

Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., LADISLAV VESELÝ, Ing. BOHUMIL ŠPINAR, CSc.,  
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 120 44 Praha 2

**Klíčová slova:** *N-nitrosaminy, celkové N-nitrososloučeniny, ATNC, dusičnany, pivo, slad, potraviny*

## 1. ÚVOD

Postupný nárůst informací o škodlivosti N-nitrosaminů a jejich výskytu v potravinách zvyšoval tlak na zdokonalování analytických postupů k jejich stanovení. Z ryze praktických důvodů bylo rozhodnuto, že pro analytické účely se N-nitrosaminy budou dělit na těkavé a netěkavé. Těkavé jsou ty, které lze z potravinové matrice vydestilovat s výtěžností nejméně 70 % buď destilací s vodní parou nebo destilací vakuovou, případně destilací za normálního tlaku, a lze je stanovit bez derivatizace pomocí plynové chromatografie. Všechny ostatní jsou tzv. netěkavé [1, 2].

Analytika těkavých N-nitrosaminů je v současnosti již dobře propracována a stala se rutinní záležitostí [3, 4, 5], což je dáno relativně jednoduchou přípravou vzorků. Byla provedena řada mezinárodních kruhových testů, obvykle organizovaných Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) v Lyonu [3, 6].

Totéž nelze říci o metodice stanovení netěkavých N-nitrososloučenin. Do této skupiny patří např. dialkylnitrosaminy s dlouhými řetězci, N-nitrosoaminokyseliny, hydroxylované nitrosaminy, N-nitrosamidy (nitrosomočoviny, nitrosoguanidiny, nitrosopeptidy), N-nitrosoderiváty různých pesticidů aj. [1]. Tato problematika je nyní v popředí zájmu, neboť bylo prokázáno, že z netěkavých N-nitrososloučenin mohou vznikat karcinogenní těkavé N-nitrosaminy [7]. Obsah netěkavých N-nitrososloučenin

navíc v různých potravinách mnohonásobně převyšuje koncentrace N-nitrosaminů těkavých [7, 8, 9].

## 2. ANALYTIKA NETĚKAVÝCH N-NITROSO-SLOUČENIN

Vzhledem k tomu, že netěkavé N-nitrososloučeniny se od sebe značně liší chemickými i fyzikálními vlastnostmi, je vypracování metodiky na stanovení konkrétních sloučenin velice obtížné.

Bylo popsáno mnoho analytických postupů stanovení některých konkrétních N-nitrososloučenin nebo jejich skupin, např. N-nitrosoaminokyselin (volných i vázaných), hydroxylovaných N-nitrososloučenin, N-nitrosamidů atd. [1, 2]. Některé postupy využívají derivatizace netěkavých N-nitrososloučenin na těkavé sloučeniny [8, 10] a následného stanovení těchto derivátů pomocí plynové chromatografie. Výsledky však nejsou v mnoha případech uspokojivé.

Shuker a Tannenbaum [11] vyvinuli detektor, kde proud efluentu z vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) je ozařován výbojem o vysoké intenzitě. Detekce byla provedena ve viditelné oblasti spektra. Uvedený systém byl použit pro N-nitrosomočoviny, N-nitrosoguanidin a N-nitrosoglykocholovou kyselinu v žludečnických šťávách a moči [11].

Většina postupů využívá spojení HPLC s chemiluminis-

cenčním detektorem TEA. *Massey et al.* [12] použili spojení HPLC s reversní fází s chemiluminiscenčním detektorem TEA ke stanovení iontových N-nitrosaminů. *Ruhl a Reusch* [13] podobným způsobem analyzovali dialkylnitrosaminy. *Massey et al.* [14] publikovali postup stanovení polárních N-nitrosaminů v potravinách za použití normální HPLC-TEA. *Havery* [15] prováděl pomocí HPLC-TEA stanovení N-nitrosoprolinu a N-nitrosotrimethylmočoviny.

Vzhledem ke značné různorodosti netěkavých N-nitrososloučenin byla snaha vyvinout univerzální metodu ke stanovení jejich sumární koncentrace. Obecně se vžila anglická zkratka ATNC (apparent total N-nitroso compounds), která označuje zdánlivé celkové N-nitrososloučeniny, přičemž touto metodou nelze určit strukturu těchto látek.

## 2.1 METODY STANOVENÍ ATNC

Jednu z prvních metod na stanovení celkového obsahu N-nitrososloučenin publikovali *Walters et al.* [16]. Je založena na adsorpci těkavých i netěkavých N-nitrososloučenin z vodného roztoku na aktivní karborafin s následnou elucí horkým methanolem. Detekce byla provedena diferenční pulsní polarografií. Značnou nevýhodou této metody je silné ovlivnění výsledků přítomností dusičnanů a lipidů, které je třeba odstraňovat ještě před adsorpcí nitrososloučenin.

Používané metody lze zhruba rozdělit na dvě skupiny. Do první patří metody založené na fotolýze UV zářením za vzniku  $\text{HNO}_2$  a následné kolorimetrické detekci pomocí Griessova činidla [17].

Do druhé skupiny řadíme metody, které používají chemický rozklad N-NO skupiny pomocí HBr v kyselině octové a uvolněný nitrosylbromid, případně oxid dusnatý, je stanoven kolorimetricky nebo pomocí chemiluminiscenčního detektoru. Tuto metodu popsali *Walters et al.* v roce 1978 [18]. Detailně byl celý postup včetně používané aparatury popsán *Waltersem et al.* v roce 1983 [19]. Zdokonalení metody provedli *Massey et al.* [20, 21], kteří za ideálních podmínek dosáhli u pětkrát opakovaného stanovení variační koeficient 9,7 % při koncentraci 18,8  $\mu\text{g/kg}$  a 5,1 % při koncentraci 94,0  $\mu\text{g/kg}$  při šesti opakováních [21]. Srovnáním předností a nedostatků těchto metod se zabývali *Walters et al.* [22].

*Sen a Seaman* [23] ke stanovení ATNC využili spojení HPLC-TEA. Tato metoda byla vyvinuta *Waltersem et al.* [24]. Štěpení vazby mezi dusíkem a nitrosylovou skupinou pomocí HBr v kyselině octové k tomuto účelu poprvé popsali *Eisenbrand a Preussmann* [25].

## 3. VÝZNAM NETĚKAVÝCH N-NITROSOSLOUČENIN V SOUČASNÉM PIVOVARSTVÍ

Zájem o problematiku N-nitrososloučenin v potravinách a hlavně v pivu a ve sladu značně vzrostl poté, když byly vyvinuty potřebné citlivé metody stanovení [3].

Vzhledem k chemismu vzniku nitrosaminů je závažná souvislost s problematikou dusičnanů. N-nitrosaminy vznikají obecně reakcí jakékoliv aminokyseliny s nitrosačním činidlem [2]. Tímto činidlem jsou obecně dusitany, které snadno vznikají redukcí dusičnanů [26].

Koncentrace dusičnanů ve varních vodách a dalších pivovarských surovinách neustále vzrůstá, což se projevuje



vrzrstem obsahu i v pivu [27, 28]. Hlavním zdrojem dusičnanů v pivu je voda a chmel, podíl ze sladu je zanedbatelný, přičemž ze surovin přecházejí dusičnany do mladiny téměř kvantitativně [27].

Netěkavé nitrososloučeniny tvoří přibližně 90 % všech ATNC, a i když jsou méně karcinogenní, velmi snadno z nich vznikají nitrosaminy těkavé, což jsou jedny z nejsilnějších karcinogenů [7].

K nejběžnějším prekursorům netěkavých N-nitrososloučenin v biologických materiálech patří prolin, hydroxyprolin a sarkosin. Všechny tyto sloučeniny jsou nitrosovatelné, ať už ve volném stavu nebo jako N-terminální aminokyselina peptidického řetězce. Kromě toho mohou podléhat nitrosaci imin skupiny tryptofanu a histidinu a guanidinová skupina argininu. Aminokyseliny tvoří diketopiperaziny, ze kterých mohou rovněž vzniknout netěkavé N-nitrososloučeniny [29].

Ve snaze objasnit v jaké výrobní fázi piva netěkavé nitrososloučeniny vznikají, bylo zjištěno, že přímý příspěvek sladu a dalších surovin je malý. V literatuře jsou uváděny ve sladu koncentrace 8 až 256 ppb (tj.  $\mu\text{g/kg}$ ) N-nitrosoprolinu (NPRO) a stopy až 20 ppb N-nitrososarkosinu (NSAR) [7]. Koncentrace ATNC v 53 vzorcích sladu činily maximálně 400 ppb v závislosti na způsobu hvozdu. Sírění nemá prakticky na koncentraci ATNC vliv. Do sladiny se z celkového množství extrahuje pouze 20–30 % ATNC ze sladu [30]. Z toho samotný NPRO představuje asi desetinu. Zbytek ATNC je dosud neznámé struktury. Na základě nepřímých důkazů lze usuzovat, že většina ATNC obsahuje v molekule karboxylovou skupinu a jedná se o látku nízkomolekulární [31].

Z průměrných koncentrací ATNC ve sladu lze vypočítat, že jen výjimečně by mohly koncentrace ATNC v pivu překročit hranici 20 ppb, což je doporučený limit pro obsah těchto látek v pivu [32]. Reálné koncentrace ATNC jsou často mnohem vyšší, takže je zřejmé, že tyto látky vznikají až v průběhu výroby piva [26]. Při sledování zdroje ATNC v pivu bylo zjištěno, že ke vzniku ATNC vedou hlavně nitrosační reakce v průběhu hlavního kvašení, kdy v důsledku mikrobiální kontaminace gramnegativními bakteriemi rodu *Obesumbacterium proteus* dochází k redukci dusičnanů na dusitany [26, 33]. Vznik ATNC lze někdy pozorovat i v dřívějších fázích pivovarského procesu, např. při rmutování [34]. V literatuře se uvádí, že zhruba z 10 ppm dusičnanů (tj.  $\text{mg/kg}$ ) vzniká v přítomnosti těchto bakterií téměř 100 ppb ATNC [32]. *Calderbank* a *Hammond* popisují vznik ATNC i v přítomnosti pouze 5  $\text{mg}$  dusičnanů v 1 l [32].

V současné době existují způsoby, jak vznik ATNC omezit. Je to především:

- snaha použít varní vodu a ostatní suroviny s co nejnižší koncentrací dusičnanů (biologická denitrifikace, ionexy, reverzní osmóza, promývání chmele,  $\text{CO}_2$  chmelový extrakt, atd.);

- snaha omezit kontaminaci kvasinek (promývání kyselinou fosforečnou), mladiny a technologického zařízení (dokonalá a účinná sanitace) [32].

Jedinou jistou zárukou, že ATNC nevzniknou, je podle literatury nepřítomnost gramnegativních bakterií, a to i za přítomnosti dusičnanů [32].

#### 4. METODIKA STANOVENÍ ATNC V PIVU

**Princip:** metodou stanovíme celkový obsah skupiny N-NO ve vzorku. Pomocí roztoku bromovodíku

v kyselině octové se odštěpí nitrosylový radikál. Uvolněný oxid dusnatý je poté detekován chemiluminiscenčním detektorem TEA.

**Přístroje:** chemiluminiscenční detektor TEA 502A (Thermo Electron Corp., USA)

**Chemikálie:** ethylacetát, p. a., Lachema  
kyselina octová, p. a. (98 %), Lachema  
hydroxid draselný, p. a. ( $c = 6 \text{ mol/l}$ ), Lachema  
kyselina sulfanilová, p. a., Lachema  
kyselina sírová, p. a. ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ), Lachema  
kyselina sulfamová, p. a. ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ), Lachema  
bromovodík, p. a., Aldrich Chemical Company, USA  
N-nitrosodimethylamin (NDMA), roztok standardu v ethanolu ( $c = 200 \mu\text{g/l}$ ), Alfa Products, SRN  
mikrokolony SAX Bond Elute, Analytichem International Inc., USA  
dusík žárovkový  
kyslík medicínální  
argon (99,996 %)  
aceton (příp. jiné org. rozpouštědlo)  
pevný oxid uhličitý

Všechny chemikálie byly při použití nové šarže vždy kontrolovány, zda nemají odezvu na detektoru TEA.

**Pracovní postup:** do tříhrdlé zábrusové baňky nadávkuje se 70 ml ethylacetátu, 5 ml denitrosačního činidla (15 % hmot. HBr v kyselině octové) a 1 g kyseliny sulfanilové. Směs se opatrně zahřívá pod zpětným chladičem (reflux asi 1 kapka za min.) a nechá se jemně probublávat argonem kapilárou, která je postranním hrdlem zavedena ke dnu baňky. Po ustavení rovnováhy v aparatuře (ovlivněno průtokem Ar, refluxem v baňce), po ustálení základní linie (asi 15 min.) provedeme nástřik 200  $\mu\text{l}$  standardu NDMA postranním hrdlem, které je uzavřeno septem. Nástřik opakujeme. Poté střídavě nástřikujeme 200  $\mu\text{l}$  vzorku piva a 200  $\mu\text{l}$  standardu. [Pivo k analýze zbavíme  $\text{CO}_2$  a k 5 ml přidáme 1 ml kyseliny sulfamové ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ) a 1 ml kyseliny sírové ( $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ). Roztok přetlačíme asi po 15 min. dusíkem přes kolonku SAX Bond Elute. Tak je pivo zbaveno dusičnanů a dusitanů. Z tohoto objemu nástřikujeme 200  $\mu\text{l}$  množství.] Celá aparatura je hermeticky uzavřena a přes 2 promývačky s roztokem KOH, skleněný kapilární restriktor a 2 vymrazovače (asi  $-80^\circ\text{C}$ ) napojena na detektor TEA.

V průběhu měření dochází ke chvostování píků a citlivost měření se zhoršuje. Proto je třeba po 1 až 1,5 hodině měření přerušit, celou aparaturu rozebrat (včetně teflonových spojovacích hadiček) a promýt destilovanou vodou, acetonem a ethylacetátem. Po důkladném usušení aparaturu sestavíme a pokračujeme další sérií měření.

Minimálně na počátku a na konci série měření je třeba provést slepý pokus.

Parametry detektoru TEA 502 A:

- |                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| – teplota pyrolyzní pece: | asi $500^\circ\text{C}$ |
| – teplota vymrazovače:    | asi $-80^\circ\text{C}$ |
| – průtok kyslíku:         | 20 ml/min.              |



- vakuum: 106,6 Pa (0,8 torrů)
- nosný plyn: argon

Výpočet koncentrace se vztahuje na standard (NDMA), přičemž je třeba eliminovat zředění vzorku piva při jeho přípravě a je-li to třeba, odečíst hodnotu slepého pokusu. Koncentraci ATNC vyjadřujeme jako koncentraci skupiny (N-NO) v  $\mu\text{g/l}$ .

**Použitelnost metody:** Metoda byla ověřována pro vzorky piva, sladiny a mladiny.

**Původ metody:** při postupu jsme vycházeli z popisu *Walterse et al.* [18, 19] a *Masseye et al.* [20].

#### Parametry metody:

Mez stanovitelnosti metody je 20 ppb ATNC, tj. 20  $\mu\text{g}$  (N-NO)/l. Výťažnost metody je  $(90 \pm 6) \%$  při koncentraci 100 ppb (počet měření  $n = 9$ ). Opakovatelnost byla určena na reálném vzorku. Pro  $n = 11$  byla nalezena průměrná koncentrace ATNC  $\bar{x} = 57,2$  ppb, směrodatná odchylka průměru  $s_{\bar{x}} = 1,5$  ppb. Tyto získané parametry jsou v dobré shodě s údaji, které uvádějí *Massey et al.* [34].

## 5. ZÁVĚR

Doposud jsme změřili asi 60 piv a nalezené koncentrace ATNC se pohybovaly v rozmezí pod limitem detekce až do 390 ppb. Tyto hodnoty se shodují s údaji, které lze najít v literatuře [26, 34]. V některých případech bude třeba podniknout kroky, které povedou ke snižování hladiny ATNC v pivu.

#### Literatura

- [1] KUBACKI, S. J.: *Pure Appl. Chem.*, **51**, 1979, s. 1367.
- [2] HOTCHKISS, J. H.: *Adv. Food Res.*, **31**, 1987, s. 53.
- [3] HOTCHKISS, J. H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 1981, s. 1037.
- [4] KELLNER, V., ČULÍK, J., BASAŘOVÁ, G.: *Kvas. prům.*, **28**, 1982, s. 99.
- [5] ČULÍK, J. et al.: *Kvas. prům.*, **35**, 1989, s. 289.
- [6] CASTEGNARO, M., MASSEY, R. C., WALTERS, C. L.: *Food Addit. Contam.*, **4**, 1987, s. 37.
- [7] POLLOCK, J. R. A.: *J. Inst. Brew.*, **87**, 1981, s. 356.
- [8] KUSHNIR, I. et al.: *J. Food Sci.*, **40**, 1975, s. 427.
- [9] DHONT, J. H., VAN INGEN, C.: *IARC Sci. Publ.*, **14**, 1976, s. 355.
- [10] SCHMELZ, I., ABIDI, S., HOFFMANN, D.: *Cancer Lett.*, **2**, 1977, s. 125.
- [11] SHUKER, D. E. G., TANNENBAUM, S. R.: *Anal. Chem.*, **55**, 1983, s. 2152.
- [12] MASSEY, R. C. et al.: *J. Chromatogr.*, **236**, 1982, s. 527.
- [13] RUHL, C., REUSCH, J.: *J. Chromatogr.*, **382**, 1985, s. 362.
- [14] MASSEY, R. C., CREWS, C., McWEENY, D. J.: *J. Chromatogr.*, **241**, 1982, s. 423.
- [15] HAVERY, D. C.: *J. Anal. Toxicol.*, **14**(3), 1990, s. 181.
- [16] WALTERS, C. L., JOHNSON, E. M., ROY, N.: *Analyst*, **95**, 1970, s. 485.
- [17] DIKUN, P. P.: *IARC Sci. Publ.*, No. **14**, 1976, s. 57.
- [18] WALTERS, C. L. et al.: *Analyst*, **103**, 1978, s. 1127.
- [19] WALTERS, C. L., HART, R. J., SMITH, P. L. R.: *IARC Sci. Publ.*, No. **45**, 1983, s. 295.
- [20] MASSEY, R. C. et al.: *Food Addit. Contam.*, **1**, 1984, s. 11.
- [21] MASSEY, R. C. et al.: *Food Addit. Contam.*, **1**, 1984, s. 237.
- [22] WALTERS, C. L., SMITH, P. L. R., REED, P. I.: *IARC Sci. Publ.*, No. **57**, 1984, s. 113.
- [23] SEN, N. P., SEAMAN, S.: *IARC Sci. Publ.*, No. **57**, 1984, s. 137.
- [24] WALTERS, C. L., HART, R. J., PERSE, S.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **169**, 1979, s. 1.
- [25] EISENBRAND, G., PREUSSMANN, R.: *Arzneim. Forsch.*, **20**, 1970, s. 1513.
- [26] MASSEY, R. C. et al.: *IARC Sci. Publ.*, No. **84**, 1987, s. 219.
- [27] KELLNER, V. et al.: Význam netěkavých nitrosaminů v pivovarství. Sborník souhrnných přednášek. Pivovarsko-sladařské dny, Ostrava, 1989.
- [28] TASCHAN, H.: *Brauwelt*, **130**, 1990, s. 1368.
- [29] ISHIBASHI, T., KAWABATA, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 1981, s. 1098.
- [30] JOHNSON, P. et al.: *J. Inst. Brew.*, **93**, 1987, s. 319.
- [31] JOHNSON, P., PFAB, J., MASSEY, R. C.: *Food Addit. Contam.*, **5**, 1988, s. 119.
- [32] CALDERBANK, J., HAMMOND, J. R. M.: *J. Inst. Brew.*, **95**, 1989, s. 277.
- [33] JOHNSON, P., PFAB, J., MASSEY, R. C.: *J. Inst. Brew.*, **94**, 1988, s. 19.
- [34] MASSEY, R. et al.: *Food Addit. Contam.*, **7**, 1990, s. 605.

Lektoroval Ing. Jan Šavel, CSc.

**Kellner, V.—Čulík, J.—Veselý, L.—Špinar, B.: Problematika celkových N-nitrososloučenin.** *Kvas. prům.*, **37**, 1991, č. 7, s. 193–196.

V práci je stručně shrnuta problematika celkových N-nitrososloučenin (ATNC) jak z hlediska analytiky, tak z hlediska pivovarsko-sladařského oboru. Je uvedena metoda stanovení ATNC. Doposud bylo změřeno 60 piv a nalezené koncentrace se pohybují v intervalu pod limitem detekce až do 390  $\mu\text{g}$  (N-NO)/l.

**Келлер, В.—Чулик, Я.—Веселы, Л.—Шпинар, Б.: Проблематика суммарных N-нитросоединений.** *Квас. прум.* **37**, 1991, № 7, стр. 193–196

V работе вкратце описана проблематика суммарных N-нитросоединений (ATNC) как с точки зрения аналитики, так с точки зрения специализации пива и солода. Приводится метод определения ATNC. До сих пор подверглось измерению 60 пив и найденные концентрации колеблются в пределах ниже лимита детектирования вплоть до 390  $\mu\text{g}$  (N-NO)/л.

**Kellner, V.—Čulík, J.—Veselý, L.—Špinar, B.: Problems of N-Nitroso Compounds.** *Kvas. prům.*, **37**, 1991, No. 7, pp 193–196.

The problems of N-nitroso compounds (ATNC) from both the analytical standpoint as well as that of malting-brewing technology are described. The method of ATNC determination is described. Up to now 60 beers have been analysed and the concentrations found are in a range below the detection limit up to 390  $\mu\text{g}$  (N-NO)  $\cdot \text{l}^{-1}$ .

**Kellner, V.—Čulík, J.—Veselý, L.—Špinar, B.: Problematik der gesamten N-Nitrosoverbindungen.** *Kvas. prům.*, **37**, 1991, Nr. 7, s. 193–196.

In der Arbeit wird zusammenfassend die Problematik der gesamten N-Nitrosoverbindungen (ATNC) behandelt, und zwar nicht nur vom Standpunkt der Analytik, sondern auch mit Hinsicht zu der Brau- und Malzindustrie. Es wird die Methode der ATNC-Bestimmung beschrieben. Bisher wurden 60 Bierproben analysiert und die ermittelten Konzentrationen bewegen sich im Intervall unterhalb des Detektionslimits bis zu 390  $\mu\text{g}$  (N-NO)  $\cdot \text{l}^{-1}$ .