě na čtyřech faktorech [6]. Nejdůležitějším faktorem je stupeň čištění vzorku (viz první odstavec této kapitoly). Dalším faktorem je teplota při DPP. Při jejím snižování se vedle nevýznamného snížení všech proudů současně posunuje k negativním hodnotám rozkladné napětí (resp. napětí katalytických proudů vodíku) i poloha píku NDMA. Přitom posun píku

Tabulka 1. Výsledky analýz 12% světlého piva  
Tabulka 1a. Výtěžky NDMA během zpracování vzorku

Vzorek	Přídavek do 250 ml výchozího vzorku	Výtěžek
A	1,48 $\mu\text{g}$ NDMA	48 %, 49 %
B	0,74 $\mu\text{g}$ NDMA	47 %, 51 %
C	3,70 $\mu\text{g}$ NDMA	41 %, 47 %
průměr	—	47 % ( $\pm 3,5$ %)

Tabulka 1b. Nálezy NDMA

Vzorek	Nález NDMA ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Průměr, relativní směrodatná odchylka jedné analýzy
A	0,49 0,55	0,52 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 8$ %
B	0,44 0,43 0,50 0,48	0,46 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 7$ %
C	0,60 0,58 0,77 0,66	0,65 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 13$ %
D	0,58 0,58	0,58 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 0$ %
E	0,50 0,58	0,54 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 11$ %
F	0,64 0,65	0,65 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 1$ %
G	0,71 0,81	0,76 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 9$ %
H	0,45 0,53	0,49 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 12$ %

NDMA je menší a jeho vzdálenost od rozkladného napětí s klesající teplotou roste. Při analýzách piva a sladu byla pro polarografii zvolena teplota 0 °C; technické problémy s udržováním ještě nižších teplot nejsou kompenzovány dostatečným zlepšením meze citlivosti.

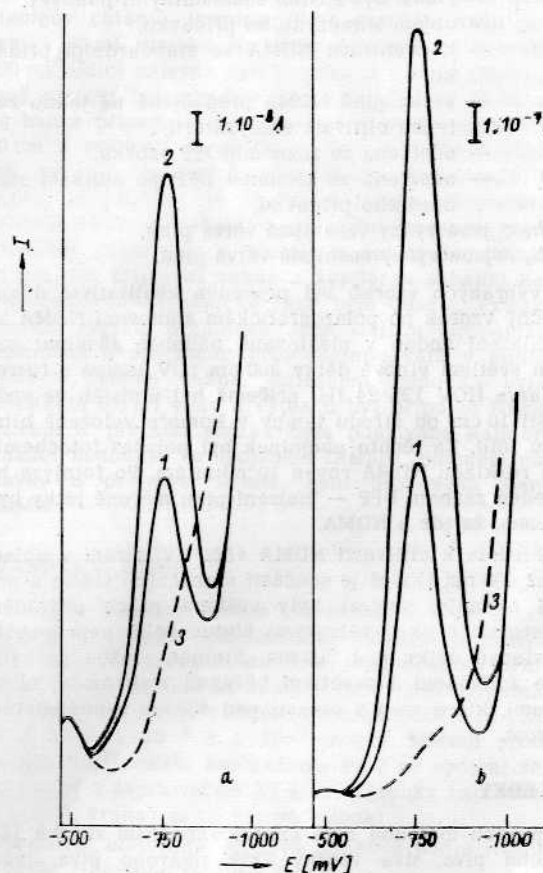
Třetím faktorem je koncentrace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  při DPP. S jejím růstem se posouvá pik NDMA i rozkladné napětí k pozitivním hodnotám. Jejich vzájemná vzdálenost je největší při  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 3 mol/l; směrem k vyšším a nižším koncentracím klesá. Kromě toho je v ch. č.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konstantně přítomno stopové množství neznámé polarograficky aktivní látky, jejíž vylučovací napětí je velmi silně závislé na koncentraci  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Při koncentraci  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $\geq 3$  mol/l pik této látky interferuje s pikem NDMA, při  $c$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) = 2,5 mol/l je poloha píku této látky taková [cca -500 mV, obr. 2], že do jisté míry omezuje nepříznivý vliv rozkladného proudu elektrolytu.

Tabulka 2. Výsledky analýz 18% tmavého piva  
Tabulka 2a. Výtěžky NDMA během zpracování vzorku

Vzorek	Přídavek do 250 ml výchozího vzorku	Výtěžek
I	14,8 $\mu\text{g}$ NDMA	44 %, 46 % 48 %, 49 %
průměr	—	47 % $\pm 2,5$ %

Tabulka 2b. Nálezy NDMA

Vzorek	Nález NDMA ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Průměr, relativní směrodatná odchylka jedné analýzy
I	11,2 12,3 11,6 14,2	12,3 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 11$ %
J	8,6 9,2	8,9 $\mu\text{g}/\text{l}$ $\pm 5$ %



Obr. 1. Ukázka záznamu DPP při analýze piva a sladu  
a) analýza sladu (vzorek I), b) analýza 18% tmavého piva (vzorek J), 1 — křivka DPP vzorku, 2 — křivka DPP vzorku po standardním přídavku, 3 — křivka DPP vzorku po standardním přídavku a po fotolýze.

Posledním faktorem je objem vzorku pro DPP. Snaha zlepšit citlivost dalším snížením objemu konečného objemu vzorku nevede k cíli — mez citlivosti se naopak

zhorší následkem posunu rozkladného napětí, jenž je způsoben zkoncentrováním látek odpovědných za tento jev. Poměr 250 ml piva (resp. 50 g sladu)/0,8 ml vzorku pro DPP je z hlediska meze citlivosti zhruba optimální.

Při analýzách nebyl zjištěn jediný případ falešně pozitivního nálezu (tj. ozařování vždy odstranilo pik přisuzovaný NDMA). Protože kvalitativní důkazy fotolýzou nejsou absolutní, bylo by vhodné pro verifikaci metody provést paralelně sérii analýz popsanou polarografickou metodou a metodou jinou (nejlépe detektorem TEA). Možnost takového srovnání jsmě měli v jediném případě: vzorek 12% světlého piva (vzorek H), v němž v NSR (Wissenschaftliche Station für Brauerei in München E. W.) detektorem TEA nalezli 0,3 µg/l, poskytli při rozboru naší metodou výsledek 0,49 µg NDMA/l. Z jedné analýzy nelze ovšem odvozovat závěry, navíc jde o koncentrace ležící na mezi citlivosti obou metod (autor metody pro stanovení NDMA v pivu detektorem TEA [9] označuje nálezy pod 0,5 µg/l jako nedetekovatelná množství. Pro srovnání by bylo třeba vzít vzorek s vyšším obsahem NDMA.



Obr. 2. Posun rozkladného napětí elektrolytu nečistotami z analyzovaného vzorku

Záznam křivek DPP: 1 — ch. č. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [c(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 2,5 mol/l], 2 — konečný vzorek při analýze destilované vody, 3 — konečný vzorek při analýze 12% světlého piva (vzorek E), R — rozkladný proud elektrolytu

Tabulka 3. Výsledky analýzy nealkoholického piva

Vzorek	Přídavek do 250 ml výchozího vzorku	Výtěžek	Nález NDMA (µg/l)	Průměr, směrodatná odchylka jedné analýzy
K	3,7 µg NDMA	52 % 56 % prům. 54 % (± 3 %)	— — —	— — —
K	—	—	0,64 0,62	0,63 µg/l ± 2 %

Tabulka 4. Výsledky analýz sladu

Tabulka 4a. Výtěžky NDMA během zpracování vzorku

Vzorek	Přídavek do 50 g výchozího vzorku	Výtěžek
L	1,48 µg NDMA	42 %, 51 %
M	7,40 µg NDMA	43 %, 48 %
průměr	—	46 % (± 4 %)

Tabulka 4b. Nálezy NDMA

Vzorek	Nález NDMA (µg/kg)	Průměr, relativní směrodatná odchylka jedné analýzy
L (nepřímý ohřev)	3,1 3,5	3,3 µg/kg ± 9 %
M (ohřev spalnými plyny)	209 190	200 µg/kg ± 7 %
N (ohřev spalnými plyny)	184 183 202 199	192 µg/kg ± 5 %
P (ohřev spalnými plyny)	83 93	88 µg/kg ± 8 %

Po zaběhnutí metody trvala analýza jedné šarže piva (tj. paralelně dvou vzorků z ní odebraných) asi 6 hodin, analýza jedné šarže sladu (opět dva paralelní vzorky) si vyžádala 10 hodin. Pokusy o zkrácení postupu nebyly úspěšné — vynechání některé z operací při čištění vzorku vede ke zhoršení meze citlivosti a zvyšuje nebezpečí falešně pozitivních nálezů.

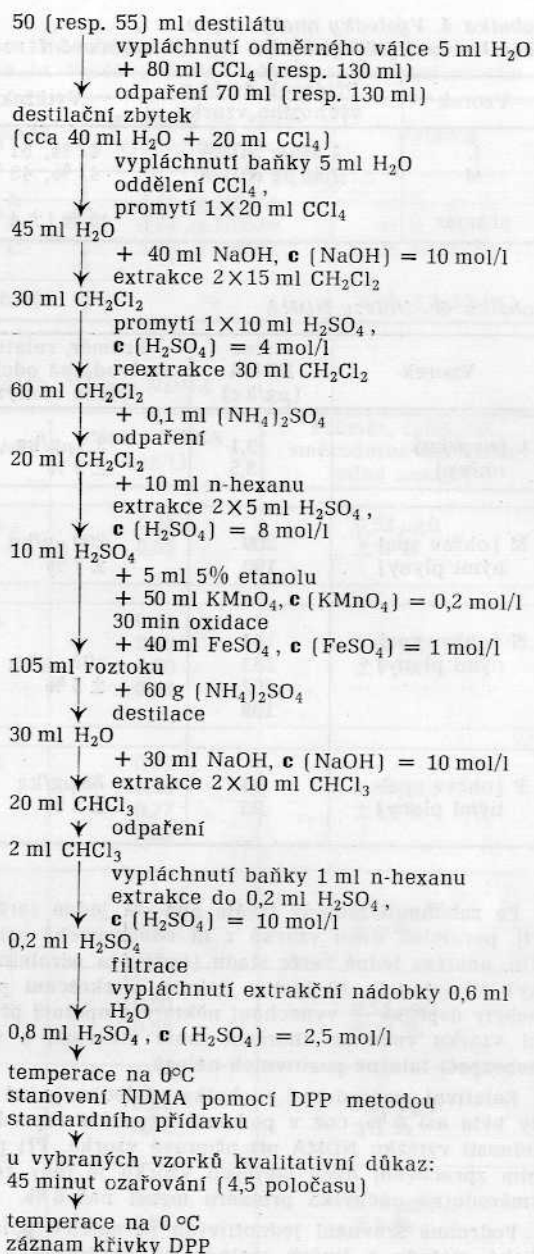
Relativní směrodatná odchylka výsledku jedné analýzy byla asi 8 %, což v podstatě odpovídá reprodukovatelnosti výtěžku NDMA při přípravě vzorku. Při paralelním zpracování dvou stejných vzorků je tedy relativní směrodatná odchylka průměru menší než 6 %.

Podrobné srovnání jednotlivých parametrů polarografické metody a jiných metod, jež přicházejí v úvahu (plynová chromatografie s detektory TEA, MS, AFID, CECD, či ECD), je uvedeno ve zprávě VÚOS [4]. Celkově lze konstatovat, že hlavní výhodou DPP je nenáročnost na investiční vybavení. Proti metodám s detektory AFID, CECD a ECD navíc dosahuje o něco lepší citlivosti, přičemž pracnost úpravy vzorku je jen nepodstatně větší. Pro sériové analýzy (a při dostupnosti dezinfekčních prostředků) je ovšem bez konkurence detektor TEA.

Zájemce o zavedení metody ještě upozorňujeme, že v posledních fázích práce se vzorkem platí striktní příkaz čistoty nádobí i chemikálií. Každé znečištění se projevuje posunem rozkladného napětí elektrolytu k pozitivním hodnotám a vede ke znehodnocení vzorku. Proto zde musí být používán CHCl<sub>3</sub> zásadně čistoty p. a. a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zásadně čistoty ch. č.

Obr. 3. Schéma postupu při stanovení NDMA v pivu (postup A, resp. B)

250 ml piva  
↓  
+ 200 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
↓  
destilace



#### APLIKACE METODY NA JINÉ SUBSTRÁTY

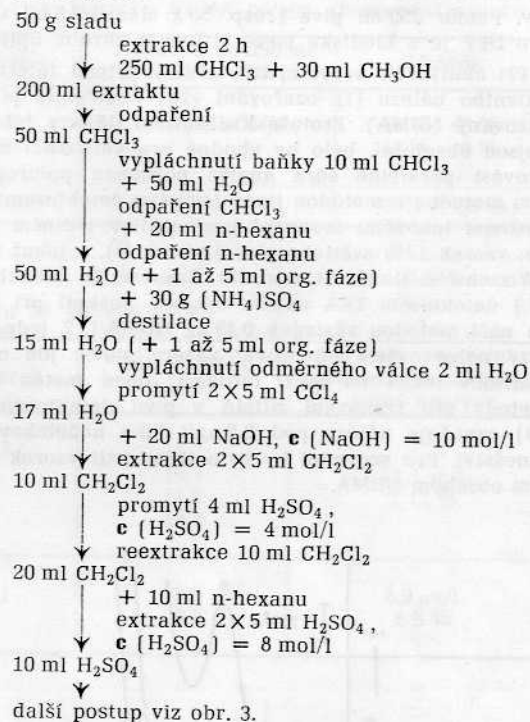
Popsanou metodou lze stanovit pouze NDMA, a to ze dvou důvodů: jiné nitrosaminy procházejí zpracováním vzorku s velmi nízkým výtěžkem a DPP neumožňuje stanovení více nitrosaminů vedle sebe, jelikož rozdílly potenciálů piků jednotlivých nitrosaminů jsou menší než pološířky piků. Pro toxikologické zhodnocení je však potřebná znalost obsahu všech nitrosaminů; metoda je proto vhodná jen pro substráty obsahující významná množství jediného nitrosaminu — NDMA.

Pro aplikaci metody na jiné substráty než pivo a slad bez úpravy postupu [např. na další suroviny či na meziprodukty při výrobě piva] musí být splněny tyto podmínky (které nemusí být postačující):

a) vodný roztok nesmí obsahovat velká množství netěkavého podílu schopného vázat NDMA při destilaci, ani větší množství těkavého organického podílu, než je schopno se odpařit při azeotropické destilaci s CCl<sub>4</sub> (postup A či B),

b) tuhý materiál musí být z největší části nerozpustný ve směsi CHCl<sub>3</sub> a CH<sub>3</sub>OH, přičemž přítomný NDMA musí být touto směsí extrahovatelný (postup C).

Obr. 4. Schéma postupu při stanovení NDMA ve sladu (postup C)



U každého nového typu substrátu je třeba ověřit výtěžky NDMA během úpravy vzorku, mez citlivosti a také, zda neposkytuje falešně pozitivní nálezy.

#### Literatura

- [1] HEATH, D. F., JARVIS, J. A. E.: Analyst **80**, 1955, s. 613
- [2] LYDERSEN, D. L., NAGY, K.: Z. Anal. Chem. **230**, 1967, s. 277
- [3] WALTERS, C. L., JOHNSON, E. M., RAY, N.: Analyst **95**, 1970, s. 485
- [4] Vnitřní výzkumná zpráva VÚOS: Analytická metoda pro stanovení stopových množství dimethylnitrosaminu v pivo a sladu (1981)  
PEČENKA, V., MEJSTRÍK, V., SÁGNER, Z.: Čs. PV 5690-81  
PEČENKA, V., MEJSTRÍK, V., SÁGNER, Z.: Čs. PV 6326-81
- [5] Výzkumná zpráva VÚOS: Toxikologie 1981/5. díl
- [6] Výzkumná zpráva VÚOS: Toxikologie 1980/5. díl
- [7] Výzkumná zpráva VÚOS: Toxikologie 1979/5. díl /
- [8] HEYROVSKÝ, J., KŮTA, J.: Základy polarografie. Academia 1962.
- [9] SPIEGELHALDER, B., EISENBRAND, G., PREUSSMANN, R.: Food Cosmet. Toxicol. **17**, 1979, s. 29
- [10] Analysis of Volatile Nitrosamines in Food. IARC Scientific Publication No. 18. R. Preussmann, M. Castegnaro, E. A. Walker, A. E. Wassermann. IARC Lyon 1978

**Pečenka, V. - Ságner, Z. - Mejstřík, V.: Stanovení dimethylnitrosaminu v pivo a sladu metodou diferenčně pulsní polarografie. Kvas. prům., 28, 1982, č. 3, s. 49–53.**

Podrobný popis a zhodnocení nově vyvinuté metody pro stanovení stop dimethylnitrosaminu v pivo a sladu. Metoda záleží v izolaci dimethylnitrosaminu z piva či sladu do malého objemu zředěné kyseliny sírové, kde je stanoven diferenčně pulsní polarografií a kvalitativně dokázán fotochemickým rozkladem. Použitelnost metody byla ověřena analyzováním osmi vzorků 12% světlého piva, dvou vzorků 18% tmavého piva, jednoho vzorku nealkoholického piva a čtyř vzorků sladu. Reprodukovatelnost je asi 8%, mez citlivosti 0,1 až 0,6 μg/l pro rozběr piva a 0,6 μg/kg pro analýzu sladu. Metodu lze použít pro kontrolu kvality exportovaného piva a sladu. Je aplikovatelná i na jiné typy substrátů. Největší výhodou popisované metody proti metodám dosud používaným je nenáročnost na investiční vybavení.

Печенка, В., Сэгнер, З., Мейстржик, В.: Установление диметилнитрозамина в пиве и солоде методом разностно-импульсной полярографии. Квас. прум., 28, 1982, No 3, стр. 53—59.

Подробное описание и оценка нового разработанного метода для установления следов диметилнитрозамина в пиве и солоде. Метод состоит в изолировании диметилнитрозамина из пива или солода в малом объеме разбавленной серной кислоты, где он определен при помощи разностно-импульсной полярографии и качественно доказан при помощи фотохимического разложения. Применимость метода проверялась при анализе восьми проб 12 % светлого пива, двух проб 18 % темного пива, одной пробы бесспиртного пива и четырех образцов солода. Воспроизводимость приблизительно 8 %, разрешающая способность 0,1—0,6  $\mu\text{g}/\text{l}$  для анализа пива и 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  для анализа солода. Метод можно применить для контроля качества экспортированного солода и пива. Он применим и для других типов субстратов. Самой большой выгодой описываемого метода в сопоставлении с методами до сих пор применяющимися являются его низкие требования к капитальному оборудованию.

**Pečenka, V. - Ságner, Z. - Mejstřík, V.: Estimation of Dimethylnitrosamine in Beer and Malt by Differential Pulse Polarography Method.** Kvas. prům. 28, 1982, No. 3, pp. 53—59.

A new developed method for the estimation of traces of dimethylnitrosamine in beer and malt is described and evaluated. A principle of this method is in an isolation of dimethylnitrosamine from beer or malt into a small volume of diluted sulphuric acid. In this solution, dimethylnitrosamine is estimated by differential pulse polarography and demonstrated qualitatively by photochemical fission. The utility of this method was verified

in the analyses of eight samples of 12 % pale beer, two samples of 18 % dark beer, one sample of nonalcoholic beer, and four samples of malt. The reproducibility is about 8 %, the lower limit for the estimation is from 0.1 to 0.6  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  with a beer analysis and 0.6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  with a malt analysis. The method can be used for a check of the quality of exported beer and malt. The method can be applied on other types of substrates, too. The main advantage of this method, in comparison with the methods routinely used, is in low investment requirements.

**Pečenka, V. - Ságner, Z. - Mejstřík, V.: Bestimmung des Dimethylnitrosamins in Bier und Malz mittels der Methode der Differenz-Pulsionspolarographie.** Kvas. prům. 28, 1982, No. 3, S. 53—59.

Der Artikel enthält eine ausführliche Beschreibung und Auswertung einer neu entwickelten Methode zur Bestimmung von Dimethylnitrosamin-Spuren im Bier und Malz. Die Methode besteht in der Isolierung des Dimethylnitrosamins aus dem Bier oder Malz in ein geringes Volumen verdünnter Schwefelsäure, wo es durch Differenz-Pulsionspolarographie bestimmt und durch fotochemische Zersetzung qualitativ bewiesen wird. Die Anwendbarkeit der Methode wurde an acht Proben 12% hellen Bieres, zwei Proben 18% dunklen Bieres, einer Probe alkoholfreien Bieres und vier Malzproben geprüft. Die Reproduzierbarkeit ist ungefähr 8 %, die Empfindlichkeitsgrenze 0,1 bis 0,6 g/l für Bieranalysen und 0,6 g/kg für Malzanalysen. Die Methode ist für die analytische Qualitätskontrolle des zum Export bestimmten Bieres und Malzes geeignet. Sie kann auch auf andere Substratentypen appliziert werden. Der entscheidende Vorteil der beschriebenen Methode gegenüber den bisher angewandten Methoden ist ihre Anspruchslosigkeit an die Investitionsausstattung.