

Dr.sc. WALTER FRITZ, Dr. WOLF-JÜRGEN UHDE, Zentralinstitut für Ernährung in Potsdam-Rehbrücke, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Akademie der Wissenschaften der DDR

Předneseno na Pivovarsko-sladařských dnech 19. a 20. 11. 1981, Hradec Králové

1. K problematice

Komise expertů Světové zdravotnické organizace (WHO) vyslovila již v roce 1964 názor, že více než tři čtvrtiny všech onemocnění lidí rakovinou je způsobeno vnějšími faktory, takže většinu onemocnění je možné předcházet [1]. Vyloučení nebo kvantitativní snížení kauzálních chemických kancerogenů v lidském organismu představuje tedy rozhodující příspěvek ke snížení rizika rakoviny u lidí. Z dosud známých asi 2000 škodlivin [2] náleží k nejznámějším kancerogenům z výživy nitrosaminy, polycyklické aromatické uhlovodíky a mykotoxiny. Podle našich zjištění se potravinami přijímá např. denně asi 0,5 až 2,5 μg benzo[a]pyrenu, tj. ročně 0,2 až 1,0 mg, z čehož pouze 1 až 5 % potravou přijatého kancerogenního benzo[a]pyrenu pochází z piva [3].

Kancerogenní účinek nejdůležitějšího nitrosaminu, tj. dimetylnitrosaminu (DMNA), zjistili pokusy na zvířatech Magee a Barnes [4]. Popudem k výzkumu byla onemocnění průmyslových dělníků ve Velké Británii 1954 (rozpuštědla). V roce 1961 se vyskytla v Norsku těžká rakovinná poškození jater přežvýkavců, krmných rybí moučkou ze sledů, obsahující dusitany. Ender aj. [5] zjistili jako příčinu DMNA. Již r. 1937 popsal Freund [6] případy akutních otrav chemiků DMNA, Weissburger a Rainer [7] referovali o třech případech rakoviny jater.

Podle hodnocení IARC [8] se nitrosaminy řadí k silně účinným kancerogenům, které podle Bogorowskiho [9] vyvolávaly u všech 39 dosud testovaných druhů zvířat, včetně lidopů, rakovinu na různých orgánech, jako játra, ledviny, žaludek, tenké a tlusté střevo, pankreas apod. Nadto mohou působit všeobecně toxicky, mutageně a teratogenně. Z doposud asi 200 testovaných N-nitrososlučenin je zhruba 80 % kancerogenních [10].

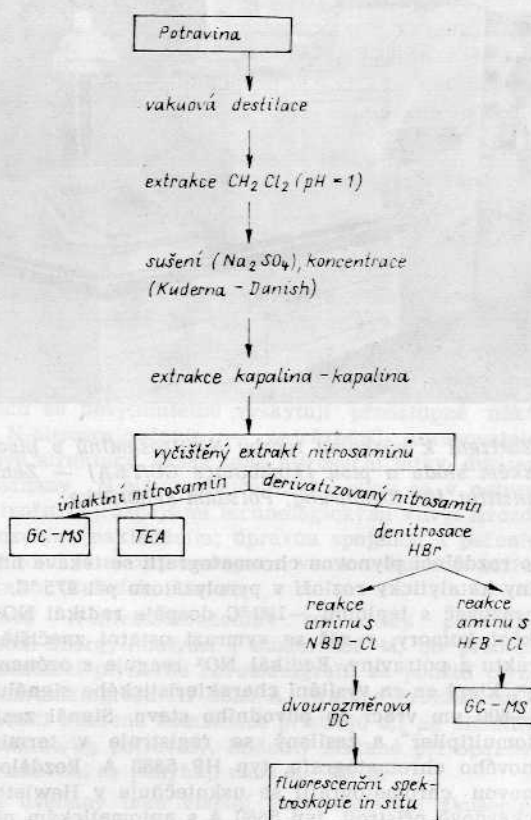
N-nitrososlučeniny představují z potravinářského hygienickotoxikologického pohledu zvláštní problém, neboť v potravinách a pochutinách se nevyhnutelně vyskytují předstupně některých N-nitrososlučenin — nejrůznější nitrosovatelné aminové struktury, ale také nitrosací dusitany a dusičnany [12–15]. Podle hodnocení ohrožení potravinami se v NSR připisuje zvláštní význam kvasnému a nápojovému průmyslu, neboť 64 % nitrosaminů přijatých potravou pochází z piva [10, 16].

V některých státech, jako NSR, USA, Japonsko aj., byly stanoveny hraniční hodnoty obsahu nitrosaminů, které nesmějí být překračovány. Zde je třeba výslovně zdůraznit, že tyto hraniční hodnoty nepředstavují fyziologickou nezávadnost přípustné hladiny, nýbrž spíše tzv. „socially acceptable levels of risk“.

Toto možné ohrožení, vyplývající zřejmě z vysoké konzumace piva, nutně vyžaduje od kvasného a nápojového průmyslu experimentálně zjišťovat možnosti zamezení vzniku nitrosaminů. Kromě zdravotního aspektu má v neposlední řadě velký vliv na zajištění exportu sladu a piva vykazování obsahu nitrosaminů na certifikátech.

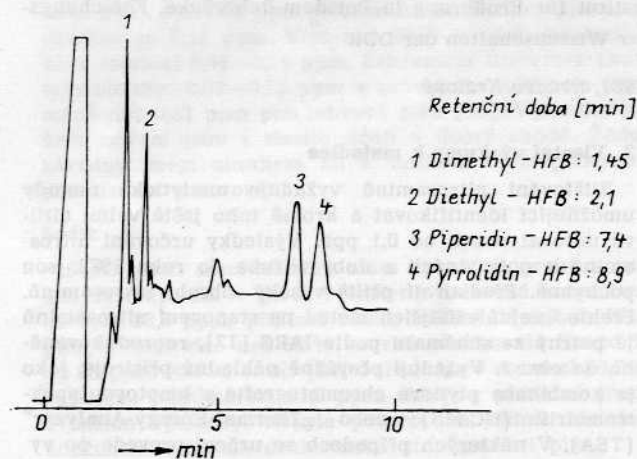
2. Vlastní výzkumy k metodice

Zjišťování nitrosaminů vyžaduje analytické metody umožňující identifikovat a kromě toho ještě velmi citlivě určovat obsah od 0,1 ppb. Výsledky určování nitrosaminů v potravinách z doby zhruba do roku 1972 jsou pochybné. Předstírají příliš vysoký obsah nitrosaminů. Přehled nejdůležitějších metod na stanovení nitrosaminů je patrný ze schématu podle IARC [17], reprodukováného na obr. 1. Vyžadují převážně nákladné přístroje, jako je kombinace plynové chromatografie s hmotovou spektrometrií (GC-MS) nebo „Thermal-Energy-Analyzer“ (TEA). V některých případech se určení provede po vytvoření derivátu: oxidace na nitraminy nebo konverze s heptafluorbutyrylchloridem (HFB-Cl). Poslední derivát lze velmi citlivě identifikovat hmotovou spektrometrií (obr. 2). Podle našich zkušeností není konverze v extraktu potravin HFB-Cl kvantitativní ve stopových množstvích a tím není reprodukovatelná.



1. Schéma nejdůležitějších metod na stanovení těkavých nitrosaminů v potravinách

K výzkumu tvorby N-nitrososloučenin v pivovarském sladu a pivu používá Zentralinstitut für Ernährung od podzimu 1980 zařízení patrné na obr. 3. Těkavé nitrosaminy se nahromadí vakuovou destilací (obr. 4) slabě alkalické suspenze potraviny, destilát se okyslí na $\text{pH} = 1$, podrobí se extrakci kapalina—kapalina s dichlórmetanem (CH_2Cl_2) a v dalším se koncentruje v Kuderňově-Danishově evaporátoru [19]. K určení slouží nitrosaminselektivní Thermal-Energy-Analyzer, typ 502A, jehož funkce je schematicky znázorněna na obr. 5.



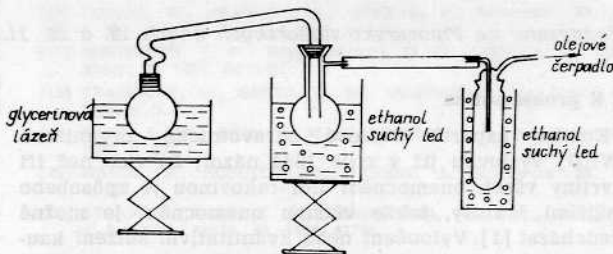
2. Plynový chromatogram směsi HFB-nitrosaminů [1 ng/ μl]



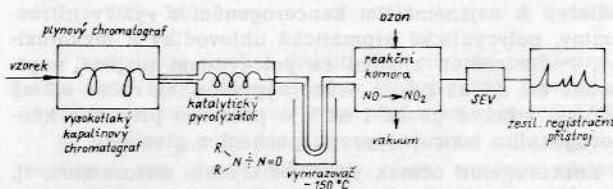
3. Zařízení k výzkumu tvorby N-nitrosaminů v pivovarském sladu a pivu (kombinace GC/TEA) — Zentralinstitut für Ernährung, Potsdam-Rehbrücke

Po rozdělení plynovou chromatografií se těkavé nitrosaminy katalyticky rozloží v pyrolyzátoru při 475°C . Přes vymrazovač s teplotou -190°C dospěje radikál NO^\bullet do reakční komory, v níž se vymrazí ostatní znečištěniny extraktu z potraviny. Radikál NO^\bullet reaguje s ozónem na NO_2^\bullet , který se za vysílání charakteristického signálu při 600–800 nm vrací do původního stavu. Signál zesílí „fotomultiplier“ a zesílený se registruje v terminálu plynového chromatografu, typ HP 5880 A. Rozdělování plynovou chromatografií se uskutečňuje v Hewlettově-Packardově přístroji, typ 5880 A s automatickým přísunem vzorků. Pyrolyzátor TEA byl z přístroje odstraněn a plynový chromatograf přímo spojen s kolonou. K eliminaci teplotního spádu bylo mezi přechod kolona —

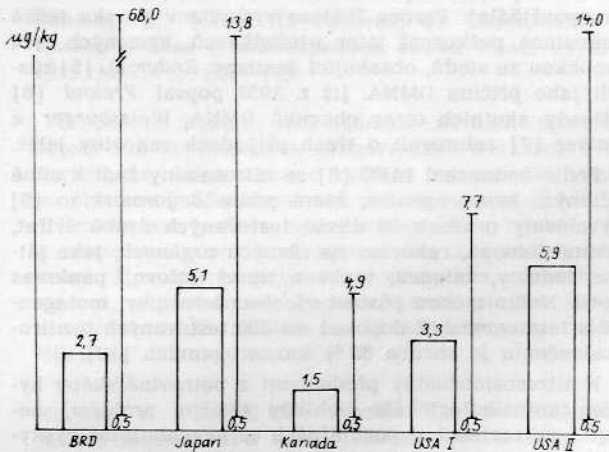
pyrolyzátor zařazeno doplňkové topení, ovládané od terminálu plynového chromatografu. Analýza probíhá vždy za přísady dipropyl-nitrosaminu jako vnitřního standardu, aby se eliminovaly možné ztráty při zpracování extraktu z potraviny. Při použití automatického přísunu vzorků se používá z důvodů ochrany práce jako vnitřní standard ethyl-terc. butyl-nitrosamin, který popsal Druckrey [20] jako nekancerogenní. Absolutní citlivost TEA odpovídá pro DMNA 0,01 ng, citlivost důkazu za zvolených experimentálních podmínek [19] $0,1 \mu\text{g/kg}$, výtěžky opakovaného zjišťování se obvykle pohybují mezi 80–90 %, jak bylo zjištěno také jinými autory.



4. Schéma zařízení na vakuovou destilaci



5. Schéma funkce TEA (Thermal-Energy-Analyzer)



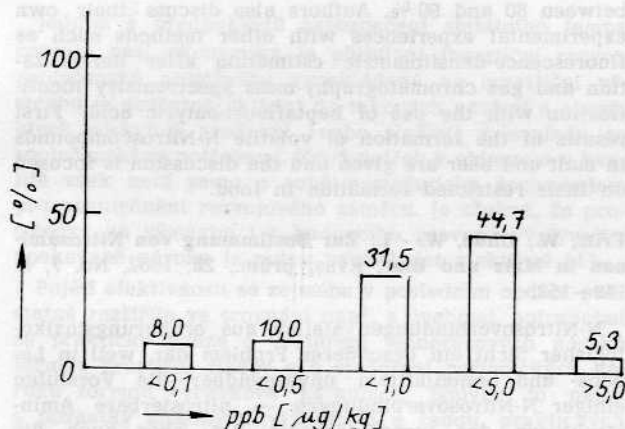
6. Průměrný obsah DMNA v pivech

Identifikace se provádí ve vybraných případech hmotovou spektrometrií. K určování těkavých nitrosaminů byla v současné době zvolena kombinace chromatografie s TEA s ohledem na reprodukovatelnost, selektivitu, rychlost analýzy a citlivost.

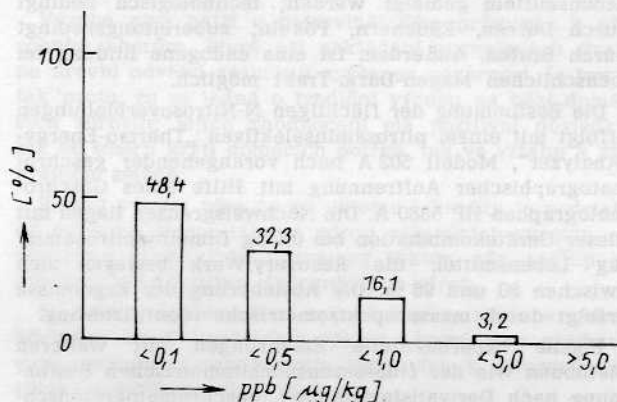
3. Přímé určování nitrosaminů plynovou chromatografií detektorem TEA

Ocelová kolona délky 10 ft (= 3 m) s 10 % Carbowax 20 M-TPA na 80/100 mesh, Carbosorb WAW
Teplota injektoru: 200°C
Teplota kolony: 150°C
Pomocné topení: 150°C

Nosný plyn: argon, 30 ml/min
Detektor TEA TEA 502 A, Thermo Electron Corp., Waldham, Mass., USA
Pyrolyzátor: 475 °C
Vymrazovací teplota: -190 °C
TEA-Vakuum „GC Mode“: 0,55 mm
Injekovaný objem: 1–4 µl
Zpracování vzorků sladu a piva je obdobné pracovnímu předpisu, který jsme publikovali [19].



7. Procentní obsah DMNA v pivovarských sladech NDR



8. Procentní obsah DMNA ve vybraných pivech NDR

4. Nitrosaminy ve sladu a pivu

Přehled o obsahu DMNA v pivovarském sladu a pivu je patrný z obr. 6–8 [viz též [10, 22, 23]]. Vyšší obsahy DMNA byly zjištěny ve vícečetných pivech. Světla piva typu Vollbier (Pils, Export) vykazují zřetelně nižší hodnoty. Ze světlových údajů vyplývá, že DMNA obsažený v pivě pochází ze sladu. V procesu výroby sladu se podařilo lokalizovat hvozdění jako rozhodující úsek pro vznik DMNA se zjištěním, že zvláště na hvozdech s přímým otopem se produkují slady s vyšším obsahem DMNA. Nitrosamin vzniká při hvozdění reakcí aminů ve hvozděném sladu s kyselinou dusitou, která se tvoří z oxidů dusíku a vody z paliva, popř. spalovacího vzduchu. Z toho plyne, že tvorbu DMNA ve sladu primárně ovlivňuje vznik oxidů dusíku v horkém technologickém vzduchu, neboť na obsah aminů buď již přítomných, nebo vznikajících v procesu klíčení, lze sotva působit. Závislost vzniku oxidů dusíku na používaném palivu, jako olej, zkapalněný plyn, koksárenský a zemní plyn, byla prokázána [10], naproti tomu nejsou známy tyto závislosti při používání kamenného uhlí a koksů [21].

Možnosti minimalizace obsahu DMNA v pivovarském sladu a pivu lze hodnotit takto [21]:

Podle současného stavu vědomostí neexistuje v pivovarském varním procesu přijatelné řešení na snížení obsahu DMNA pod 0,5 ppb. Těžištěm pro redukci obsahu DMNA jsou technologické změny ve sladovně, zejména v úseku hvozdění. Nejjistější variantou je přebudování hvozdů s přímým otopem na nepřímý otop. Další možnosti je změna topného systému, např. u olejových, popř. plynových hořáků, u nichž probíhá spalování s velkým přebytkem vzduchu. Přívodem plynného SO₂ lze dosáhnout snížení obsahu DMNA až pod 5 ppb. Také kropení zeleného sladu více hodin před začátkem hvozdění přispívá k redukci obsahu nitrosaminů.

Přeložil Dr. Ing. Alois Lhotský

Literatura

- [1] WHO Technical Report Series No. 276, Prevention of Cancer, Genf, 1964
- [2] TEICHMANN, B., SCHRAMM, T., TEICHMANN, M.: Substanzen mit kanzerogener Wirkung. Adw. der DDR, Zentralinst. für Krebsforsch., Berlin-Buch 1979
- [3] FRITZ, W.: Untersuchungen über Quellen und Umfang der Kontamination mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen sowie Möglichkeiten ihrer Reduzierung. Dissertation B, Humboldt-Universität 1981.
- [4] MAGEE, P. N., BARNES, J. M.: Brit. J. Cancer **10**, 1956, s. 114
- [5] ENDER, F., HAVRE, G., Helgeborstard, A., Koppang, N., MADSEN, R., CEH, L.: Naturwiss. **51**, 1964, s. 637
- [6] FREUND, H. A.: Ann. Int. Med. **10**, 1937, s. 1144
- [7] WEISBURGER, J. H., RAINERI, R.: Toxicol. and Appl. Pharmacol. **31**, 1975, s. 369
- [8] IARC-Monogr.: On the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 17, 1978
- [9] BOGOVSKI, P., BOGOVSKI, S.: Int. J. Cancer **27**, 1981, s. 471
- [10] EISENBRAND, G.: N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Wiss. Verlagsgesellsch. Stuttgart 1981
- [11] TEICHMANN, B., SCHRAMM, T.: AIRC Scientific. Publ. **25**, 1979, s. 203
- [12] FRITZ, W., UHDE, W.-J.: Vorkommen und lebensmittel-hygienisch-toxikologische Einschätzung von N-Nitrosoverbindungen. Studie G 1, Zentralinstitut für Ernährung, Potsdam-Rehbrücke, 1978
- [13] FRITZ, W., UHDE, W.-J.: Ernährungsforsch. **25**, 1980, s. 17
- [14] FRITZ, W., UHDE, W.-J.: Ernährungsforsch. **24**, 1979, s. 181
- [15] FRITZ, W., UHDE, W.-J.: Ernährungsforsch. **24**, 1979, s. 146
- [16] SPIEGELHALDER, B.: osobní sdělení, 1981
- [17] IARC Scientific Publ. **18**, 1978
- [18] KLIMISCH, H.-J., AMBROSIUS, D.: J. Chromatogr. **121**, 1976, s. 93
- [19] FRITZ, W., UHDE, W.-J.: Nahrung **24**, 1980, s. 471
- [20] DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, R., SMÄHL, S.: Z. Krebsforsch. **69**, 1967, s. 103
- [21] Institut für die Gärungs- und Getränkeindustrie, osobní sdělení, 1981

Fritz, W., Uhde, W.-J.: K určování nitrosaminů ve sladu a pivě. Kvas. prům., **28**, 1982, č. 7, s. 149–152.

Z hlediska toxikologie výživy představují N-nitrososloučeniny zvláštní problém, neboť v potravinách a poživatinách se nevyhnutelně vyskytují předstupně některých N-nitrososloučenin — nejrozličnější nitrosovatelné aminové struktury, avšak také nitrosací látky, dusitany a dusičnany. N-nitrososloučeniny mohou se v potravinách tvořit nejrozličnějšími technologickými vlivy: hvozděním, uzením, nakládáním; úpravou spojenou s pečením. Kromě toho je možný endogenní vznik v lidském zažívacím traktu (žaludek, střeva).

Těkavé N-nitrososloučeniny se určují přístrojem „Thermal-Energy-Analyzer“, model 502 M, po předchozím rozdělení plynovou chromatografií za použití plynového chromatografu HP 5880 A. Hranice průkaznosti je při použití uvedené kombinace přístrojů 0,1 µg dimethylnitrosaminu/kg potraviny, hodnoty získané při opakovaném stanovení se pohybují mezi 80–90 %.

Jsou uvedeny také vlastní experimentální zkušenosti autorů s dalšími metodami, jako fluorescenčně-densitometrickým určením po derivatizaci, popř. plynověchromatografickou-hmotově spektrometrickou identifikací s použitím derivátů kyseliny heptafluoromáselné.

Konečně byly předloženy první výsledky šetření o vzniku těkavých N-nitrososloučenin v pivovarském sladu a pиву a diskutován z hlediska výživy toxikologický význam jejich tvorby i možnosti omezování vzniku.

Фритз, В., Угде, Ю. В.: К определению нитрозаминов в солоде и пиве. Квас. прум., 28, 1982, № 7, стр. 149—152.

С точки зрения токсикологии питания N-нитрозосоединения представляют собой особую проблему, так как в пищевых продуктах неизбежно встречаются предварительные степени некоторых N-нитрозосоединений: некоторые нитрозируемые аминовые структуры, однако также нитрозирующие вещества, азотисто- и азотно-кислые соли. N-нитрозосоединения в пищевых продуктах могут образоваться под разными технологическими действиями: при сушке солода, копчении, при мариновании, обработке для жарения. Кроме того возможно эндогенное возникновение в пищеварительной системе человека (желудок, кишка).

Летучие N-нитрозосоединения устанавливаются при помощи прибора „Thermal-Energy-Analyzer“, модель 502 M, после предварительного разделения путем газовой хроматографии с применением газового хроматографа HP 5880 A. Предел различаемости при использовании комбинации приведенных приборов составляет 0,1 µg диметилнитрозамина/кг пищевого продукта; величины, полученные при повторном определении колеблются от 80 до 90 %.

Приведен также собственный экспериментальный опыт авторов с другими методами, как флуоресцентно-денситометрическим определением после дериватизации, или же газовой хроматографико-масс-спектрометрическим идентифицированием и применением производных гептафтормасляной кислоты.

Наконец были представлены первые результаты исследования образования летучих N-нитрозосоединений в пивоваренном солоде и в пиве и обсуждалось с точки зрения питания токсикологическое значение их образования и возможности ограничения их возникновения.

Fritze, W. - Uhde, J. W.: Determination of Nitrosamines in Malt and Beer. Kvas. prum., 28, 1982, No. 7, pp. 149—152.

From the standpoint of food toxicology it is necessary to take into account precursors of N-Nitrosocompounds which are present in food and eatables. Among these precursors belong various nitrosable amine structures, nitrosation agents, nitrites and nitrates. The N-Nitrosocompounds in food can be formed during various tech-

nological procedures such as: kilning, smoking, curing and a treatment before baking. In addition, also the endogen formation of nitrosamines in a digestive tract of men is possible. The volatile N-Nitrosocompounds can be determined by „Thermal-Energy-Analyzer“, type 502 M after the separation by gas chromatography using gas chromatograph, type HP 5880 A. The determined concentration is 0,1 µg dimethylnitrosamine per kg of food and the reproducibility for the repeated determinations is between 80 and 90 %. Authors also discuss their own experimental experiences with other methods such as fluorescence-densitometric estimation after derivatization and gas chromatography-mass spectrometry identification with the use of heptafluorobutyric acid. First results of the formation of volatile N-Nitrosocompounds in malt and beer are given and the discussion is focused on their restricted formation in food.

Fritz, W., Uhde, W. - J.: Zur Bestimmung von Nitrosaminen in Malz und Bier. Kvas. prum., 28, 1982, No. 7, S. 149—152.

N-Nitrosoverbindungen stellen aus ernährungstoxikologischer Sicht ein besonderes Problem dar, weil in Lebens- und Genußmitteln unvermeidbar die Vorstufen einiger N-Nitrosoverbindungen — nitrosierbare Aminstrukturen der verschiedensten Art, aber auch die Nitrosierungsmittel Nitrit und Nitrat — vorkommen. N-Nitrosoverbindungen können auf vielfältige Weise in Lebensmitteln gebildet werden: technologisch bedingt durch Darren, Räuchern, Pökeln; zubereitungsbedingt durch Braten. Außerdem ist eine endogene Bildung im menschlichen Magen-Darm-Trakt möglich.

Die Bestimmung der flüchtigen N-Nitrosoverbindungen erfolgt mit einem nitrosaminselektiven „Thermo-Energy-Analyzer“, Modell 502 A nach vorangehender gaschromatographischer Auftrennung mit Hilfe eines Gaschromatographen HP 5880 A. Die Nachweisgrenzen liegen mit dieser Gerätekombination bei 0,1 µg Dimethylnitrosamin/kg Lebensmittel, die Recovery-Werte bewegen sich zwischen 80 und 90 %. Die Absicherung der Ergebnisse erfolgt durch massenspektrometrische Identifizierung.

Eigene experimentelle Erfahrungen mit weiteren Methoden wie der fluoreszenzdenzitometrischen Bestimmung nach Derivatisierung bzw. gaschromatographisch-massenspektrometrische Identifizierung mit Hilfe von Heptafluorbuttersäurederivaten werden mitgeteilt.

Ergebnisse zur Bildung von flüchtigen N-Nitrosoverbindungen in Braumalz und Bier werden vorgestellt. Die ernährungstoxikologische Bedeutung der Bildung von Nitrosaminen in Braumalz und Bier und Möglichkeiten ihrer Reduzierung werden diskutiert.