

# Stanovení obsahu dusičnanů v nápojích

Jaromír Večeřa

---

Bakalářská práce  
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

akademický rok: 2005/2006

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jaromír VEČEŘA**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Téma práce: **Stanovení obsahu dusičnanů v nápojích**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části rozebrat problematiku dusičnanů v potravinách a nápojích a jejich rizikovost pro lidský organismus.
2. Zpracovat přehled metod používaných pro stanovení dusičnanů v potravinách a nápojích.
3. Provést stanovení výsledků, diskusi možných rozdílů, zhodnotit přednosti a nedostatky použitých metod.



Rozsah práce:  
Rozsah příloh:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:  
Dle doporučení vedoucího BP.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Marta Severová**  
Ústav potravinářského inženýrství a chemie  
Datum zadání bakalářské práce: **10. října 2005**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2006**

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006

  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
děkan



  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
ředitel ústavu

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá problematikou dusičnanů v potravinách a nápojích jejich rizikovostí pro lidský organismus. Uvádí přehled metod běžně používaných pro laboratorní stanovení dusičnanů. Cílem práce bylo srovnat běžně využívanou metodu stanovení dusičnanů s rychlou spektrofotometrickou metodou firmy HACH. Získané výsledky jsou statisticky vyhodnoceny a provedeno srovnání použitých metod z hlediska časové a finanční náročnosti.

Klíčová slova:

dusičnany, dusitany, nitrily, nitrosaminy, kontaminanty, aditiva, HACH, spektrofotometrie

## **ABSTRACT**

In the theoretical part of this bachelor paper, problems of nitrates contained in foodstuffs and of their hazard for the human organism are discussed. The methods usually used for lab determination of nitrates are enumerated. This paper aims at comparison between the normally applied nitrates determination method and the rapid spectrophotometric one developed by the HACH company. The results obtained have been statistically evaluated and both methods compared as to their time as well as financial demands.

Keywords:

nitrates, nitrites, nitriles, nitrosamines, contaminants, additives, HACH, spectrophotometry

## **Poděkování**

Děkuji touto cestou vedoucí bakalářské práce ing. Martě Severové za systematické odborné vedení a pomoc při zpracování práce.

# OBSAH

ÚVOD .....	7
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
1.1 DUSIČNANY A DUSITANY JAKO ADITIVNÍ LÁTKY .....	8
1.2 DUSIČNANY A DUSITANY JAKO TOXICKÉ LÁTKY .....	18
1.2.1 Výskyt .....	19
1.2.1.1 Potraviny rostlinné původu .....	19
1.2.1.2 Potraviny živočišného původu .....	22
1.2.1.3 Voda .....	23
1.3 TOXIKOLOGICKÉ HODNOCENÍ DUSIČNANŮ A DUSITANŮ .....	25
1.4. METODY STANOVENÍ DUSIČNANŮ A DUSITANŮ .....	29
1.4.1 Diagnostické papírky .....	29
1.4.2 Potenciometrické stanovení pomocí iontově selektivní elektrody .....	30
1.4.3 Spektrofotometrické metody stanovení .....	31
1.4.3.1 Přímé spektrofotometrické metody .....	31
1.4.3.2 Nepřímé spektrofotometrické metody – stanovení dusitanů .....	32
1.4.4 Nepřímé polarografické stanovení dusičnanů a dusitanů vedle sebe .....	34
1.4.5 Automatizované stanovení dusitanů a dusičnanů průtokovou injekční analýzou FIA .....	35
<b>2 PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE .....	36
2.2 PRACOVNÍ POSTUP PŘÍMÉHO STANOVENÍ DUSIČNANŮ METODOU SE SALICYLANEM SODNÝM .....	37
2.3 PRACOVNÍ POSTUP NEPŘÍMÉHO STANOVENÍ DUSIČNANŮ RYCHLOU SPEKTROFOTOMETRICKOU METODOU FIRMY HACH .....	37
2.4 DVOUVÝBĚROVÝ WILCOXONŮV TEST .....	38
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>45</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>48</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>49</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>50</b>

## ÚVOD

Dusičnany tvoří přirozenou součást rostlinné i živočišné hmoty (patří mezi produkty metabolismu). Obsah dusičnanů v zemědělských plodinách závisí na řadě faktorů a vzájemné interakci jejich působení. K nejdůležitějším faktorům patří světelné poměry (intenzita a délka slunečního svitu). Zelenina ze zimní a předjarní produkce vykazuje vyšší obsahy dusičnanů než z letní sklizně. Vyšší koncentrace dusičnanů v potravinách ale může být navíc zapříčiněna nadměrným používáním průmyslových hnojiv (dusičnany jsou hlavní součástí průmyslových hnojiv) v zemědělství a v jejich nevhodné aplikaci (např. na podzim). Dusičnany se tak mohou ve zvýšené koncentraci dostat i do povrchových a podpovrchových vod a tím i do studní. Děje se tak průsakem vody přes půdu s vymýváním živin, povrchovým odtokem vody s transportem erodovaných částic a živin.

Dusitaný a dusičnany se v potravinářství používají jako konzervační přísady do uzenin a dalších masných výrobků. Kromě toho, že tak prodlužují jejich trvanlivost, váží v nich vodu a uchovávají navíc jejich růžovou barvu po tepelné úpravě.

Limitní množství dusitanů a dusičnanů v potravinách je dané vyhláškou č. 53/2002 Sb., v pitné vodě vyhláškou č. 376/2000 Sb., kterou se stanoví požadavky na pitnou vodu, rozsah a četnost její kontroly a v balené vodě vyhláškou č. 292/97 Sb., kterou se stanoví požadavky na zdravotní nezávadnost balených vod způsob jejich úpravy.

Při běžných koncentracích nepůsobí dusičnany na zdravého člověka škodlivě. Problém vyššího výskytu dusičnanů, popř. dusitanů v poživatinách spočívá v jejich možné metabolické přeměně v lidském těle na N-nitrososloučeniny (nitrosaminy a nitrosamidy) s kancerogenními účinky. Další nebezpečí představují dusičnany u kojenců, u nichž mohou způsobovat alimentární methemoglobinemii. Vážou se na červené krevní barvivo hemoglobin, které má u malých dětí jinou chemickou strukturu, a blokují tak přenos kyslíku v těle. To může způsobit dýchací problémy dětí doprovázené modráním tkání nebo až udušením. Proto je nutné sledovat obsah dusičnanů a dusitanů ve vodě, potravinách i nápojích [1, 2].

## 1 TEORETICKÁ ČÁST

### 1.1 Dusičnany a dusitany jako aditivní látky

Dusičnany a dusitany patří mezi potravinářské aditivní látky. Potravinářská aditiva neboli přídatné látky jsou takové sloučeniny nebo jejich směsi, které se k potravině záměrně přidávají při výrobě, zpracování, skladování nebo balení za účelem zvýšení její kvality (prodloužení údržnosti, zlepšení vůně, chuti, barvy, textury, výživové hodnoty, technologických vlastností aj.). Mohou být i přirozenou součástí potraviny. Jako potravina se nepoužívají samostatně, mohou i nemusí mít výživovou hodnotu. Nejčastěji se podle účelu používání rozeznává šest hlavních skupin aditivních látek - látky prodlužující údržnost, upravující aroma, upravující barvu, upravující texturu, zvyšující biologickou hodnotu a další aktivní látky.

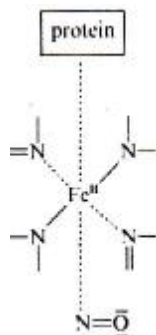
Dusičnany a dusitany se řadí do skupiny látek prodlužujících údržnost. V této kategorii se rozlišují dvě základní skupiny látek prodlužujících údržnost potravin a to antimikrobní látky, konzervační prostředky neboli konzervanty používané k ochraně proti nežádoucím mikroorganismům a antioxidanty, které jsou ochranou některých složek potravin (zejména lipidů a vitaminů) před oxidací.

Dusitany a dusičnany (E249-E252) mají antimikrobní účinky, a to zvláště při použití spolu se solí (chloridem sodným). Chlorid sodný je dnes v potravinářství běžně používán v kombinaci s dalšími konzervačními prostředky a metodami konzervace, ale za aditivní látku se nepovažuje. Antimikrobní aktivita chloridu sodného souvisí s jeho schopností snižovat aktivitu vody a vytvářet tak nepříznivé podmínky pro růst mikroorganismů (podobně působí sacharóza). Citlivost mikroorganismů se značně liší. Intolerantní bakterie mohou být inhibovány již množstvím  $10 \text{ g.kg}^{-1}$ , mesofilní a psychofilní gramnegativní tyčinky tolerují koncentrace 6-10 krát vyšší. Mléčné bakterie přežívají i v prostředí, kde je koncentrace chloridu sodného 60-150  $\text{g.kg}^{-1}$ . Sporulující bakterie dokonce tolerují koncentrace 160  $\text{g.kg}^{-1}$ . Dusičnany a dusitany mají proto význam u nesterilních masných výrobků, neboť inhibují růst bakterií *Clostridium botulinum*, které produkují botulotoxin, jež je mimořádně toxický. Známý jsou různé typy těchto neurotoxinů označované A, B, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>, D, E, F a G. Pro člověka jsou zvláště toxické typy A, B, E a F (v Evropě se setkáváme nejčastěji s typem B). K produkci botulotoxinů dochází za anaerobních podmínek, optimální podmínky pro jejich



tvorbu jsou při pH 4,8-8,5 a teplotě okolo 30°C (k tvorbě toxinů dochází i při nižších teplotách) [1]. Nejúčinnější jsou dusitanové aniony v prostředí o pH 5,0 až 5,5. Přesný mechanismus jejich působení není dosud znám. Předpokládá se, že interagují s thiolovými skupinami za vzniku produktu, který není metabolizován za anaerobních podmínek[4].

Dusičnany (E 252, salnitr) a dusitany (E 250) mají použití také jako antioxidanty u masných výrobků[3]. Při zahřívání masa na teplotu kolem 70 až 80 °C již reaguje myoglobin (a zároveň i hemoglobin) nejprve s produkty Maillardovy reakce, denaturuje a hydrolyzuje se na hem, resp. hematin. Původně červené maso se tedy po tepelné denaturaci mění na červenohnědé až šedohnědé. Těmto nežádoucím změnám lze nejen v průmyslové, ale i kulinářské praxi zabránit přísadou jedlé soli, alkalických dusitanů a dusičnanů. Samotný účinek soli na vybarvení masa není zvláště výrazný. Dusičnany a dusitany se redukují za vzniku oxidu dusnatého, který se váže na hem – tak jako i některé jiné plyny – semipolární vazbou a vytváří červeně zbarvený, poměrně stálý nitrosomyoglobin (obr. 1)



Obr.1 Nitrosomyoglobin [4].

Při vyšších teplotách dochází k denaturaci globinové složky nitrosomyoglobinu za vzniku červeně zbarveného nitrosomyochromogenu, který je velmi stálý a dodává masným výrobkům jejich typickou barvu. Teprve dlouhodobým skladováním za přístupu vzduchu a především světla se oxidačními pochody postupně odbourává. Pokud se při výrobě používají dusičnany (pouze při nakládání masa do láků), redukují se nejprve na dusitany (mikrobiální cestou v láku), které potom reagují výše uvedeným způsobem. Při použití dusitanů (nebo po redukcii dusičnanů na dusitany) je nutno ještě upozornit na skutečnost, že v první fázi je dusitan redukován za účasti myoglobinu na oxid dusnatý, přičemž se myoglobin oxiduje na

metmyoglobin. Tímto způsobem se část barviva převádí do nežádoucí oxidované formy. Proto se při této redukci uplatňují i jiná redukční činidla, především L-askorbová kyselina, metmyoglobin se pak redukuje zpět na myoglobin, čímž se zvyšuje množství barviva schopného tvořit stabilní nitrosomyoglobin[2]. Přídavek dusitanů ovlivňuje typickou chutnost „naložených masných výrobků“. Aroma je ovlivněno i tím, že dusitan v masných výrobcích působí proti oxidaci tuků. Přispívají k údržnosti (zamezují růstu klostridií, bacilů, salmonel, enterobakterií a tvorbě botulotoxinu). Brzdění enterobakterií má význam u balených mělněných salámů a jemně mělněných fermentovaných salámů. Snižování koncentrace dusitanů se proto může projevit ve zvýšení rizika alimentárních intoxikací způsobených enterobakteriemi. Obsah v některých salámech se pohybuje v rozmezí 20 – 40 ppm a pocházejí též z koření, zeleniny a pitné vody. V souvislosti s nebezpečím tvorby nitrosaminů se hledaly cesty, jak dosáhnout dobrého vybarvení bez použití dusitanů. Jako náhradní barviva byla navržena řada přírodních: betanin (hlavní zástupce betalainů tj. barviv červené řepy), košenila, řýže fermentovaná plísní *Monascus* (v poslední době u nás často používaná), aj. [5].

Přítomnost přídatných látek musí být uvedena na obalu (v sestupném pořadí podle klesajícího množství) názvem nebo číslem (kódem E systému evropské unie), v některých případech s údaji o možnosti nepříznivého ovlivnění zdraví člověka.

Druh a množství aditivních látek, které se smějí v potravinách vyskytovat, podmínky používání a označování jejich přítomnosti na obalech stanovují příslušné legislativní materiály [3]. Chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné stanovuje Vyhláška č. 298/1997 Sb. Ministerstva zdravotnictví ze dne 28. listopadu 1997.

Tato vyhláška stanovuje množství a druhy potravních doplňků, látek přídatných, kontaminujících, toxikologicky významných, určených k aromatizaci, pomocných a zbytků veterinárních léčiv a biologicky aktivních látek používaných v živočišné výrobě, které se smějí vyskytovat v potravinách a potravinových surovinách, podmínky jejich použití, potraviny a potravinové suroviny, v nichž se mohou tyto látky vyskytovat, a jejich označování na obalech. Dále tato vyhláška stanoví požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a

mikrobiologické požadavky na přídatné látky a potravní doplňky.

Tam, kde je vyznačeno použití dusitanů, je povoleno použití těchto látek:

E 249 dusitan draselný

E 250 dusitan sodný

Pro použití je zvlášť uvedeno nejvyšší povolené dávkování (mg.kg) a zvlášť nejvyšší povolené reziduální množství (mg.kg), v obou případech počítáno jako dusitan sodný (tab. 1).

Výše uvedené látky smějí být prodávány a používány k výrobě potravin pouze ve směsi se solí, nebo s náhradou solí, a to s obsahem nejvýše 0,9 % dusitanu sodného, jsou-li určeny pro hromadnou výrobu potravin nebo nejvýše 0,35 %, jsou-li určeny pro použití v domácnostech.

Tam, kde je vyznačeno použití dusičnanů, je povoleno použití těchto látek:

E 251 dusičnan sodný

E 252 dusičnan draselný

Při použití je zvlášť uvedeno nejvyšší povolené dávkování (mg/kg), počítáno jako dusičnan sodný a zvlášť nejvyšší povolené reziduální množství, počítáno jako dusičnan sodný a nebo jako dusitan sodný (tab. 1) [6].

Tabulka 1. Povolené dávkování dusičnanů a dusitanů v masných výrobcích [6]

Číslo E	Látka	Název potraviny	Povolené dávkování mg.kg <sup>-1</sup>	Povolená rezidua mg.kg <sup>-1</sup>
E 249 E 250	Dusitan sodný	tepelně neopracované, uzené, sušené masné výrobky	150	50
		ostatní masné výrobky a masné výrobky v konzervových plechovkách	150	100
		uzená anglická slanina	Nestanoví se	175
E 251 E 252	Dusičnan sodný	masné výrobky a masné výrobky v konzervových plechovkách	300	250 reziduální dusičnany, počítáno jako NaNO <sub>3</sub>
		tvrdé a polotvrdé sýry a jejich analogy na bázi rostlinného tuku a rostlinné bílkoviny	Nestanoví se	50 počítáno jako NaNO <sub>3</sub>
		uzení a solení sledi a šproty	Nestanoví se	200 reziduální dusitany, počítáno jako NaNO <sub>2</sub>

Dalším legislativním opatřením při používání dusičnanu a dusitanů je vyhláška Ministerstva zdravotnictví 53/2002 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků.

Tato vyhláška stanoví množství a druhy látek přídatných, pomocných a potravních doplňků, které se smějí vyskytovat v potravinách a potravinových surovinách, podmínky jejich použití, potraviny a potravinové suroviny, v nichž se mohou tyto látky vyskytovat. Dále tato vyhláška stanoví přípustná množství látek kontaminujících, které smějí potraviny a potravinářské suroviny obsahovat. Množství dusičnanů je zde stanoveno jako dusičnanový iont NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Pro výrobky ze zeleniny, sterilované, nakládané, zmrazené, kysané a pro zeleninové šťávy a dále pro výrobky z ovoce a ovocné šťávy platí přípustná množství jako pro výchozí základní suroviny [7].

Zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek stanovuje vyhláška Ministerstva zdravotnictví 54/2002 Sb.

Požadavky na identitu a čistotu přídatných látek jiných než barviva a sladidla jsou uvedeny v tabulkách 2-5 [8].

Tabulka 2. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusitanu draselného (E 249) [8]

<b>249 Dusitan draselný</b>	
<b>Definice</b>	
Chemický název	Dusitan draselný
Einecs	231-832-4
Kód E	E 249
Chemický vzorec	$\text{KNO}_2$
Molekulová hmotnost	85,11
Obsah	Ne méně než 95 % ve vysušeném stavu <sup>(1)</sup>
Popis	Bílé nebo slabě nažloutlé rozplývavé granule
<b>Identifikace</b>	
A. Pozitivní test na přítomnost dusitanu a draslíku	
B. pH 5% vodného roztoku	6,0 až 9,0
<b>Čistota</b>	
Úbytek hmotnosti sušením	Ne více než 3 % čtyřhodinovým sušením nad silikagelem
Arsen	Ne více než 3 mg/kg
Olovo	Ne více než 5 mg/kg
Rtuť	Ne více než 1 mg/kg
Těžké kovy jako (Pb)	Ne více než 10 mg/kg
<sup>(1)</sup> Dusitan, který je označen jako „ pro potravinářské účely“, smí být prodáván pouze ve směsi s jedlou solí nebo její náhražkou.	

Tabulka 3. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusitanu sodného (E 250)

<b>250 Dusitan sodný</b>	
<b>Definice</b>	
Chemický název	Dusitan sodný
Einecs	231-555-9
Kód E	E 250
Chemický vzorec	$\text{NaNO}_2$
Molekulová hmotnost	69,00
Obsah	Ne méně než 97 % ve vysušeném stavu <sup>(1)</sup>
Popis	Bílý krystalický prášek nebo nažloutlé hrudky
<b>Identifikace</b>	
A. Pozitivní test na přítomnost dusitanu a draslíku	
<b>Čistota</b>	
Úbytek hmotnosti sušením	Ne více než 0,25 % čtyřhodinovým sušením nad silikagelem
Arsen	Ne více než 3 mg/kg
Olovo	Ne více než 5 mg/kg
Rtuť	Ne více než 1 mg/kg
Těžké kovy jako (Pb)	Ne více než 10 mg/kg
<sup>(1)</sup> Dusitan, který je označen jako „ pro potravinářské účely“, smí být prodáván pouze ve směsi s jedlou solí nebo její náhražkou.	

Tabulka 4. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusičnanu sodného (E 251)

<b>251 Dusičnan sodný</b>	
Synonyma	Chilský ledek
<b>Definice</b>	
Chemický název	Dusičnan sodný
Einecs	231-554-3
Kód E	E 251
Chemický vzorec	$\text{NaNO}_3$
Molekulová hmotnost	85,00
Obsah	Ne méně než 99 % (čtyřhodinovým sušením při 105 °C)
Popis	Bílý, slabě hygroskopický krystalický prášek
<b>Identifikace</b>	
A. Pozitivní test na přítomnost dusitanu a draslíku	
B. pH 5% vodného roztoku	5,5 až 8,3
C. Bod tání	$\pm 308$ °C
Čistota	
Úbytek hmotnosti sušením	Ne více než 2 % (čtyřhodinovým sušením při 105 °C)
Dusitany	Ne více než 30 mg/kg (jako $\text{NaNO}_2$ )
Arsen	Ne více než 3 mg/kg
Olovo	Ne více než 5 mg/kg
Rtuť	Ne více než 1 mg/kg
Těžké kovy jako (Pb)	Ne více než 10 mg/kg

Tabulka 5. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusičnanu draselného (E 252)

<b>252 Dusičnan draselný</b>	
Synonyma	Chilský ledek
<b>Definice</b>	
Chemický název	Dusičnan sodný
Einecs	231-818-8
Kód E	E 252
Chemický vzorec	$\text{KNO}_3$
Molekulová hmotnost	101,11
Obsah	Ne méně než 99 % ve vysušeném stavu
Popis	Bílý krystalický prášek nebo průhledné krystaly, mající chladivě slanou, štiplavou chuť
<b>Identifikace</b>	
A. Pozitivní test na přítomnost dusitanu a draslíku	
B. pH 5% vodného roztoku	4,5 až 8,5
Čistota	
Úbytek hmotnosti sušením	Ne více než 1 % (čtyřhodinovým sušením při 105 °C)
Dusitany	Ne více než 20 mg/kg (jako $\text{KNO}_2$ )
Arsen	Ne více než 3 mg/kg
Olovo	Ne více než 5 mg/kg
Rtuť	Ne více než 1 mg/kg
Těžké kovy jako (Pb)	Ne více než 10 mg/kg

Druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin stanovuje vyhláška č. 304/2004 Sb. Dusitan draselný a dusitan sodný smějí být prodávány a používány k výrobě potravin pouze ve směsi se solí nebo s náhradou soli. V tabulce 6 jsou uvedeny potraviny, ve kterých je možno použít dusitany a dusičnany až do výše nejvyššího povoleného množství.



Tabulka 6. Povolené dávkování dusičnanů a dusitanů v masných výrobcích [9].

Číslo E	Látka	Název potraviny	Povolené dávkování mg.kg <sup>-1</sup>	Povolená rezidua mg.kg <sup>-1</sup>
E 249	dusitan draselný	masné výrobky tepelně nepracované, nasolené či naložené do solící směsi, sušené	150 jako-NaNO <sub>2</sub>	50 jakoNa-NO <sub>2</sub>
E 250	dusitan sodný	ostatní masné výrobky nasolené či naložené do solící směsi a masné konzervy husí játra “foie gras entier, blues de foie gras“	150 jako-NaNO <sub>2</sub>	100 jako-NaNO <sub>2</sub>
		uzená anglická slanina	Nestanoví se	175 jako-NaNO <sub>2</sub>
E 251	dusičnan sodný	masné výrobky nasolené či naložené do solící směsi a masné konzervy	300	250 jako-NaNO <sub>3</sub>
E 252	dusičnan draselný	tvrdé, polotvrdé a poloměkké sýry a jejich analogy na bázi mléka	Nestanoví se	50 jakoNa-NO <sub>3</sub>
		uzení a solení sledi a šproty	Nestanoví se	200 jako-NaNO <sub>3</sub>
		husí játra “foie gras entier, blues de foie gras“	Nestanoví se	50 jakoNa-NO <sub>3</sub>

Výhodou používání aditivních látek jsou bezesporu v řadě případů toxikologicky bezpečnější a výživově bezpečnější potraviny. Používání konzervantů je prevencí intoxikací bakteriálního a plísňového původu. Používání antioxidantů zabraňuje vzniku potenciálně toxických produktů autooxidace, vzniku různých přípachů a pachutí, a to při zachování vyšší výživové hodnoty, která souvisí s obsahem snadno se oxidujících vitaminů.

Prospěšnost používání aditiv je ovšem vyvážena také některými riziky. Rizika provázející dlouhodobé používání aditivních látek nejsou doložena, přesto je používání některých aditiv potenciálně problematické a hledají se způsoby jejich náhrady (např. dusitanů, sacharinu aj.).

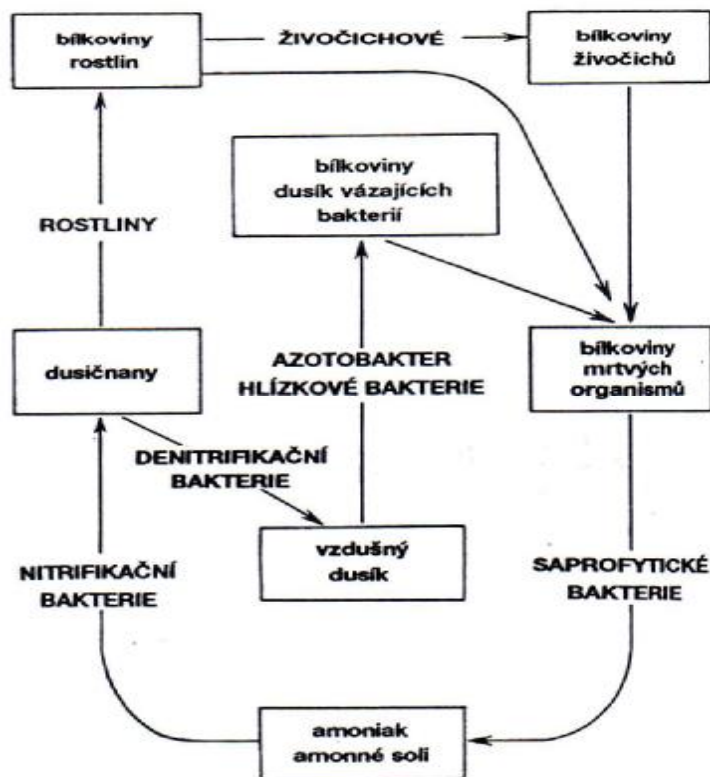
Důležité je průběžné hodnocení možných rizik s ohledem na nové poznatky z oblasti toxikologie [3].

## 1.2 Dusičnany a dusitany jako toxické látky

Jedním z ukazatelů hygienicko-toxické jakosti potravin je obsah toxických minerálních látek.

Toxické účinky na lidský organismus vykazují kromě těžkých kovů také některé aniony, zejména dusičnany a dusitany, pokud se v potravinách vyskytují ve větším množství.

Dusičnany a dusitany jsou přirozenou složkou životního prostředí a podílejí se na koloběhu dusíku v přírodě. V rámci tohoto koloběhu se rozkladem bílkovin a jiných dusíkatých látek živých organismů uvolňuje amoniak. Nitrifikační bakterie oxidují amoniak na dusitany a ty se dále oxidují na dusičnany. Denitrifikační bakterie z dusičnanů uvolňují dusík, který se znovu vrací do atmosféry [3] obr.2 [10].



Obr.2 Schéma zapojení bakterií do koloběhu dusíku v přírodě

Do půdy se dusík dostává z posklizňových zbytků, ze zeleného hnojení, stájového hnoje, průmyslových hnojiv (amonných solí a dusičnanů). V půdě se dusík vyskytuje především ve formě amonných solí a dusičnanů. Amonné ionty se v půdě zadržují sorpčními schopnostmi půdy, dusičnanový dusík se naopak z půdy lehce vyplavuje a může kontaminovat vodu. Z půdy přecházejí dusičnany do rostlin a odtud do lidské stravy. Vysokým hnojením dochází k zvýšení obsahu těchto látek v půdě a tím i v potravinových surovinách a potravinách [3].

### 1.2.1 Výskyt

Dusičnany a dusitany se jako součást koloběhu dusíku v přírodě vyskytují v mnoha potravinách rostlinného a živočišného původu. Do potravin rostlinného původu se dostávají z půdy, do potravin živočišného původu z krmiv a dále ovšem také jako látky aditivní [3].

#### 1.2.1.1 Potraviny rostlinné původu

Obsah dusičnanů v rostlinách je silně ovlivňován prostředím. V rostlinách se dusičnany akumulují v době, kdy dusík nemůže být rostlinou využíván, tedy v době, kdy rostlina neredukují dusičnany na snadněji asimilovatelné formy amonných solí. K takovým stavům dochází především nepříznivými teplotními, vlhkostními a světelnými podmínkami, které zapříčiňují nedostatek uhlíkatých sloučenin nezbytný pro přeměnu nahromaděných dusičnanů na aminokyseliny a v konečné fázi na bílkoviny.

Hlavními zdroji dusičnanů je zelenina a brambory. Jednotlivé druhy akumulují dusičnany v různém množství, podle schopnosti akumulovat dusičnany lze zeleniny a okopaniny rozdělit do tří skupin, a to na materiály s vysokým obsahem dusičnanů (nad 1000 mg.kg<sup>-1</sup>), kam náleží salát, endivie, špenát, mangold, pekingské zelí, ředkev, ředkvička, celer, reveň, kukuřice cukrová, se středním obsahem dusičnanů (250-1000 mg.kg<sup>-1</sup>), kam patří zelí, kapusta, květák, lilek, petržel, mrkev, brokolice, česnek, brambory a s nízkým obsahem dusičnanů (pod 250 mg.kg<sup>-1</sup>) kam se řadí růžičková kapusta, cibule, rajčata, hrách, artyčoky, chřest, okurky.

Obsah dusičnanů v zeleninách a bramborech uvádí tabulka 7. V jednotlivých plodinách však obsah dusičnanů kolísá v širokém rozmezí (až stovek procent), což je způsobeno klimatickými a půdními podmínkami během vegetace (intenzitou osvětlení, množstvím srážek a především intenzitou hnojení). V ovoci jsou dusičnany přítomny ve srovnání se zeleninou

v zanedbatelném množství. Pouze v melounech, jahodách a banánech mohou být koncentrace poněkud vyšší, zhruba kolem  $800 \text{ mg.kg}^{-1}$  [3].

Tabulka 7. Obsah dusičnanů ve významných zeleninách a bramborách [3]

Zelenina	Obsah $\text{NO}_3^-$ [ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]	
	minimální	maximální
celer	0	3640
cibule	0	1435
česnek	44	2400
fazole	14	717
hrách	10	58
kapusta hlávková	0	3192
kedlubny	80	4380
květák	0	2685
lilek (baklažán)	71	960
meloun	0	340
mrkev	0	3337
okurky	0	490
paprika	4	330
petržel	0	5400
pór	30	2159
rajčata	0	136
reveň	300	2525
ředkvička	390	5200
řepa červená	45	4700
salát hlávkový	60	6600
špenát	20	4500
zelí hlávkové	0	3230
brambory	0	2795

Legislativa určuje nejvyšší přípustná množství nebo speciální množství pro dusitany a dusičnany. Přípustné hodnoty obsahu dusičnanů pro jednotlivé potraviny jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8. Maximální hodnoty obsahu dusičnanů v potravinách v mg.kg<sup>-1</sup> [3]

Potravina	NPM	PM	SM
Dětská a kojenecká výživa na bázi mléka			15
Zeleniny listové	1000		
Zeleniny plodové		400	
Zeleniny luskové		400	
Zeleniny kořenové		700	300
Zeleniny košťálové		700	300
Špenát	2500		
Špenát (měsíc XI-III)	3000		
Salát polní a salát rychlený (měsíc IV-IX)	2500		
Salát skleníkový (měsíc X-III)	3500		
Melouny, tykve		700	
Ředkvičky	1500		
Brukev rychlená	1500		
Řepa červená	3000		
Brambory		300	
Brambory ranné (do 15. 7.)		500	
Ovoce bobulové			150
Ovoce jádrové			100
Banány		600	300
Dětská a kojenecká výživa na bázi zeleniny a banánů po 4. měsíci věku			200
Dětská a kojenecká výživa na bázi ovoce po 4. měsíci věku			70
Nealkoholické nápoje		70	
Pivo		70	
Potraviny obecně A		200	
Potraviny obecně B		2000	

NPM = nejvyšší přípustné množství

PM = přípustné množství

SM = speciální množství pro potraviny a skupinu potravin

Chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků stanovuje vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 233/2002 Sb. [12].

Nařízení Komise (ES) č. 466/2001, naposledy pozměněné nařízením (ES) č. 472/2002, je použitelné ode dne 5. dubna 2002 a nahrazuje nařízení Komise (ES) č. 194/97 ze dne 31. ledna 1997, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, ve znění zejména nařízení (ES) č. 864/1999, kterým se stanoví maximální limity dusičnanů v hlávkovém salátu a špenátu. Z ročních údajů z monitorování vyplývá, že se obsah dusičnanů v hlávkovém salátu snižuje. Správnou výrobní praxí lze u určitých kategorií hlávkového salátu za rozumných nákladů dosáhnout dodržení nižších maximálních limitů. Z některých regionů je často hlášen vyšší obsah dusičnanů než obsah stanovený v příloze nařízení (ES) č. 466/2001, přestože obecný trend směřuje ke snižování obsahu dusičnanů v hlávkovém salátu. Obsah dusičnanů ve špenátu nevykazuje žádnou snižující se tendenci. Některé členské státy potřebují zachovat stanovené přechodné období, aby mohly povolit uvádění hlávkového salátu nebo špenátu určeného pro spotřebu na jejich území na domácí trh. U hlávkového salátu by mělo být toto přechodné období časově omezeno, u špenátu se jeho ukončení dosud nepředpokládá [13].

#### ***1.2.1.2 Potraviny živočišného původu***

Přirozený obsah dusičnanů v živočišných tkáních je ve srovnání s rostlinnými pletivy (kde jsou přirozenou živinou) velmi nízký. Výjimku tvoří pouze potraviny (např. šunka a některé uzeniny), při jejichž výrobě byly dusičnany nebo dusitany použity jako látky aditivní [3]. V ČR je povoleno přidávat do masných výrobků takové množství dusitanů, aby jejich reziduální obsah ve výrobě nepřekročil  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  a pro dusičnany je reziduální obsah povolen na úrovni  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Zároveň je povoleno přidávat dusitany ve formě dusitanové solící směsi (označované jako Pragma), obsahuje obvykle 0,5 – 0,6 % dusitanu sodného. Dusičnany se přidávají ve formě směsí se solí. Vlastní toxicita dusitanů vedla v celém světě k omezení přídatku dusičnanů a dusitanů [5].

### 1.2.1.3 Voda

Dusičnany se vyskytují ve všech typech vod. V čistých přírodních vodách (podzemních i povrchových) jsou obvykle v malých koncentracích (řádově jednotky  $\text{mg.l}^{-1}$  jako ionty  $\text{NO}_3^-$ ), v přírodních vodách ze zemědělských oblastí jsou v dnešní době ve větších koncentracích (řádově desítky  $\text{mg.l}^{-1}$  jako ionty  $\text{NO}_3^-$ ). Také odtoky z biologických čistíren odpadních vod i některé průmyslové odpadní vody obsahují dusičnany rovněž ve vyšších koncentracích (řádově desítky  $\text{mg.l}^{-1}$  jako ionty  $\text{NO}_3^-$ ). Protože dusičnany jsou konečným produktem biochemické oxidace organicky vázaného dusíku, může být jejich větší koncentrace v přírodních (hlavně v podzemních) vodách důkazem staršího znečištění organického původu. Dusičnany jsou primárně ve vodě pro člověka málo závadné, ale sekundárně (po bakteriální redukci v gastrointestinálním traktu) jako dusitany mohou být příčinou dusičnanové alimentární methemoglobinemie [14, 15]. Proto norma [16] připouští nejvyšší koncentraci iontů  $\text{NO}_3^-$  v pitné vodě  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  a uvádí, že tato hodnota přesahuje obsah dusičnanů, při níž smí být voda používáno pro kojence. V povrchových vodách souvisí obsah dusičnanů se stupněm eutrofizace a patří mezi zvláštní ukazatele chemického složení povrchových vod, podle nichž se povrchové vody řadí to tříd čistoty [17]. Eutrofizace je termín spojený s trofíí vody, tj. úživností vody. Existuje několik stupňů trofie vody v závislosti na obsahu živin. Je-li voda silně eutrofní pak v důsledku nadměrného obsahu živin dochází za vhodných podmínek (světlo a teplo) k masovému rozvoji zelených rostlin a fytoplanktonu. Projevem je pak takzvaný vodní květ. Nejvíce jsou ohroženy vodní nádrže a pomalu tekoucí vodoteče. Díky eutrofizaci dochází k ohrožení vodního ekosystému nádrže, může dojít k jeho zhroucení s následným úhynem organismu. Při vypouštění odpadních vod do povrchových patří rovněž obsah dusičnanů k závazným ukazatelům [18].

Dusitany bývají obsaženy ve všech typech vod. Koncentrace dusitanů v podzemních a povrchových vodách je však z pravidla velmi malá (řádově setiny a desetiny  $\text{mg.l}^{-1}$ ), v odpadních splaškových vodách poměrně větší (řádově jednotky až desítky  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Jako předchozí člen v cyklu dusíku vznikají dusitany ve vodách zpravidla při biochemické oxidaci amoniakálního dusíku. Z toho důvodu patří dusitany (podobně jako amoniakální N) mezi významné indikátory fekálního znečištění přírodních vod. Norma [17] připouští maximálně  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  dusitanů v pitné vodě. Indikátorovou hodnotu dusitany ztrácejí, jestliže jsou

anorganického původu. Dusitany mohou totiž vznikat ve vodách i chemickou redukcí dusičnanů s kovy, např. v podzemních vodách obsahujících Fe, Mn nebo ve vodách stagnujících v kovovém potrubí. Dusitany mohou ve vodách vznikat z dusičnanů také fotochemickou cestou. Proto je důležité posuzovat indikátorovou hodnotu v pitné vodě komplexně, tj. v souvislosti s mikrobiologickým rozbohem, místním ohledáním terénu v okolí analyzované vody a obsahem dalších indikátorů fekálního znečištění. Dusitany jsou však samy o sobě v pitné vodě zdravotně závadné protože způsobují methemoglobinemii [19].

Hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu, četnost a rozsah kontroly pitné vody stanovuje vyhláška č. 252/2004 Sb. [20], která udává limitní obsahy dusičnanů a dusitanů v pitné vodě (tab. 9).

Tabulka 9. Limitní chemické ukazatele – dusičnany, dusitany [20]

č.	ukazatel	symbol	jednotka	limit	typ limitu
23	dusičnany	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/l	50	NMH
24	dusitany	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/l	0,50	NMH

NMH – nejvyšší mezní hodnota

Musí být dodržena podmínka, aby součet poměrů zjištěného obsahu dusičnanů v mg/l děleného 50 a zjištěného obsahu dusitanů v mg/l děleného 3 byl menší nebo rovný 1. Součet poměrů odpovídá svým významem nejvyšší mezní hodnotě. Obsah dusitanů v pitné vodě na výstupu z úpravny musí být nižší než 0,1 mg/l [20].

Cílem Směrnice Rady 91/676/EEC, o ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů (nitrátová směrnice), je snížit znečištění vod způsobené dusičnany ze zemědělských zdrojů a předcházet dalšímu takovému znečištění. Je to nutné nejen pro zajištění dostatek kvalitní pitné vody, ale i z důvodu omezení eutrofizace povrchových vod a moří. Směrnice definuje pravidla pro vymezení zranitelných oblastí a stanovuje nástroje ke snížení znečištění dusičnany, jimiž jsou zásady správné zemědělské praxe zaměřené na ochranu vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů a akční programy, stanovující účinná opatření v konkrétních zranitelných oblastech [21].



### 1.3 Toxikologické hodnocení dusičnanů a dusitanů

Dusičnany nejsou v běžných koncentracích pro dospělé jedince nebezpečné, neboť se relativně rychle vylučují močí. Hodnota ADI byla stanovena na  $3,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Hodnota pro přípustný denní příjem ADI, je množství toxické látky (vyjádřené na 1 kg tělesné hmotnosti), které může být v potravinách konzumováno bez jakéhokoli rizika denně a po celý život. ADI je podílem hodnoty NOAEL (neúčinná koncentrace toxické látky v mg na 1 kg tělesné hmotnosti) a bezpečnostního faktoru SF (běžně hodnota 100, u toxicky závažných účinků toxických látek se zvyšuje na 200 – 1000) [11].

Potenciální toxicita dusičnanu v potravinách však vyplývá z možnosti jejich redukce na dusitany. Enzymově se dusičnany částečně redukují nitrátreduktasou přítomných mikroorganismů během dopravy, skladování a zpracování rostlinných surovin s vyšším obsahem dusičnanů.

Endogenně vznikají dusitany v trávicím ústrojí působením mikroorganismů. Dusičnany přijaté potravou se asi z 80% (u starších lidí z 50%) vylučují za 4 až 12 hodin močí, zbytek zůstává v organismu. Předpokládá se, že se v zažívacím traktu zbylé dusičnany převážně přemění na amonné soli.

Toxický účinek dusitanů po jejich vstřebání do krve spočívá v možnosti vyvolání methemoglobinémie. Vnější projevem methemoglobinémie je šedomodré až modrofialové zbarvení sliznic, pokožky a okrajových částí těla. Prvé symptomy se objevují při koncentraci 6-7 % methemoglobinu v krvi. Její příčinou je oxidace červeného hemoglobin (obsahuje  $\text{Fe}^{2+}$ ) na tmavě hnědý methemoglobin (obsahuje  $\text{Fe}^{3+}$ ), který není schopen přenášet kyslík. Pokud je větší podíl hemoglobinu trvale oxidován, dochází ke smrti jedince [5]. Za normálního fyziologického stavu činí množství methemoglobinu asi 2 %. Reduktasa červených krvinek dospělého člověka převádí zpět vzniklý methemoglobin na hemoglobin. Dusitany jsou nebezpečné především u kojenců ve stáří prvních 2-4 měsíců života.

V tomto období kojenci nemají dostatečně vyvinutý příslušný enzymový systém. Plodový hemoglobin (označovaný F hemoglobin, u novorozenců tvoří asi 85 % veškerého hemoglobinu) se snadněji oxiduje dusitany než hemoglobin dospělých (hemoglobin A). V žaludku kojenců je navíc nižší koncentrace kyseliny (vyšší pH), proto se zde mohou vyskytovat a množit i nepatogenní mikroorganismy, které redukují přijaté dusičnany na dusitany dříve než

se dusičnany stačí resorbovat. Z těchto důvodů je obsah dusičnanů a dusitanů přítomných v kojenecké vodě a stravě určené pro dětskou výživu limitován

Dusičnany se rovněž částečně dostávají do slinných žláz, kde se koncentrují a zpětně dostávají do ústní dutiny. Endogenní redukce na dusitany probíhá již v ústní dutině, a to jak u dětí, tak i u dospělých. Takto se tvoří až 65 % celkového obsahu dusitanů. Letální dávka dusitanů pro člověka je  $32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , hodnota ADI =  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Expozici dusitanů se přičítá řada onemocnění u lidí i zvířat. Hlavním negativním projevem konzumace dusitanů je zřejmě možnost indukce nádorového bujení přímým působením na lymfocyty a nepřímo tvorbou toxických nitrosaminů [3]. Od roku 1956, kdy byla prokázána karcinogenita N-nitrosaminů, je této skupině kontaminantů věnována zvýšená pozornost.

Nitrososloučeniny vznikají z různých organických sloučenin působením nitrosačních činidel. Do potravin se nitrosační činidla mohou dostávat během technologického zpracování jako potravinářská aditiva ve formě prekurzorů (např. jako dusitany nebo dusičnany), jako kontaminanty (např. dusičnany) nebo sušením potravin přímým ohřevem z kouře, který obsahuje oxidy dusíku.

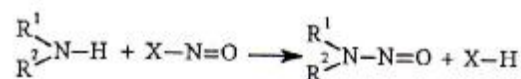
Všechny nitrososloučeniny obsahují v molekule nitrososkupinu  $-\text{N}=\text{O}$ . Nejrozšířenějšími nitrososloučeninami jsou N-nitrososloučeniny. N-nitrososloučeniny zahrnují N-nitrosaminy, které jsou odvozené od sekundárních aminů a N-nitrosamidy odvozené od N-substituovaných amidů karboxylových kyselin.

Nitrosaminy vznikají nitrosací sekundárních aminů (obr. 3) a jako nestálé meziprodukty figurují i při nitrosaci primárních a terciárních aminů a kvartérních amoniových solí v kyselém prostředí. Účinkem kyseliny dusité v přítomnosti minerální kyseliny vznikají ze sekundárních a také z primárních a terciárních alifatických aminů pouze jejich dusitany (nitrity).

V potravinách získaných kvašením se dusitany také tvoří redukcí dusičnanů. V pivu se např. uplatňují divoké kvasinky, které asimilují nitráty na amoniak. Působením nitrátoreduktasy vznikají dusitany a ty se dále redukují na amoniak působením nitritoreduktasy.

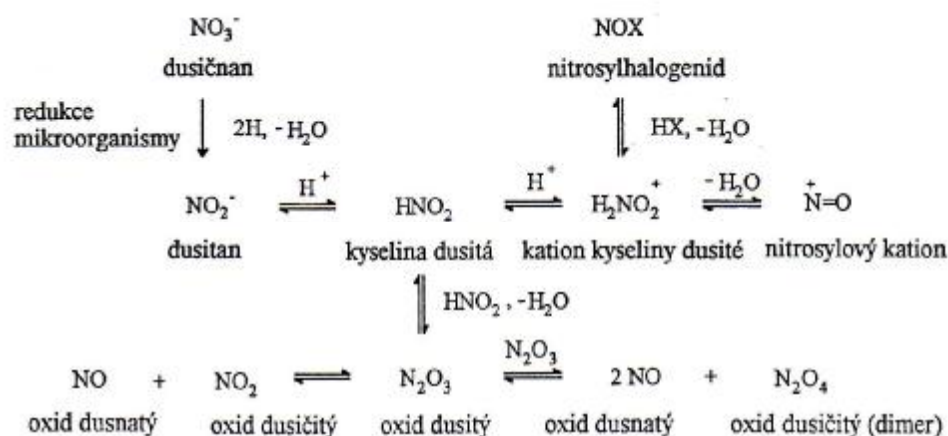
Dusičnany na dusitany redukují také některé kontaminující (denitrifikační) bakterie. Dusitany jsou dále redukovány na oxid dusnatý nebo dusný působením cytochrom-*cd*<sub>1</sub>-

nitritreduktasy, oxid dusnatý je redukován na oxid dusný a další redukcí působením příslušných reductás vzniká z oxidu dusného dusík [3].



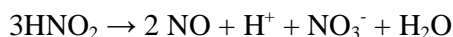
Obr. 3 Obecný mechanismus nitrosace sekundárních aminů

Nitrosační činidla vznikají v kyselém prostředí z kyseliny dusité, resp. z dusitanů přítomných v potravinách jako aditiva nebo kontaminanty, sledem reakcí uvedených na obr. 4. [3].



Obr. 4 Vznik nitrosačních činidel v kyselém prostředí

Relativní poměr nitrosačních činidel závisí na pH prostředí. V prostředí o  $\text{pH} < 2$  je převládajícím nitrosačním činidlem kation  $\text{H}_2\text{NO}_2^+$ , resp.  $\text{NO}^+$ , při  $\text{pH} > 3$  je hlavním nitrosačním činidlem oxid dusitý. Oxid dusitý se snadno rozkládá na oxid dusnatý a na oxid dusičitý nebo jeho dimer. Oxid dusnatý spolu s dusičnany vzniká také disproportionací kyseliny dusité:



N- nitrosaminy byly prokázány v řadě potravin. Největší pozornost byla věnována jejich výskytu v uzených masech, sýrech (především uzených), odtučněném sušeném mléce, rybách, pivě a alkoholických nápojích, především ve whisky.

Vhodnými technologickými úpravami byl obsah nitrosaninů především u piva (změnou technologie sušení sladu) podstatným způsobem snížen. Možnost vzniku nitrosaminů a jejich koncentrace v poživatinách závisí na řadě faktorů jako jsou přítomnost a množství příslušných aminosloučenin a jejich prekurzorů, druh a množství nitrídačních činidel, pH prostředí, teplota a doba reakce, složení potraviny, atd. [3].

Obsah nitrosaminů v poživatinách je s ohledem na jejich toxicitu regulován. Nejvyšší přípustná množství pro jednotlivé potraviny jsou uvedena pro N-nitrosodimethylamin a pro celkový obsah nitrosaminů. Celkový obsah nitrosaminů je stanoven na 0,0015 mg.kg<sup>-1</sup> pro pivo, 0,002 mg.kg<sup>-1</sup> pro obecně potraviny, 0,005 mg.kg<sup>-1</sup> pro uzené ryby, 0,01 mg.kg<sup>-1</sup> pro masné výrobky a uzená masa.

N- nitrosaminy vykazují mutagenní, teratogenní především karcinogenní účinky. Karcinogenita byla prokázána u celé řady živočichů na různých orgánech. Byl rovněž prokázán synergický účinek N-nitrosaninů při podávání s jinými karcinogenními sloučeninami [3].

## 1.4. Metody stanovení dusičnanů a dusitanů

Dusičnany se stanovují ve všech typech vod. U povrchových a splaškových vod a při analytické kontrole biologických čistíren je stanovení dusičnanů součástí dusíkových bilancí [22]. Stanovit dusičnany je nutno v den odběru, není-li to možné, je nutno vzorky vody konzervovat. Obsah dusičnanů se udává z pravidla hmotnostní koncentrací, a to jako  $\text{NO}_3^-$  nebo  $\text{N-NO}_3^-$ , v  $\text{mg.l}^{-1}$ . ČSN 83 0611 pro pitnou vodu stanoví nejvyšší přípustná množství iontů ve vodě takto: dusitany  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  a dusičnany  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  [24]. Pro stanovení dusičnanů ve vodách existují desítky metod. Každá metoda má ještě mnoho modifikací, a tak počet doporučených postupů na stanovení dusičnanů lze počítat řádově na stovky. Žádnou z dosud navrhovaných metod nelze označit za absolutně nejsprávnější a za univerzální. Při různých metodách se totiž rušivě (kvantitativně i kvalitativně) uplatňují různé složky vody. Jednotlivé metody stanovení mají i různou citlivost a různý rozsah stanovení [22].

### 1.4.1 Diagnostické papírky

Pro rychlé orientační stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů lze použít testovací proužky, které dodává řada výrobců specializovaných na mobilní analytiku.

Testovací proužek se namočí do vody a výsledné zbarvení se porovná s barevnou škálou na lahvičce (obr. 5)



Obr. 5 Diagnostické papírky k orientačnímu stanovení dusičnanů firmy HACH [30]

### 1.4.2 Potenciometrické stanovení pomocí iontově selektivní elektrody

Iontově selektivní elektroda (ISE) (obr. 6) umožňuje tzv. přímou potenciometrii, tj. přímé, rychlé a v řadě případů i dostatečně přesné měření aktivity iontů, resp. jejich koncentrace při použití kalibrační přímky. Potenciál jakékoliv indikační elektrody není přesně vzato závislý na koncentraci iontů, na které je elektroda citlivá, nýbrž na aktivitě těchto iontů. Kvalitativní analýzu a zejména monitorování obsahu dusičnanů v pitných vodách je možno velmi výhodně provádět pomocí dusičnanové iontově selektivní elektrody. Potenciál této elektrody je dán vztahem:

$$\pi = \pi_o + \frac{RT}{F} \ln a_{NO_3}$$

protože  $a_{NO_3} = [NO_3^-] \cdot \gamma_{NO_3}$

aktivita                      koncentrace                      aktivitní koeficient

dostáváme:

$$\pi = \pi_o + \frac{RT}{R} \ln \gamma_{NO_3} + \frac{RT}{F} \ln [NO_3^-]$$

Je-li iontová síla roztoku udržována na konstantní hodnotě je i aktivitní koeficient konstantní pro všechny pracovní koncentrace  $NO_3^-$  iontů.

Pro případ konstantní iontové síly tedy platí:

$$\pi = konst + \frac{RT}{F} \ln [NO_3^-]$$

V praxi je užitečné změřit kalibrační křivku: potenciál jako funkce log koncentrace při nastavené konstantní iontové síle. To je možno uskutečnit přidávkem soli ,na kterou není elektroda citlivá a to jak do standardních roztoků tak do analyzovaného roztoku. Hledaná koncentrace se odečte z kalibrační křivky.



Obr. 6 ISE elektrody

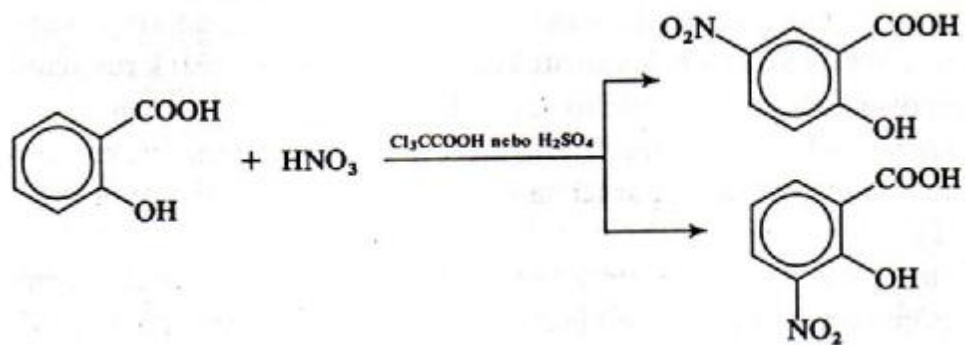
### 1.4.3 Spektrofotometrické metody stanovení

Největší skupinu v praxi používaných metod na stanovení dusičnanů ve vodách tvoří absorpční spektrofotometrické metody. Tyto spektrofotometrické metody lze rozdělit na dvě velké podskupiny metod, a to na metody přímého stanovení dusičnanů a na nepřímé metody stanovení dusičnanů, kde jsou dusičnany spektrofotometricky vyhodnocovány jako dusitany či amoniakální dusík.

#### 1.4.3.1 Přímé spektrofotometrické metody

U první skupiny metod, tj. u přímého absorpčního spektrofotometrického stanovení dusičnanů je využito schopnosti kyseliny dusičné (uvolněné v kyselém prostředí koncentrované kyseliny sírové) nitrovat některé aromatické látky na vzniku barevných nitroderivátů. Tyto nitrační reakce (spočívají ve vnesení  $-\text{NO}_2$  do aromatického jádra, které pak působí jako chromofor) jsou značně specifické [22].

Mezi metody přímého stanovení dusičnanů patří spektrofotometrická metoda s kyselinou sulfosalicylovou. Tato metoda je zahrnuta v jednotných metodách rozboru vod jako norma ČSN ISO 7890-3. Podstatou zkoušky je spektrofotometrické měření žluté sloučeniny, která vznikla reakcí kyseliny sulfosalicylové ( v prostředí salicylanu sodného a kyseliny sírové) s dusičnany a následující alkalizací.

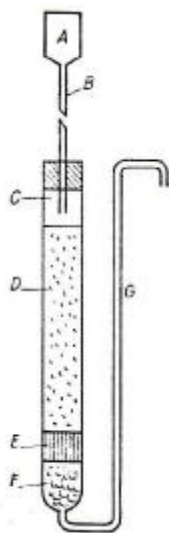


Obr. 7 Reakce kyseliny salicylové s dusičnaný [23]

Pro zamezení srážení vápenatých a hořečnatých solí s hydroxidem se přidává disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTANa<sub>2</sub>). K odstranění rušivého vlivu dusitanů se přidává azid sodný [24].

#### 1.4.3.2 Nepřímé spektrofotometrické metody – stanovení dusitanů

U druhé skupiny absorpčních spektrofotometrických metod, tj. u nepřímého stanovení dusičnanů, se dusičnany nejprve redukují, a to buď na dusitany nebo až na amoniakální dusík [22]. Redukce se provádí různým způsobem. Používá se kadmiový redukční sloupec (obr. 8).



Obr. 8 Kadmiový redukční sloupec [29]

A – rezervoár na 25 ml, B – kapilární trubice Ø 0,4 mm, C – trubice Ø 12 mm, D – 7 cm Detva kadmia, E – 1 cm vrstva oxidu křemičitého , F – 1 cm vrstva skleněné vaty, G – kapilární trubice Ø 2 mm



Při stanovení obsahu dusičnanů v pivě se přítomné dusičnany zredukuje na dusitany kadmiovou houbou, která se připraví přímo ve vzorku z práškového zinku a octanu kademnatého.

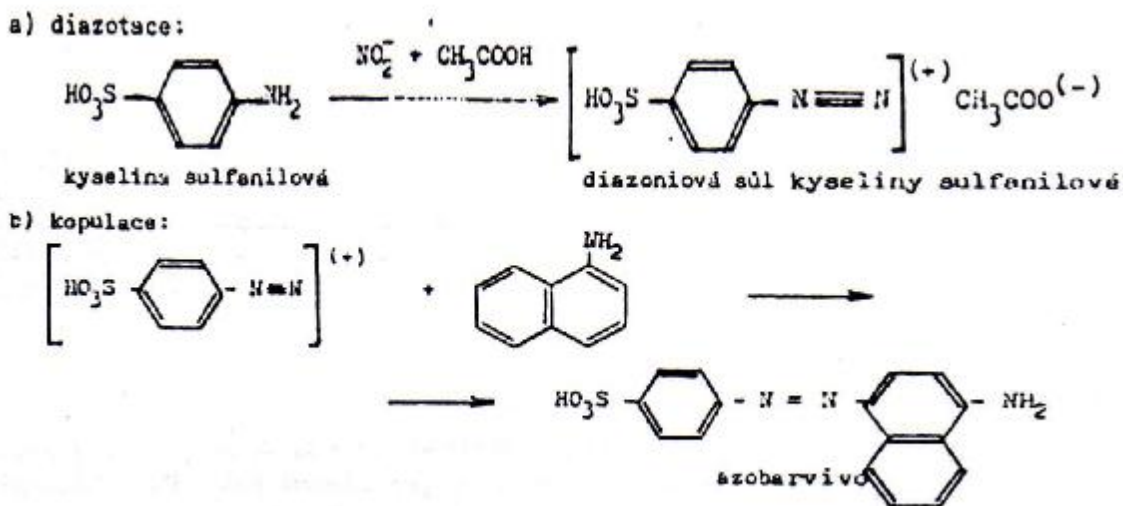
Nepřímá metoda stanovení firmy HACH je založena na redukci dusičnanů kadmiem na dusitany. Dusitany diazotují v kyselém prostředí sulfanilovou kyselinou za vzniku diazoniové soli, která reaguje s kyselinou chromotropovou za vzniku sloučeniny růžového zbarvení, která je úměrná koncentraci dusitanového dusíku [26]. Firma dodává k spektrofotometru DR/2500 HACH (obr. 9) set pro toto stanovení. Spektrofotometr má v paměti uloženu kalibrační přímkou, což umožňuje rychlé stanovení koncentrace dusičnanů ve vzorku pomocí daného postupu.



Obr. 9 Spektrofotometr DR/2500 firmy HACH

Tento způsob lze použít např. při anýze vody, nápojů, zeleninových a masných výrobků, i při anýze půdy. Rušivý vliv kyseliny askorbové se eliminuje aktivním uhlím [29].

Stanovení dusitanů spektrofotometrickou metodou spočívá v diazotaci kyseliny dusité (uvolněné z dusitanů silnou minerální kyselinou) s kyselinou sulfanilovou a kopulací s  $\alpha$ -naftylaminem. Obsah dusitanů se zjistí z kalibračního grafu [28].



Obr. 10 Reakce kyseliny dusité s Griessovým-Illosvayovým činidlem [29]

Alternativou, pro předchozí stanovení, může být použití N-(1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridu. Sulfanilová kyselina je diazotována v prostředí hydrogensíranu draselného kyselinou dusitou (z dusitanů ve vzorku) na diazoniovou sůl. Vzniklá diazoniovaná sůl je kopulována s N-(1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridem (NED-hydrochloridem) na červené azobarvivo. Intenzita vzniklého zbarvení je úměrná koncentraci dusitanů ve vzorku. Metodu je možno použít pro stanovení dusitanů ve všech typech vod. Bez ředění vzorku lze stanovit dusitany o koncentraci iontů  $\text{NO}_2^-$  0,05 až  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  [22].

#### 1.4.4 Nepřímé polarografické stanovení dusičnanů a dusitanů vedle sebe

Polarografické stanovení je založeno na určení polarografické vlny nitroderivátů. Pro přesné stanovení je předepsán dosti složitý postup založený na nitraci 2,4-xylen-1-olu v prostředí koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$  za vzniku 6-nitro-2,4-xylen-1-olu. Ten se vydestiluje a stanoví polarograficky v alkalickém prostředí, v němž dává dobře vyvinutou šestielektronovou redukční vlnu, jejíž výška je úměrná koncentraci. Vyhodnocení se provede metodou standardního přídatku. Upravený postup dovoluje současně stanovit i dusitany. Metoda je pracná, náročná na vysokou čistotu chemikálií, přípravu vzorku a přístrojové vybavení [24, 25].

### 1.4.5 Automatizované stanovení dusitanů a dusičnanů průtokovou injekční analýzou FIA

System FIAstar je využíván pro plně automatickou chemickou analýzu živin a jiných parametrů ve vodě, půdě, stejně jako v mase, mléčných výrobcích a dalších potravinách. Hlavní aplikací je stanovení dusíkových parametrů např. dusičnanů a dusitanů a celkového dusíku. System pracuje metodou dávkování vzorku do proudu nosného media (tzv. flow injection analysis) [27].

Do nosného proudu analytického činidla jsou vstříkány vzorky, během pohybu činidla a vzorku dochází k mísení a vzniklý reakční produkt je potom kvantitativně měřen v průtokovém detektoru. Výsledkem analýzy jsou typické píky, které se vyhodnotí kvantitativně [11].

Moduly analyzátoru je možno postavit až tři na sebe, což umožňuje simultánní analýzu až tří parametrů v jednom vzorku. Rychlá a jednoduchá výměna kazet pro různé metody přináší možnost nastavit systém na různé druhy analýz nebo provádět postupné měření různých parametrů/mechanismů, např. s použitím pouze jednoho modulu. Modul analyzátoru obsahuje nástřikovou jednotku s proměnnými objemy nástřikových smyček, jednotku pumpy s proměnou rychlostí a držáky hadiček pumpy pro až 8 hadiček, výměnnou kazetu podle použité metody a fotometrický matriční detektor s průtokovou měřicí celou. Každý modul také obsahuje nastavenou termostátovou reakční smyčku [27].



Obr. 11 Injekční analyzátor FIAstar 5000 (tři moduly) a automatický podavač vzorků [31]

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem bakalářské práce je srovnání běžně používané přímé metody stanovení dusičnanů, spektrofotometrické metody se salicylanem sodným, s rychlou spektrofotometrickou metodou firmy HACH. Stanovení bylo provedeno u vzorků různých vod.

Získané výsledky byly dále statisticky vyhodnoceny a bylo provedeno srovnání použitých metod z hlediska časové a finanční náročnosti.

### 2.1 Použité chemikálie a přístroje

Při stanovení dusičnanů byly použity následující chemikálie.

Dusičnan draselný p. a.

Salicylan sodný p. a.

Kyseliny sírová konc. p. a.

Hydroxid sodný p. a.

Činidla soupravy firmy HACH:

NitraVer 6 Nitrate Reagent Powder Pillow

NitriVer 3 Nitrite Reagent Powder Pillow

Při stanovení dusičnanů byly použity následující přístroje a zařízení.

Analytické váhy digitální EP 214 CM

Sušárna Venticell, BMT ( Brněnská medicínská technika)

Spektrofotometr Spekol 11, Karl Weiss Jena, NDR

Spektrofotometr DR/2500, HACH, USA

## 2.2 Pracovní postup přímého stanovení dusičnanů metodou se salicylanem sodným

Do 25 ml kádinky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku a přidáno 0,25 ml 0,5 hmot. % salicylanu sodného. Vzorek byl promíchán a dán do vyhřáté sušárny na teplotu 140 °C, jeho odpaření probíhalo asi 15 minut. Po odpaření se vzorek nechal vychladnout. Po vychladnutí byl odparek rozpuštěn v 0,25 ml koncentrované kyselině sírové a opět chvíli dán do sušárny. Po vytažení bylo nutné vzorek nechat opět zchladnout. Po vychladnutí bylo ke vzorku přidáno

7 ml destilované vody a 2 ml hydroxidu sodného o molární koncentraci 10 mol.l<sup>-1</sup>. Vše bylo důkladně promícháno a změřena absorbance na Spekolu při vlnové délce 410 nm v 1 cm kyvetách. Hledaná koncentrace dusičnanů v analyzovaném vzorku byla vyhodnocena z kalibračního grafu. Kalibrační roztoky s obsahem 0,005 až 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> byly připraveny ze základního roztoku dusičnanu draselného o koncentraci 0,1 mg. ml<sup>-1</sup>. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako vzorku. Absorbance kalibračních roztoků i vzorku byla měřena proti slepému pokusu.

## 2.3 Pracovní postup nepřímého stanovení dusičnanů rychlou spektrofotometrickou metodou firmy HACH

Stanovení bylo prováděno na spektrofotometru DR/2500 firmy HACH. Na dotykovém displeji byl nastaven program 351 N, Nitrate LR program pro danou metodu stanovení. Do 25 ml odměrného válce bylo odměřeno 15 ml vzorku a přidán obsah jednoho balíčku „NitraVer 6 Nitrate Reagent Powder Pillow“ a válec byl zazátkován. Stisknutím ikony časového programátoru byl zapnut odečet reakční doby (3 minuty). Po danou reakční dobu byl obsah válce silně protřepáván. Po zaznění signálu, označujícího konec potřebné doby reakce, byl opět zapnut časový programátor na 2 minuty reakční doby, kdy se reakční směs ve válci již neprotřepávala. Po zaznění signálu konce reakce byl roztok nalit do 10 ml kyvety. Při plnění kyvety bylo nutné zabránit převedení jakýchkoliv částic kadmia. Do kyvety se zpracovávaným vzorkem byl přidán obsah jednoho balíčku „NitriVer 3 Nitrite Reagent Powder Pillow“ a ta byla zazátkována a spuštěn časový programátor.

Obsah bylo nutné mírně protřepávat 30 sekund. Za přítomnosti dusičnanů se roztok zbarvil růžově. Po zaznění signálu bylo třepání ukončeno a spuštěn časový programátor nastavený na 15 minut reakční doby. Po zaznění signálu časového programátoru bylo odměřeno do druhé kyvety 10 ml vzorku (slepý pokus). A kyveta byla zazátkována. Kyveta se slepým pokusem byla vložena do kyvetového prostoru a nastavena nulová hodnota, která se zobrazila na displeji. Po nastavení nulové hodnoty byly proměřeny připravené vzorky. Spektrofotometr HACH má vložen pro danou metodu kalibrační graf a umožňuje odečíst přímo v hodnotách koncentrace.

## 2.4 Dvouvýběrový Wilcoxonův test

Dvouvýběrový Wilcoxonův test patří k nejsilnějším parametrickým testům.

Dvouvýběrovým testem založeným na Wilcoxonově testové statistice obecně testuje hypotézu  $H_0: F(x) = G(y)$ , tedy předpoklad, že oba výběry pocházejí z téhož základního souboru nebo ze souboru s tímž rozdělením.

Ačkoliv je dvouvýběrový test formulován jako test proti obecné alternativě, je citlivý zejména na tzv. alternativní posunutí  $H': F(x) = G(y - \delta)$ ,  $\delta$  různé od nuly, proto se sním v praxi nejčastěji setkáváme jako s testem ověřujícím, zda dvě závislé náhodné výběry pocházejí z téhož základního souboru se spojitou distribuční funkcí, tedy i mají stejnou střední hodnotu. Proto je test často formulován jako ověření shody úrovně zkoumaného znaku ve dvou souborech, z nichž byly tyto nezávislé výběry pořízeny. Výběry obvykle volíme tak, aby rozsah I. výběru  $m$  byl menší nebo roven než je rozsah II. výběru  $(n-m)$ .

Postup testu spočívá v tom, ze všech jednotek  $X_1, \dots, X_m, X_{m+1}, \dots, X_n$  vytvoříme sdružený výběr s rozsahem  $n$  uspořádaný vzestupně podle velikosti. jednotlivým hodnotám se přiřadí pořadová čísla  $R_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ). Součet pořadí hodnot prvního výběru, tj. hodnot  $X_1, \dots, X_m$  označíme  $T_1$  a analogicky součet pořadí hodnot druhého výběru  $X_{m+1}, \dots, X_n$  označíme  $T_2$ . Je zřejmé že

$$T_1 + T_2 = \frac{n(n+1)}{2}$$

Testovým kritériem dvouvýběrového Wilcoxonova testu je Wilcoxonova statistika

$$S_W = T_1,$$

tj. součet všech pořadových čísel odpovídajících I. výběru, což je ovšem testovací statistice  $S_w$  získané z obecné testovací statistiky  $S'$ , položíme-li skóry  $a(i) = i$ :

$$S_w = \sum_{i=1}^n R_i \quad [32].$$

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení obsahu dusičnanů bylo provedeno u různých vzorků vod. Výsledky tohoto stanovení, provedeného pomocí spektrofotometrické metody se salicylanem sodným a rychlé spektrofotometrické metody firmy HACH, uvádí tabulka 10.

Tabulka 10. Výsledky stanovení obsahu dusičnanů u daných vzorku

Vzorek	Obsah dusičnanů zjištěný metodou firmy HACH [mg.l <sup>-1</sup> ]	Obsah dusičnanů zjištěný metodou se salicylanem sodným [mg.l <sup>-1</sup> ]
<i>Kojenecká voda BONNY</i>	1,50 ± 0,53	1,47 ± 0,35
<i>Voda ze studánky</i>	28,10 ± 3,11	25,40 ± 3,66
<i>Voda z vodovodního řádu 1</i>	31,00 ± 5,22	29,33 ± 4,72
<i>Voda z vodovodního řádu 2</i>	38,50 ± 3,67	35,17 ± 3,97

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že u všech analyzovaných vzorků vod byl obsah dusičnanů slučitelný s normou. Kojenecká voda BONNY splňovala jak limit daný normou (15 mg.l<sup>-1</sup>), tak hodnotu udanou výrobcem z jím provedené chemické analýzy, která činí maximálně 2,0 mg.l<sup>-1</sup> obsažených dusičnanů. Zbylé vzorky vod taktéž splnily limit daný normou pro skupinu pitná voda, jež činí maximálně 50 mg.l<sup>-1</sup>.

Díky těmto výsledkům bylo možné provést srovnání obou použitých metod pro stanovení dusičnanů. Srovnání obou použitých metod bylo provedeno pomocí statistického dvouvýběrového Wilcoxonova testu, jehož princip byl popsán výše. Z provedení tohoto testu vyplynulo, že nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi soubory v úrovni hodnot stanovených jak spektrofotometrickou metodou se salicylanem sodným, tak rychlou spektrofotometrickou metodou firmy HACH. Proto můžeme považovat obě metody za relativně srovnatelné, co se týče poskytnutých výsledků.



Obecně lze však říci, že hodnoty získané měřením metodou firmy HACH, ve srovnání s hodnotami naměřenými metodou se salicylanem sodným, jsou o něco vyšší, což může být zapříčiněno větší citlivostí přístroje DR/2500 HACH.

Pokud bychom hodnotili obě použité metody z hlediska časové náročnosti a finančních nákladů na provedení těchto analýz budou tyto rozdíly již mnohem větší.

Celkový čas nutný pro stanovení obsahu dusičnanu provedený metodou se salicylanem sodným v jednom vzorku se pohyboval okolo jedné hodiny. Časová náročnost tohoto stanovení spočívala hlavně v nutnosti přípravy jednotlivých činidel, v odpařování vzorku, který bylo nutno odpařovat minimálně 15 minut a v neposlední řadě také v sestavení kalibrační přímky, ze které se po naměření hodnoty absorbance odečetla námi hledaná hodnota koncentrace dusičnanu ve vzorku ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Jestliže by však výchozí koncentrace dusičnanů ve vzorku byla příliš vysoká, takže by odečtená absorbance ve výsledku přesahovala hodnoty kalibračního grafu, bylo možné vybarvený roztok před měřením ředit hydroxidem sodným o složení 3 hmot. %, aniž by se celé stanovení muselo opakovat. Při vyhodnocení by se však muselo přihlídnout k použitému ředění.

Časovou náročnost by bylo možno snížit například použitím již předem připravených činidel o požadovaných koncentracích, odměřováním roztoků pomocí automatických dávkovacích zařízení, což by také zpřesnilo stanovení na jehož chybě se může právě podílet nepřesnost při pipetování a odměřování jednotlivých látek.

Předností spektrofotometru HACH umožňujícího poměrně rychlou analýzu požadovaného kritéria, je použití řady v něm přímo naprogramovaných metod pro stanovení různých látek. Jednou z metod je i testovaná metoda 8192, pomocí které se stanoví dusičnany redukční metodou s kadmíem. Časová náročnost analýzy pomocí metody firmy HACH je ve srovnání s předchozí metodou (klasickou) mnohem menší. Vyžaduje přibližně o polovinu kratší čas pro stanovení jednoho vzorku přibližně 25 minut. Spektrofotometr HACH měl již vloženou kalibrační přímku pro toto stanovení. Tato skutečnost umožňovala okamžité vyjádření hodnoty koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) i příslušné absorbance (%) po vložení a změření daného vzorku. Nevýhodou metody byl relativně nízký rozsah stanovení koncentrace dusičnanů a to od 1 do  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V případě vyššího obsahu dusičnanů ve vzorku bylo nutné provést ředění a k tomuto kroku přihlídnout při vyhodnocení výsledku.

Stanovení dusičnanů touto metodou však mohou rušit některé látky přítomné ve vzorku, jako jsou například dusitany. Jestliže by jejich obsah natolik rušil stanovení, potom by bylo nutné provést úpravu vzorku, během daného postupu, bromovou vodou a roztokem fenolu. Poté by bylo možné pokračovat v analýze podle této metody. Pro měření dusitanů byl určen program 371. Tento krok musel být u každého vzorku na počátku měření proveden, aby bylo možné zvolit příslušný program. Metoda firmy HACH obsahuje sadu činidel, která jsou při dané analýze používána. Jedná se o dvě skupiny činidel Nitra Ver 6 Nitrite Reagent Powder Pillow a Nitri Ver 3 Nitrite Reagent Powder Pillow. Tyto čidla byly dodány ve dvou jednotlivě balených sáčcích. Sáčky postačovalo rozstříhnout a postupně přidávat dle návodu pro analýzu v daný okamžik ke vzorku. Díky okamžité možnosti použití obou činidel byl zkrácen čas pro analýzu a odpadl nutný čas pro jejich přípravu, jako tomu bylo u metody se salicylanem sodným.

Finanční hodnocení obou použitých metod bylo provedeno za předpokladu, že subjekt, vykonávající analýzu těmito metodami, vlastní přístroje nutné pro toto stanovení, které jsou uvedeny v kapitole použité chemikálie a přístroje. Na základě toho bylo možné hodnotit náklady vzniklé analýzami z pohledu spotřeby jednotlivých činidel.

Při spektrofotometrické analýze se salicylanem sodným bylo nutné použít čtyř druhů chemikálií pro přípravu předepsaných činidel. Ceny těchto chemikálií se pohybovaly v rozmezí od 84 do 650 Kč za 1 kg. Proto suma, která by byla nutná na pořízení těchto chemikálií by se pohybovala asi okolo 740 Kč. Nejnákladnější položkou na pořízení by byl salicylan sodný p. a. jehož pořizovací cena se pohybuje kolem 650 Kč za 1 kg. Pokud bychom přepočítali jednotlivé ceny chemikálií potřebných pro dané stanovení na jejich množství potřebných k přípravě činidel, dostali bychom se na cenu přibližně 5 Kč na stanovení jednoho vzorku.

Když tuto cenu porovnáme s cenou potřebnou ke stanovení jednoho vzorku pomocí rychlé metody firmy HACH, dostaneme se přibližně na desetinásobek ceny předchozí analýzy. Tudiž na cenu přibližně 50 Kč na stanovení jednoho vzorku. Pořizovací cena setu činidel potřebných pro tuto analýzu byla přibližně 5000 Kč.

## ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce bylo srovnání dvou metod používaných pro stanovení dusičnanů a to spektrofotometrické metody se salicylanem sodným a rychlé spektrofotometrické metody firmy HACH. Srovnání bylo provedeno na základě výsledků měření různých vzorků vod. Vzorky zastupovaly kategorie kojenecká voda a pitná voda. U obou již zmiňovaných kategorií splňovaly předložené vzorky povolený obsah dusičnanů jím stanovený normou. Výsledky získané měřeními těmito dvěma metodami byly podrobeny statistickému vyhodnocení. Pro statistické vyhodnocení byla použita metoda dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Z výsledků tohoto testu, vyplynulo, že nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi soubory v úrovni hodnot stanovených jak spektrofotometrickou metodou se salicylanem sodným, tak rychlou spektrofotometrickou metodou firmy HACH. Na základě toho lze považovat obě metody za relativně srovnatelné, co se týče poskytovaných výsledků.

Metody byly rovněž hodnoceny z hlediska časové náročnosti a nutných finančních nákladů pro jednotlivá stanovení. Zde byly rozdíly mezi použitými metodami mnohem více patrné. Pokud bychom zhodnotili časovou náročnost stanovení metodou se salicylanem sodným, je nutný časový interval pohybující se kolem pohybující se v průměru kolem jedné hodiny pro stanovení jednoho vzorku. Výhodou této analýzy jsou nízké provozní náklady, za předpokladu, že subjekt provádějící tuto analýzu již vlastní potřebné přístroje a zařízení. Díky tomuto faktu je možné cenu vztahovat pouze na potřebné chemikálie. Cena stanovení jednoho vzorku se pohybovala přibližně okolo 5 Kč. Pořizovací cena chemikálií potřebných ke stanovení a přípravě činidel se pohybovala asi 740 Kč.

Spektrofotometrická metoda firmy HACH se oproti předchozí metodě vyznačovala citelnějším zkrácením doby potřebné na stanovení jednoho vzorku. Analýzu bylo možné provést během 25 až 30 minut. Nevýhodou je její relativně nízký koncentrační rozsah od 1 do 50 mg.l<sup>-1</sup>. Za nevýhodu je možno rovněž považovat vznik toxických odpadů. Kadmium je pokládáno za toxický odpad. Za další nevýhodný aspekt této metody by mohla být považována její relativně vysoká cena na stanovení jednoho vzorku. Cena stanovení jednoho vzorku se pohybovala okolo 50 Kč.

Pokud provedeme shrnutí, tak spektrofotometrická metoda se salicylanem sodným je metoda finančně méně náročná, ale na úkor své časové vytiženosti. Protože je nutné použít i více zařízení ke stanovení je možné provádět tuto analýzu pouze v laboratořích. Naproti tomu spektrofotometrická metoda firmy HACH je relativně časově méně náročná, ale na úkor relativně vysokých finančních prostředků. Není náročná na vybavení, proto je možné provádět tuto analýzu, kromě laboratoří i v terénu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Sdružení obrany spotřebitelů [on-line]  
<<http://www.spotrebitele.info/kartoteka/index.php?page=490>>
- [2] Server Eridanus. Dostupné [on-line]  
<[http://eridanus.cz/Biologie/Clovek/Voda/1\\_3\\_pitna\\_voda.htm](http://eridanus.cz/Biologie/Clovek/Voda/1_3_pitna_voda.htm)>
- [3] VELÍŠEK, J., : *Chemie potravin III.* . 1. vydání . Tábor: OSSIS, 1999. 328s
- [4] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J.: *Chemie potravin.* 1. vydání. Praha, 1983. 632 s
- [5] BŘEZINA, P., KOMÁREK, A., HRABĚ, J.: *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin.* 2. část. Vyškov: VVŠ PV, 2001. 177 s.
- [6] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. Dostupné [on-line]  
<<http://www.lexdata.cz/web/lexdata.nsf/frameset?openpage&sb=C1256D49002E7CB2C12566DA005D38CB>>
- [7] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků. Dostupné [on-line]  
<<http://www.lexdata.cz/web/lexdata.nsf/frameset?openpage&sb=C1256D49002E7CB2C12566DA005D38CB>>
- [8] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 54/2002 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek. Dostupné [on-line]  
<<http://www.lexdata.cz/web/lexdata.nsf/frameset?openpage&sb=C1256D49002E7CB2C12566DA005D38CB>>

- [9] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 304/2004 Sb. kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. Dostupné [on-line] <<http://www.lexdata.cz/web/lexdata.nsf/frameset?openpage&sb=C1256D49002E7CB2C12566DA005D38CB>>
- [10] ROSYPAL, S.: *Bakteriologie a virologie*, 1. vydání. Praha: Scientia, 67 s. ISBN 80-85827-16-6
- [11] DAVÍDEK, J., VELÍŠEK J.: *Analýza potravin*. Praha: ES VŠCHT, 1988
- [12] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 233/2002 Sb. kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. Dostupné [on-line] <<http://www.lexdata.cz/web/lexdata.nsf/frameset?openpage&sb=C1256D49002E7CB2C12566DA005D38CB>>
- [13] Nařízení komise (ES) č. 466/2001 Sb. kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách
- [14] VYMĚTAL, F., HRUBÝ, M.: *Česk. Hyg. Epidemiol. Mikrobiol.* 23. 1952. 153 s
- [15] SCHMIDT, P., PFEIFER, I.: *Vodní hosp.* 24. 1974. 151 s
- [16] ČSN 83 0611 *Pitná voda*. 1975.
- [17] ČSN 83 0602 *Posuzování jakosti povrchové vody z způsob její klasifikace*. 1966
- [18] *Ukazatele přípustného stupně znečištění povrchových vod* (příloha). Nařízení vlády č. 25 a Nařízení vlády č. 30. Sbírka zákonů 1975, částka 8
- [19] PITTER, P.: *Hydrochemie*. SNTL. Praha. 1981
- [20] Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Dostupné [on-line] <<http://www.lexdata.cz/web/lexdata.nsf/frameset?openpage&sb=C1256D49002E7CB2C12566DA005D38CB>>

- [21] Směrnice Rady 91/676/EEC, o ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů (nitratová směrnice)
- [22] HORÁKOVÁ, M., LISCHKE, P., GRÜNWARD, A.: *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1989.
- [23] ČSN ISO 7890-3 *Jakost vod*. Stanovení dusičnanů. Spektrometrická metoda s kyselou sulfosalicylovou
- [24] SKOUPIL, J., LECJAKSOVÁ, Z.: *Chemické kontrolní metody*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1988. 280 s.
- [25] DAVÍDEK J. A KOL.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 1. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1991. 718 s.
- [26] Příručka HACH ODYSSEY
- [27] Dostupné [on-line] <http://www.skatec.cz/fia.html>
- [28] SEVEROVÁ, M., BŘEZINA, P.: *Návody pro laboratorní cvičení z analýzy potravin*. Vyškov: VVVŠ PV, 1998. 83 s
- [29] ZÝKA, J.: *Analytická příručka I*. Praha: SNTL, 1990
- [30] Snail Instruments. Dostupné [on-line] <<http://www.vitrum.cz/snail/stripes.htm>>
- [31] Net InterLab s. a. l. Dostupné [on-line] <[http://www.netinterlab.com/archivo\\_foss/fia.html](http://www.netinterlab.com/archivo_foss/fia.html)>
- [32] BLATNÁ, D.: *Neparametrické metody*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola ekonomická v Praze, 1996. 217 s. ISBN 80-7079-607-3

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Nitrosomyoglobin .....	9
Obr. 2 Schéma zapojení bakterií do koloběhu dusíku v přírodě .....	18
Obr. 3 Obecný mechanismus nitridace sekundárních aminů .....	27
Obr. 4 Vznik nitrosačních činidel v kyselém prostředí .....	27
Obr. 5 Diagnostické papírky k orientačnímu stanovení dusičnanů firmy HACH .....	29
Obr. 6 ISE elektrody .....	31
Obr. 7 Reakce kyseliny salicylové s dusičnany .....	32
Obr. 8 Kadmiový redukční sloupec .....	32
Obr. 9 Spektrofotometr DR/2500 firmy HACH .....	33
Obr. 10 Reakce kyseliny dusité s Griessovým-Illosvayovým činidlem .....	34
Obr. 11 Injekční analyzátor FIAstar 5000 (3 moduly) a automatický podavač vzorků ....	35



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Povolené dávkování dusičnanů a dusitanů v masných výrobcích .....	12
Tabulka 2. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusitanu draselného (E 249) ...	13
Tabulka 3. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusitanu sodného (E 250) .....	14
Tabulka 4. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusičnanu sodného (E 251) .....	15
Tabulka 5. Požadavky na identitu a čistotu přídatné látky dusičnanu draselného (E 252) ..	16
Tabulka 6. Povolené dávkování dusičnanů a dusitanů v masných výrobcích .....	17
Tabulka 7. Obsah dusičnanů ve významných zeleninách a bramborách .....	20
Tabulka 8. Maximální obsahy dusičnanů v potravinách v $\text{mg.kg}^{-1}$ .....	21
Tabulka 9. Limitní chemické ukazatele – dusičnany, dusitany .....	24
Tabulka 10. Výsledky stanovení obsahu dusičnanů u daných vzorků .....	40

## SEZNAM PŘÍLOH

1. Příloha PI : Kalibrační přímka pro stanovení spektrofotometrickou metodou se salicylanem sodným

## PŘÍLOHA P I: KALIBRAČNÍ PŘÍMKA

