

Etiléntiourea (ETU) vizsgálata sörben

PÁPA ÁGOSTON* – SOÓS KATALIN** – DOMOKI
JÁNOS**

*MÉM NAK Természet- és Vadvédelmi Állomás, Fácánkert
(Korábban: Tolna megyei NŐVAL, Szekszárd)

** Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1987. január 12.

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A komló a sörgyártás nélkülözhetetlen alapanyaga. Az eredményes termelés érdekében a komlóültetvényeken rendszeresen alkalmaznak nagy hatóanyagú növényvédőszerkeket, a fellépő kártevők és kórokozók ellen.

A gombaölő szereket – így a ditiokarbamát, etilénbisz-ditiokarbamát (továbbiakban EBDC) tartalmú készítményeket – rövid időközönként egy termelési ciklusban többször is használják, tehát fennáll a hatóanyagok felhalmozódásának veszélye. Az EBDC-k viszonylag stabil közbenső bomlásterméke az etiléntiourea (továbbiakban ETU).

Az EBDC-k ETU-vá történő bomlásának, átalakulásának vázlatát az 1. ábrán mutatjuk be Marshall (1) nyomán. Az átalakulás vizes közegben, főzés hatására következik be. Az ETU jóval stabilabb, mint az EBDC-anyavegyület, ezért hajlamos a végső fázisban akkumulálódni.

Az EBDC – ETU átalakulás mennyiségi viszonyait többen vizsgálták. Ludwig és munkatársai (2) szerint 71%-os, Marshall (1) szerint 83 – 87%-os a nabam átalakulása vizes oldatban.

Watts és munkatársai (3), Onley és munkatársai (4) EBDC hatóanyaggal fortifikált spenót, burgonya és sárgarépa mintákat, Neusome (5) szabadföldi kezelésből származó paradicsom mintákat főzött. A szerzők megállapították, hogy az EBDC/ETU konverzió kb. 50%-os. A visszanyerési vizsgálatokból az is kiderült, hogy az ETU stabil marad főzéskor.

A mérésekből egyértelműen következik, hogy EBDC maradékokat tartalmazó termények alkalmazása esetén ETU megjelenésére lehet számítani a főzési műveletek során készülő végtermékekben. A sörgyártásban minden feltétel adott ahhoz, hogy EBDC-okat tartalmazó komló ETU szennyezést okozzon a sörben.

Az ETU-nak számos káros tulajdonságát állapították meg. Graham és munkatársai (6) golyvát okozó, Innes és munkatársai (7) karcinogén, Seiler (8) mutagén, Khera (9) teratogén hatásáról számoltak be. Mindezek a káros hatások indokolják az ETU meghatározás szükségességét élelmiszerekben.

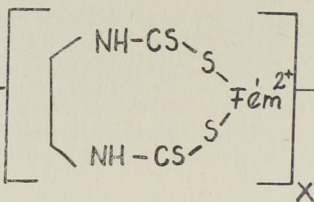
Analitikai kérdésekre rátérve az ETU meghatározási módszerek két csoportra oszthatók:

- 1) származékképzés után történő gázkromatográfias meghatározás. (Ezekkel részletesen nem foglalkozunk. Elsősorban elektronbefogási detektálásra alkalmas származékokat közölnek az irodalomban).
- 2) Származékképzés nélküli – direkt módon – történő gáz-, ill. folyadékromatográfias (HPLC) meghatározások.

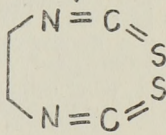
Az ETU közvetlen analizésére Lawrence és munkatársai (10) dolgoztak ki HPLC-s módszert. Sörben levő ETU vizsgálatára Massey és munkatársai (11) közöl-

EBDC bomlási vázlate / Marshall nyomán/

- EDI** : etiléndiizocianát
- EBIS** : etilénbisz-izotiocianát-szulfid
- EDA** : etiléndiamin
- ETD** : etilénbisz-tiuram-diszulfid
- IS** : β -aminoetil-ditio-karbamát /Inner Salt/

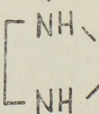


EBDC



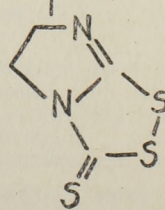
EDI

+ H₂O

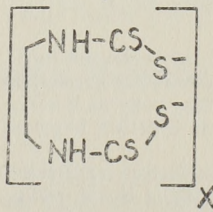


ETU

melegítés, enzimatis, v. mikrobiológiai redukció



EBIS



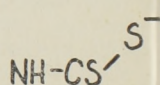
ETD

-H₂S

-S
-CS₂

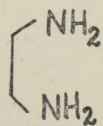
-H₂S
melegítés, redukció

+ NH₄



IS

-CS₂



EDA

-CS₂

tek HPLC-s módszert. A mintaextrakt előzetes tisztításán alapuló eljárást közölte *Maier* (12) az ETU és PTU (propiléntiourea) sörben és más italokban történő meghatározására. Közvetlen GLC-s vizsgálatra *Otto* és munkatársai (13) közöltek módszert.

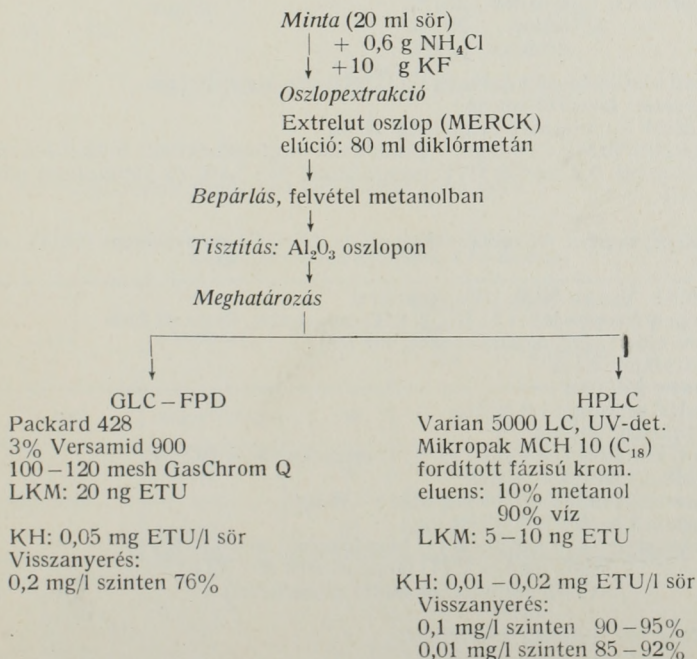
Nitz és *munkatársai* (14) kapilláris GLC-s módszert dolgoztak ki az ETU és PTU koplóban, sörben és szőlőben történő meghatározására, egyben kritikailag értékelték az előző, származékképzésen alapuló módszereket. Az általuk kidolgozott módszerrel 7 db – az NSZK különböző sörgyáraiból származó – sörmintát vizsgáltak meg 1979-ben. 4 db mintában mértek PTU maradékot és mind a 7 mintában ETU maradékot (0,05–0,26 mg/l koncentrációk között). 7 mintából 4-ben az ETU koncentrációja meghaladta a FAO/WHO által javasolt 0,1 mg/l-es határértéket.

2. Saját vizsgálatok

2.1. Vizsgálati módszer (Vázlatát a 2. ábrán mutatjuk be)

A meghatározás elve: a mintából oszlopxtraktációs módszerrel vonjuk ki a hatóanyagot, majd közvetlenül gázkromatográfiásan, lángfotometriás detektálással vagy nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással határozzuk meg.

ETU meghatározása sörben



2. ábra
ETU meghatározása sörben

A hatóanyag kinyerése: 20 ml mintát 100 ml-es főzőpohárba töltünk. Hozzáadunk 0,6 g ammóniumkloridot és 10 g káliumfluoridot. 20 percig mágneses keverővel kevertetjük. Az oldatot kvantitatív az Extrelut oszlopra visszük. 15 perc elteltével (mikor az oldat teljesen beszívódott az oszlopba) az oszlopra 80 ml diklórometánt öntünk. A lecsepegő extraktot csiszolatos gömblombikban fogjuk fel és rotációs vákuumbepárlón szárazra pároljuk. A maradékot közvetlenül a bepárlás után 3×1 ml metanollal 1 ml-es mikroedénybe mossuk át. A mikroedényben a bepárlásokat 40°C -on nitrogén befúvatásával végezzük. Amint egy részlet szárazra párolódott, közvetlenül utána rá kell tölteni a következő részletet. Az átmosás befejeztével a maradékot $50 - 100 \mu\text{l}$ metanolban oldjuk. Ebből az oldatból végezzük a meghatározást, lehetőleg azonnal. Amennyiben ez nem lehetséges, úgy a mintát -20°C -on 1 napig tárolhatjuk.

Gázkromatográfiás (GLC) meghatározás (Tolna megyei NÖVÁL, ill. MÉM NAK Fácánkerti vizsgálatok).

Készülék: Packard 428, teljes üvegszisztem, FPD S szűrővel.

Oszlop: $90 \text{ cm} \times 2 \text{ mm}$ belső átmérőjű Pyrex üveg.

Töltet: 3% Versamid 900, 100 – 120 mesh Gas Chrom Q-n.

Vivőgáz: nagy tisztaságú nitrogén, 23 ml/p.

Detektor gázok: hidrogén 145 ml/p

 levegő 155 ml/p

 levegő 2165 ml/p

Hőmérséklet: injektor 270 $^\circ\text{C}$

 oszlop 250 $^\circ\text{C}$

 detektor 270 $^\circ\text{C}$

A fenti körülmények között az ETU retenciós ideje: 102 sec.

A módszert jellemző adatok:

Legkisebb kimutatható mennyiség: 20 ng

Kimutatási határ: 0,05 mg/l, 1 g mintának megfelelő extrakt injektálásával

Visszanyerés: 0,2 mg/l-es ETU hozzáadásnál $76 \pm 5,4\%$ (5 párhuzamos minta elemzésével)

Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) meghatározás (OÉTI vizsgálatok)

Készülék: Varian 5000, UV-detektorral

Oszlop: Mikropak MCH 10 (C_{18} -as), $30 \text{ cm} \times 4 \text{ mm}$, fordított fázis

Eluens oldat: 10% metanol + 90% víz

Hőmérséklet: 30 $^\circ\text{C}$

Nyomás: 250 atm

Áramlási sebesség: 1,5 ml/p

Hullámhossz: 240 nm

A fenti körülmények között az ETU retenciós ideje: 192 sec.

A módszert jellemző adatok:

Legkisebb kimutatható mennyiség: 5 – 10 ng

Kimutatási határ: 0,01 – 0,02 mg/l

Visszanyerés: 0,1 mg/l-es ETU hozzáadásnál $90 - 95 + 5,9\%$

 0,01 mg/l-es ETU hozzáadásnál $85 - 92 + 15\%$

 (5 – 5 párhuzamos minta elemzésével)

2.2. Kísérleti sörfőzések eredményei:

A próbafőzéseket a Kőbányai Sörgyár kísérleti üzemében végezték. A próbafőzésekhez az általunk vitt és közvetlenül a felhasználás előtt bevizsgált komló

használták. Ezekben a kísérletekben egy kontrollnak számító, egy kiugróan magas réztartalmú és egy kiugróan magas ditiokarbamát tartalmú komlóval végezték a főzést. Az eredményeket a 3. ábrán mutatjuk be. Az ábráról látható, hogy a 220 mg/kg ditiokarbamátot tartalmazó komlóval készített sör 0,18 mg/l ETU-t tartalmazott.

Kísérleti sörfőzések eredményei

(Kőbányai Sörgyár)

4 kísérleti főzés mérési adatai

<i>KOMLÓ</i>		<i>A KOMLÓBÓL KÉSZÍTETT SÖR</i>
<i>Bomlatlan ditiokarbamát</i>		<i>ETU</i>
	mg/kg	mg/l
(1)	< 3	<0,05
(2)	8,5	<0,05
(3)	26,0	<0,05
(4)	220	0,18
(határérték 80 mg/kg)		
<i>Réz</i>		<i>Réz</i>
	mg/kg	mg/l
2)	720	0,58

3. ábra

Kísérleti sörfőzések eredményei (Kőbányai Sörgyár)

2.3. Kereskedelmi forgalomba kerülő sörök vizsgálata

1. táblázat

Hazai forgalomban levő sörök ETU-tartalma

Idő	Sőrfajta	Mintaszám (db)	Negatív minták száma (db)	Pozitív minták száma (db) százaléka (%)	ETU tartalom mg/l
1983	Magyar világos	40	36	4 10%	0,08–0,13
1985–1986	Magyar	28	26	2 7%	0,10–0,11
	Import	29	21	8 27%	0,01–0,08

Import: Csehszlovákia
NDK
Ausztria
Jugoszlávia
Dánia
NSZK
Franciaország
Lengyelország

Vizsgálati eredményeinket az 1. táblázatban mutatjuk be. 1983-ban mind az öt hazai sörgyár legnagyobb mennyiségben gyártott világos söreit vizsgáltuk. A sörgyárak hetente, nyolc héten keresztül küldték mintáikat, így összesen 40 db mintát analizáltunk.

4 db minta (összminta 10%-a) tartalmazott ETU maradékot 0,08–0,13 mg/l szinten.

1985–1986-ban a hazai sörgyárak termékeiből 28 különböző típusú sörminta közül 2 db tartalmazott ETU-t (0,10 és 0,11 mg/l). Nyolc országból (Csehszlovákia, NDK, Ausztria, Jugoszlávia, Lengyelország, Dánia, NSZK, Franciaország) származó 29 féle import sör közül 8 db tartalmazott ETU-t 0,01–0,08 mg/l-es szinten, ami a vizsgált minták 27%-a.

3. Az eredmények értékelése

Az 1983-ban és 1985-ben végzett felmérésünk szerint a magyar világos sörök 7–10%-a tartalmazott a kimutatási határ (0,01 mg/l) feletti koncentrációban ETU-t, 0,08–0,13 mg/l közötti értékkel.

Az import sörök közel 30%-a tartalmazott mérhető mennyiségű ETU-t, 0,01–0,08 mg/l közötti szinten.

Eredményeink toxikológiai-kémiai értékelése kapcsán elmondhatjuk, hogy az élelmiszerekben előforduló karcinogén anyagokra a WHO nem javasol, nem is javasolhat határértéket. Az ETU ebben a tekintetben kivétel, erre a WHO 1977 óta 0,1 mg/l-es irányszintet tart megengedhetőnek sörben, valamennyi toxikológiai adat és a sörfogyasztás frekvenciájának figyelembevételével. Eredményeink értékelésekor megállapíthatjuk, hogy a sörminták zömében ETU nem volt kimutatható, ill. kimutatott mennyisége nem haladta meg a WHO által megengedett szintet. Ezeknek a mintáknak megfelelő sörök fogyasztása az ETU szempontjából nem jelent veszélyt a fogyasztókra. Néhány mintában azonban 0,1 mg/l körüli vagy a fölötti szinten lehetett ETU-t kimutatni, mely élelmiszerészségügyi szempontból aggyókra adhat okot, különösen a jelentős sörfogyasztók körében.

Eredményeink alapján:

- 1) Szükségesnek tartjuk a komló növényvédelmének fokozott hatásági ellenőrzését, hogy határérték feletti EBDC tartalmú komlót ne termeljenek, ill. ilyen komlót a sör főzésére ne használhassanak fel.
- 2) Szükségesnek tartjuk továbbra is az import sörök szűrőpróbaszerű, rendszeres ellenőrzését ETU-ra.

Végül köszönetet mondunk a Győr-Sopron megyei, a Zala-megyei és a Fővárosi KÖJÁL-oknak az 1985–1986. évi sörminták begyűjtéséért és Balázs Sándornak a lelkiismeretes technikai munkáért.

I R O D A L O M

- (1) Marshall, W. D.: Thermal decomposition of ethylenebisdithiocarbamate fungicides to ethylthiourea in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 25, (1977) 357–361.
- (2) Ludwig, R. A. et al: Studies on the mechanism of fungicidal action of disodium ethylenebisdithiocarbamate (Nabam). *Can. J. Bot.* 32, (1954) 48–54.
- (3) Watts, R. R., Storther, R. W. és Onley, J. H.: Effects of cooking on Ethylenebisdithiocarbamate Degradation to Ethylene Thiourea. *Bull. Environmental Contam. Toxic* 12 (1974) 224–226.
- (4) Only, J. H., Giuffrida, L., Fred Ives, N. és Watts, R. R.: GLC and LC of Ethylenethiourea in Fresh Vegetable Crops, Fruits, Milk and Cooked Foods. *J.A.O.A.C.* 60 (5) (1977) 1105–1110.

- (5) Newsome, W. H.: Residues of Four Ethylenebisdithiocarbamates and Their Decomposition Products on Field-Sprayed Tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 24 (5) (1976) 999–1001.
- (6) Graham, S. L., Hansen, W. H., Davis, K. J. és Perry, C. H.: Effects of one year administration of ethylenethiourea upon the Thyroid of the rat. *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973) 324–329.
- (7) Innes J. R. M. et al.: Biosasay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note. *J. Natl. Cancer, Inst. (U. S).* 42 (1969) 1101–1114.
- (8) Selter, J. P.: ETU, a carcinogenic and mutagenic metabolite of ethylenebisdithiocarbamate. *Mutat. Res.* 26 (1974) 189–191.
- (9) Khera. K. S.: Ethylenethiourea: teratogenicity study in rats and rabbits. *Teratology* 7 (1973) 243–252.
- (10) Lawrence, J. F., Iverson, F., Hanekamp, H. B. és Frei, R.W.: Liquid chromatography with UV absorbance and polarographic detection of ethylenethiourea and related sulphur compounds. *Journal of Chromatography* 212, (1981) 245–250.
- (11) Massey, R. C., Key, P. E. és Mcweeny, D. J.: Analysis of Ethylenethiourea in beer by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 240, (1982) 254–256.
- (12) Maier, J.: Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Aethylenthioharnstoff (ETU) und Propylenethioharnstoff (PTU) im Bier und anderen Getränken mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie. *Brauwissenschaft* 35 (9), (1982) 229–230.
- (13) Otto, S., Keller, W. és Drescher, N.: A new gaschromatographic determination of ETU residues without derivatisation. *J. Environmental Sci. Health B.* 12 (3) (1947) 179–191.
- (14) Nitz, S., Moza, P. és Korte, F.: A Capillary Gas-Liquid Chromatographic Method For Determination of Ethylenethiourea and Propylenethiourea in Hops, Beer and Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 30 (3) (1982) 593–596.

ETILÉNTIOUREA (ETU) VIZSGÁLATA SÖRBEIN

Pápa Á., Soós K. és Domoki J.

Szerzők GLC–FDP és HPLC vizsgáló módszert állítottak be a kómló keze-
lésére is használt etilénbiszditiokarbamát típusú fungicidek stabil, ugyanakkor mu-
tagén, teratogén, karcinogén és goitrogén hatású bomlástermékének, az etiléntio-
ureának (ETU) a meghatározására sörben.

Szerzők a módszer segítségével 1983-ban 40 db, 1985/86-ban 28 db hazai gyár-
tású sörmintából 4-ben, illetve 2-ben mutattak ki ETU-t 0,08–0,13 mg/l, 1985/86-
ban 29 db import sörmintából 8-ban mutattak ki ETU-t 0,01–0,08 mg/l szinten.
Megállapították, hogy a WHO által mai tudásunk szerint sörben megengedhetőnek
tartott 0,1 mg/l ETU-koncentráció figyelembevételével a hazai forgalomban levő
sörök általában nem jelentenek veszélyt a fogyasztókra ETU szempontjából, mégis
szükségesnek tartják a kómló növényvédelmének fokozott hatásági ellenőrzését
és az import sörök szűrőpróbaszerű, rendszeres vizsgálatát ETU-ra.

INVESTIGATION OF ETHYLENETHIOUREA (ETU) IN BEER

Pápa, A., Soós, K. and Domoki, J.

The authors set the GLC–FDP and HPLC examining method for the deter-
mination of Ethylenethiourea (ETU) in beer. This compound is of stationary but
mutagen, teratogen, karcinogen and goitrogen effect disintegration product of the
ethylenbisdithiocarbamate type fungicides and it is used for treatment of the hop.
The authors detected by means of method 0,08–0,13 mg/l ETU in 1983 from 40
domestic beer samples in 4 samples and in 1985–86 from 28 domestic beer samples
in 2 samples besides they detected 0,01–0,08 mg/l ETU in 1985–86 from 29 import
beer samples in 8 samples. They established the domestic beers generally don't
mean danger for the consumers because the WHO let 0,1 mg/l ETU in beer acco-
ding to our today's knowledge but they deem necessary that increased officir-
control of plant protection of the hop should be done and the ETU of usually
control in the nature of random test in import beer.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТИЛЕН-ТИО-МОЧЕВИНЫ (ЭТМ) В ПИВЕ

А. Папа, К. Шоош и Й. Домоки

Авторы разработали GLC—FDP и HPLC метод определения в пиве стабильного продукта распада применяемого для обработки хмеля фунгицида этилен-бис-дитио-карбаматного типа — этилен-тио-мочевины, который обладает мутагенным, тератогенным, карциногенным и гоитрогенным действиями.

Приведенным в статье методом авторы в 1983 году в 40 пробах пива венгерского производства, в 1985/86 г. в 28 пробах пива отечественного производства обнаружили 4-е пробы, и также 2-е пробы с содержанием ЭТМ в количестве 0,08—0,13 мг/л. Из 29 проб импортного пива, проанализированных авторами в 1985/86г. в 8-и пробах было обнаружено присутствие ЭТМ в количестве 0,01—0,08 мг/л. Авторы установили, что определяемые количества ЭТМ в пиве находились на уровне предельно-допустимых количеств ЭТМ, предписанных ФАО—ВОЗ — 0,1 мг/кг, и таким образом поступающее в торговую сеть пиво не представляло опасность для здоровья потребителей с точки зрения содержания ЭТМ. Однако, авторы считают необходимым проведение усиленного ведомственного контроля ядохимикатной защиты хмеля и также регулярную проверку импортного пива на содержание ЭТМ.

BESTIMMUNG VON ETHYLENTIOUREA (ETU) IM BIER

Pápa, Á., Soós, K. und Domoki, J.

Verfasser haben eine GLC—FDP und HPLC Untersuchungsmethode zur Bestimmung von Ethylentiourea (ETU) im Bier angewandt, das ein stabiles, mutagenes, teratogenes, karzinogenes und goitrogenes Zersetzungsprodukt aus auch zur Behandlung von Hopfen eingesetzten fungiziden Ethylenbisditiokarbamat-Typen ist. Mit Hilfe der Methode wurde 0,08 bis 0,13 mg/dm³ ETU 1983 aus 40 einheimischen Bierproben in 4 und 1985/86 aus 28 in 2 sowie 1985/86 aus 29 Importbierproben in 8 0,01 bis 0,08 mg/dm³ ETU nachgewiesen. Es wird festgestellt, daß unter Berücksichtigung der durch die WHO im Bier zugelassenen 0,1 mg/dm³ ETU-Konzentration die sich im einheimischen Verkehr befindenden Biere durch ETU keine Gefahr für die Verbraucher darstellen. Trotzdem wird die verstärkte behördliche Kontrolle beim Pflanzenschutz vom Hopfen und die stichprobenweise regelmäßige Überprüfung der Importbiere für erforderlich gehalten.