

DOI: 10.18832/kp2016001

N-nitrosaminy v 21. století

N-nitrosamines in 21st Century

Tomáš VRZAL^{1,2}, Jana OLŠOVSKÁ¹¹Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, plc., Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2*²Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2 / *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, CZ 128 43 Prague 2*

e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed Paper*

Vrzal, T. – Olšovská, J.: N-nitrosaminy v 21. století. Kvasny Prum. 62, 2016, č. 1, s. 2–8

Dusíkaté karcinogenní látky zvané N-nitrosaminy byly v pivo a sladu poprvé popsány v 70. letech dvacátého století. Jejich prokázaný obsah v pivo v kontextu s významným zdravotním rizikem vedl k vývoji nových technologických postupů, zejména přípravy sladu. Po jejich zavedení do praxe byly koncentrace N-nitrosaminů ve sladu a pivo značně sníženy, a proto zájem o výzkum těchto látek v posledních 15 letech ustoupil na minimum. A to i přes to, že mnohé otázky v této problematice nebyly dosud zodpovězeny. Tento článek je věnován stručnému historickému přehledu problematiky N-nitrosaminů a informuje o nejvýznamnějších dosažených pokrocích v analýze těchto sloučenin za posledních 15 let.

Vrzal, T. – Olšovská, J.: N-nitrosamines in 21st century. Kvasny Prum. 62, 2016, No. 1, pp. 2–8

Carcinogenic nitrogen compounds, N-nitrosamines, were first identified in beer and malt during the 70's of twentieth century. Their proven occurrence in beer, in context with their significant health risk, led to the development of new technological procedures, especially in malt kilning. After these technological changes, concentrations of N-nitrosamines in malts and beers were rapidly decreased and the interest of researchers in these compounds during last 15 years has consequently strongly declined even though some questions concerning these compounds have still not been answered. This article provides a brief historical summary of N-nitrosamines and brings information about the most important advances in analysis of these compounds in the last 15 years.

Vrzal, T. – Olšovská, J.: N-Nitrosamine in 21. Jahrhundert. Kvasny Prum. 62, 2016, Nr. 1, S. 2–8

Erst in den 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurden erstmals die stickstoffhaltigen krebserregenden Stoffe benannte N-Nitrosamine beschrieben. Ihr bewährtes Gehalt im Bier in Zusammenhang mit einem Gefährdungsrisiko für die Menschengesundheit hat zur Entwicklung von neuen technischen Verfahren, insbesondere der Malzherstellung geführt. Nach ihrer Einführung ist wesentlich Gehalt an N-Nitrosamine im Malz und im Bier erniedrigt worden, aus diesem Grund ist in den letzten 15 Jahren sanken Interesse an der Forschung dieser Stoffe zum Minimum, trotzdem dass in dieser Problematik viele Fragen noch nicht erklärt wurden. Dieser Artikel ist zur kurzen historischen Übersicht der N-Nitrosaminen Problematik gewidmet und informiert über bedeutendste Fortschritte, die in den letzten 15 Jahren bei der Analyse dieser Verbindungen geschafft wurden.

Klíčová slova: *N-nitrosaminy, toxicita, pivo, slad, chmel, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, chemiluminiscence***Keywords:** *N-nitrosamines, toxicity, beer, malt, hop, gas chromatography, mass spectrometry, chemiluminescence*

1 ÚVOD

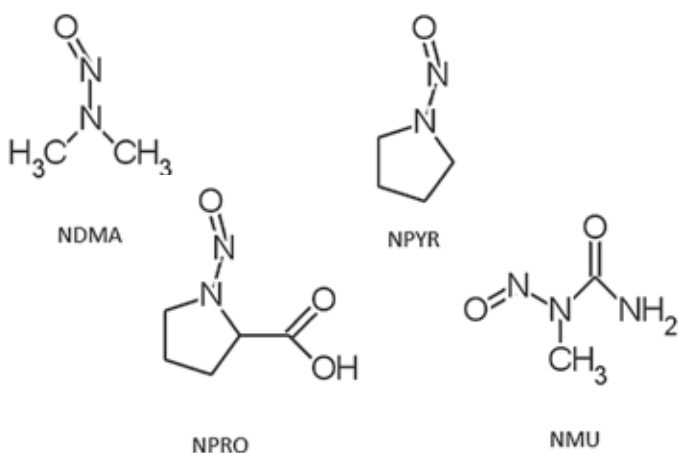
Nitroso sloučeniny jsou látky, které obsahují ve své molekule kovalentně vázanou nitroso skupinu (-NO). Podle atomu, na který je tato skupina vázána, lze dále rozlišovat C-, N-, S- a O-nitroso sloučeniny. Tyto látky mohou vznikat přímým působením nitrosačních činidel na příslušné prekurzory nebo prostřednictvím transnitrosačních reakcí, kdy je nitroso skupina přesunuta z jedné molekuly na jinou (Wainright, 1986a). Nejvýznamnějšími nitroso-sloučeninami v potravinářství jsou N-nitroso-sloučeniny, konkrétně N-nitrosaminy. Sumárně lze tyto látky charakterizovat jako N-nitrosované sekundární aminy s obecnou strukturou $R_1(R_2)N-NO$, kde R_1 a R_2 jsou uhlíkaté zbytky, aromatické cykly, acyly či části heterocyklu. Na principu rozdílné tenze par se N-nitrosaminy, rozlišují na těkavé, málo těkavé a netěkavé. Do skupiny těkavých se zařazují látky s kratšími uhlovodíkovými řetězci nebo jednoduchými nesubstituovanými heterocykly, např. N-nitrosodimethylamin (NDMA). K málo těkavým se řadí například sekundární nitrosaminy, jejichž jeden nebo dva řetězce jsou tvořeny fenylou skupinou např. N-nitrosomethylfenylamin (NMPPhA) a N-nitrosoethylfenylamin (NEPhA). Naopak, netěkavé N-nitrosaminy obvykle obsahují polární skupiny nebo delší alkylové řetězce, a patří sem N-nitrosoamino kyseliny, N-nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny, N-nitrosomočoviny, N-nitrosoamidy a případně další dosud necharakterizované sloučeniny (Francis, 2000). Strukturální vzorce zástupců N-nitroso sloučenin jsou uvedeny na obr. 1.

Řada studií potvrdila, že N-nitrosaminy jsou látky silně karcinogenní a mutagenní (Tricker et al., 1991). Netěkavé N-nitrosaminy byly klasifikovány jako méně toxické, avšak jednoduchými cestami z nich mohou vznikat mnohem toxičtější těkavé N-nitrosaminy. Tyto látky se mohou vyskytovat v různých potravinách, zejména po jejich tepelném zpracování či po přidavku konzervačních solí (Francis, 2000). Jejich přítom-

1 INTRODUCTION

Nitroso compounds contain a covalently bound nitroso (-NO) group in their molecule. They can be further divided into C-, N-, S- and O-nitroso compounds. These substances are formed by direct reaction of nitrosating agents with appropriate precursors or by transnitrosation reactions, in which the nitroso groups are transferred from one molecule to another (Wainright, 1986a). N-nitroso compounds, especially N-nitrosamines, are the most important nitroso compounds in food industry. They can be characterized as N-nitrosated secondary amines with basic structure $R_1(R_2)N-NO$, where R_1 and R_2 are hydrocarbon radicals, aromatic rings, acyls or parts of heterocyclic rings. In terms of volatility they can be classified as volatile, less volatile and non-volatile N-nitrosamines. The group of volatile N-nitrosamines includes in particular compounds with short hydrocarbon chains or with unsubstituted heterocyclic rings, e.g. N-nitrosodimethylamine – NDMA. Less volatile N-nitrosamines are represented for example by compounds with one or two phenyl groups, e.g. N-nitrosomethylphenylamine (NMPPhA) and N-nitrosoethylphenylamine (NEPhA). Conversely, non-volatile N-nitrosamines usually contain polar groups or longer alkyl chains; N-nitroso amino acids, N-nitroso heterocyclic carboxylic acids, N-nitrosoamides, N-nitrosoamides and other as yet uncharacterized compounds belong to the non-volatile group (Francis, 2000). Structures of some N-nitroso compounds are given in Fig. 1.

N-nitrosamines were identified as strongly carcinogenic and mutagenic compounds (Tricker et al., 1991). Less toxic non-volatile N-nitrosamines can be transformed into more toxic volatile N-nitrosamines in a simple way. These compounds can occur in many types of food, especially after heat treatment or addition of preservative salts (Francis, 2000). They were found in grilled meat (Kocak et al.,



Obr. 1 Strukturální vzorce N-nitrosodimethylaminu (NDMA), N-nitrosopyrrolidinu (NPYR), N-nitrosoproline (NPRO) a N-nitrosomethylmočoviny (NMU) / Fig. 1 Structure of N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosopyrrolidine (NPYR), N-nitrosoproline (NPRO) and N-nitrosomethylurea (NMU)

nost byla prokázána v grilovaném mase (Kocak et al., 2012), v některých kosmetických přípravcích (Ma et al., 2011), tiskařských a tetovacích barvách (Laux et al., 2015), pryžových výrobcích (Speigelhalder et al., 1982), sušených rybách, uzeninách, v cigaretovém kouři a v neposlední řadě ve sladu a v pivu (Francis, 2000; Čulík et al., 1995).

Nejběžnější metodou stanovení N-nitrosaminů je plynová chromatografie s chemiluminiscenční (GC-TEA) nebo s hmotnostní (GC-MS) detekcí. Tyto metody jsou vhodné zejména pro těkavé a málo těkavé N-nitrosaminy, pro netěkavé N-nitrosaminy je nutná předchozí derivatizace. Metoda s využitím TEA detekce je sice velice selektivní a citlivá, má však také své nevýhody. Tím, že TEA detektor není zcela běžný, bývá poměrně komplikovaná jeho údržba a servis. Dalším problémem je malé spektrum potřebných standardů pro identifikaci a kvantifikaci, neboť dosud nebyly popsány a identifikovány zdaleka všechny struktury z široké řady těchto sloučenin (McWeeny et al., 1983).

Dosud neexistuje žádná rutinní a spolehlivá metoda pro stanovení netěkavých N-nitrosaminů. Proto se netěkavé N-nitrosaminy běžně stanovují spolu s těkavými N-nitrosaminy jako zdánlivá suma všech N-nitroso sloučenin, tzv. ATNC (z anglického Apparent Total N-nitroso Compounds), kde se celková suma vyjadřuje jako koncentrace N-nitroso skupiny v jednotkách $\mu\text{g (N-NO)/l}$ resp. kg . Tato metoda je založena na kvantitativním štěpení N-NO vazby a detekci oxidu dusnatého, respektive nitrosyl bromidu pomocí chemiluminiscenční detekce. Tato metoda byla vyvinuta a přijata již v 70. letech, a od té doby nebyla nijak novelizována a dosud nebylo určeno, které konkrétní látky se na ATNC podílejí. Pouze na základě dřívějších studií je patrné, že netěkavé N-nitrosaminy tvoří převážnou většinu z celkového obsahu ATNC v pivu (Čulík et al., 2012a; 2012b). Koncentrace ATNC v pivech se pohybují pod $20 \mu\text{g (N-NO)/l}$. Řádově stovkové hodnoty zpravidla svědčí o mikrobiální kontaminaci v některé fázi pivovarského provozu (Olšovská et al., 2014).

Ve sladu vznikají N-nitrosaminy jako produkty reakcí sekundárních či terciárních aminoskupin s oxidy dusíku přítomných během hvozdní naklíčeného ječmene (Basařová et al., 2015). Prekurzorem NDMA ve sladu je zejména alkaloid hordenin, v menší míře také gramin a dimethylamin (Wainwright et al., 1986a). Mnohé N-nitrosaminy nevznikají primárně nitrosací příslušných aminů, ale vznikají z různých nitrosovaných či jiných sloučenin, které mohou poskytovat přímo N-nitrosaminy nebo jejich nenitrosované analogy. Například N-nitrosoproline (NPRO) a N-nitrososarkosin (NSAR) při vyšších teplotách dekarboxylují za vzniku N-nitrosopyrrolidinu (NPYR) a NDMA (Pollock et al., 1981) nebo N-nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny se mohou tvořit nitrosací kondenzačních produktů aminokyseliny (cystein, serin, threonin a tryptofan) s jednoduchými aldehydy (Francis, 2000). Látky s dvěma aminoskupinami, které jsou odděleny čtyřmi nebo pěti uhlíkovými atomy, například aminokyselina lysin, či některé biogenní aminy, poskytují po N-nitrosaci cyklické N-nitrosaminy (Drabik-Markiewicz et al., 2011). Dalším významným prekurzorem N-nitrosaminů je kreatin, který se rozkládá na aminokyselinu sarkosin. Ten může být následně nitrosován (Wainwright, 1986a) a jak již bylo výše uvedeno, může být termálně dekarboxylován na NDMA.

N-nitrosaminy mohou také vznikat z pesticidů, zejména ze skupiny dinitroanilinů. Kromě toho, že jsou některé pesticidy přímými prekur-

2012), some cosmetic products (Ma et al., 2011), printing and tattoo inks (Laux et al., 2015), rubber products (Speigelhalder et al., 1982), dried fish, smoked meats, cigarette smoke and finally in malt and beer (Francis, 2000; Čulík et al., 1995).

Gas chromatography with chemiluminescence detection (GC-TEA) or with mass spectrometric (GC-MS) detectors is the most common analytical method for determination of N-nitrosamines. These methods are suitable especially for volatile and less volatile N-nitrosamines while derivatization is needed for non-volatile N-nitrosamines. The method based on TEA detection is highly selective and sensitive but it has some disadvantages. Maintenance and service of TEA detectors is often complicated and this is the reason why these detectors are not common in laboratories. Another problem is a small range of standards needed for identification and quantification because the majority of structures of nitroso compounds have not yet been described (McWeeny et al., 1983). A routine and reliable analytical method for determination of non-volatile N-nitrosamines does not currently exist. Non-volatile N-nitrosamines are therefore determined together with volatile N-nitrosamines as Apparent Total N-nitroso Compounds (ATNC). ATNC are measured as the concentration of N-nitroso group in $\mu\text{g(N-NO)/l}$ or kg respectively. This method is based on quantitative cleavage of N-NO bond and detection of nitric oxide or nitrosyl bromide by TEA detector. It was developed and accepted in the 70's of twentieth century; it has not been novelized ever since and there has been no significant progress in the knowledge of ATNC compounds. Still, some studies have indicated that non-volatile N-nitrosamines represent the vast majority of total ATNC in beer (Čulík et al., 2012a; 2012b). Concentrations of ATNC in beer are usually less than $20 \mu\text{g(N-NO)/l}$, values in the order of hundreds being usually the results of microbial contamination in some stage of brewery operations (Olšovská et al., 2014).

In malt, N-nitrosamines are formed in reactions of secondary or tertiary amino group with nitrogen oxides during kilning (Basařová et al., 2015). Precursors of NDMA in malt are especially hordenin and to a lesser extent gramin and dimethylamine (Wainwright et al., 1986a). Many N-nitrosamines do not arise primarily by nitrosation of respective amines but from either nitrosated or non-nitrosated compounds which can produce directly N-nitrosamines or their non-nitrosated analogues. For example, at higher temperatures N-nitrosoproline (NPRO) and N-nitrososarcosine (NSAR) are decarboxylated to produce N-nitrosopyrrolidine (NPYR) and NDMA (Pollock et al., 1981). Furthermore, N-nitrosated heterocyclic carboxylic acids are formed by nitrosation of condensation products of amino acids (cysteine, serine, threonine and tryptophan) and aldehydes (Francis, 2000). Compounds containing two amino groups in their structure, which are separated by four or five carbon atoms, for example lysine or some biogenic amines, can produce cyclic N-nitrosamines (Drabik-Markiewicz et al., 2011). Another precursor is creatine, which is decomposed to the amino acid sarcosine. Sarcosine can then be nitrosated (Wainwright, 1986a) and thermally decarboxylated into NDMA.

N-nitrosamines can be formed also from pesticides, especially of the dinitroaniline group. In addition to some pesticides being precursors of N-nitrosamines, pesticides can be contaminated by N-nitrosamines as by-products during pesticide production (Bontoyan et al., 1979).

The source of N-nitrosamines in beer could be all feedstock or microbial contamination. Today, formation of N-nitrosamines during malting is minimized, due to the change in kilning technology. Other beneficial factors are their high dilution factor and poor extractability into water from malt during mashing.

The situation is different with nitrate and nitrite ions, which are excellently soluble in water. Nitrites in acidic water solution form nitrous acid and further nitrogen oxides (nitrosating agents) to give N-nitroso compounds. The Czech legislation permits 0.5 mg/l as the highest concentration of nitrites in drinking water; therefore contamination from water can be excluded. The situation is worst with nitrates, which are tolerated in drinking water up to 50 mg/l and nitrate concentration in brewing water can be increased by hopping (hop is rich in nitrates). In the case of microbial contamination by nitrate reducing bacteria, nitrates can be reduced to nitrites and they can react to give N-nitrosamines (Smith, 1992).

2 LEGISLATION

According to the methodological recommendations of Czech Association of Breweries and malt houses the acceptable maximum

zory N-nitrosaminů, tak pesticidy samotné mohou být kontaminovány N-nitrosaminy, jakožto vedlejšími produkty jejich výroby (Bontoyan et al., 1979).

Zdrojem N-nitrosaminů v pivu mohou být tedy všechny vstupující suroviny. Hlavním zdrojem je však v případě těkavých nitrosaminů zejména použitý slad, v případě ATNC bakteriální kontaminace piva či jeho meziproduktů. Vznik N-nitrosaminů během sladování byl v současnosti minimalizován, a to díky úpravě technologie hvozdnění. Dalšími příznivými faktory jsou vysoký faktor ředění a jejich nízká extrahovatelnost do vody během vystírání a rmutování.

Jinak je tomu u dusitanových a dusičnanových iontů, které jsou ve vodě velice dobře rozpustné. Dusitanové ionty ve vodě tvoří v kyselém prostředí kyselinu dusitou a dále reagují na oxidy dusíku (nitrosační činidla), za vzniku N-nitrososloučenin. Jelikož česká legislativa povoluje maximální koncentraci dusitanů v pitné vodě 0,5 mg/l, kontaminace dusitany z varní vody téměř nehrozí. Horší situace je v případě dusičnanových iontů, které jsou ve vodě tolerovány do maximální koncentrace 50 mg/l a jejich obsah ve varní vodě může být ještě zvýšen chmelením (chmel je zdrojem vysokého obsahu dusičnanů). V případě mikrobiální kontaminace nitrát redukujícími bakteriemi může dojít k redukci dusičnanů na dusitany, ty již výše popsaným mechanismem reagují za vzniku N-nitrosaminů (Smith, 1992).

2 LEGISLATIVA

Podle metodických doporučení Českého svazu pivovarů a sladoven, vycházejících z požadavků kompendií JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), které byly součástí dnes již zrušené vyhlášky č. 305/2004, je požadované nejvyšší přípustné množství NDMA v pivu 0,5 µg/kg a sumy nitrosaminů (zahrnující NDMA, NDEA, NPYR, NPIP, NMOR a NDBA) 1,5 µg/kg. Pro obsah nitrosaminů ve sladu platí obdobné opatření, které činí 1 µg/kg v případě NDMA a 10 µg/kg v případě sumy těkavých nitrosaminů. V Německu je například doporučená hranice pro obsah NDMA ve světlem sladu 2,5 µg/kg (Čulík et al., 2011). Pro ATNC není uplatňována žádná zákonná hranice, ale většinou se hodnota kolem 20 µg (N-NO)/l považuje za uspokojivou.

3 POKROKY V ANALÝZE N-NITROSAMINŮ

Současným trendem v oblasti analýzy N-nitrosaminů je vysoce selektivní, avšak provozně velmi náročný chemiluminiscenční detektor nahradit za univerzálnější hmotnostně spektrometrický detektor. Většina nových metod stanovení N-nitrosaminů byla vyvinuta pro analýzu těchto látek především v masných produktech, tabáku, kosmetických výrobcích a pitné či odpadní vodě, kde mohou N-nitrosaminy vznikat jako vedlejší produkty dezinfekce (Nawrocki et al., 2011).

Pro přípravu kapalných vzorků (různé alkoholické nápoje, včetně piva) byl pro stanovení těkavých N-nitrosaminů vyvinut postup extrakce na pevné fázi s polymerním nosičem (Zhao et al., 2006; Jurado-Sánchez et al., 2007), aktivním uhlím či kokosovým uhlím (Ngongang et al., 2015; Pozzi et al., 2011), a dále headspace mikroextrakce na pevné fázi (Lona-Ramirez et al., 2015). Pro pevné vzorky byly testovány pokročilé extrakční techniky jako je superkritická fluidní extrakce (Filho et al., 2007), mikrovlnná a ultrazvuková extrakce (Jurado-Sánchez et al., 2013) nebo mikroextrakce na pevné fázi za pomoci zařízení pro přímou extrakci (SPME-DED) z pevných vzorků, která umožňuje rychlý, jednoduchý a nedestruktivní screening těkavých N-nitrosaminů, a případně dalších těkavých toxických látek v potravinách (Ventanas et al., 2006). Po samotné úpravě je vzorek většinou separován pomocí plynové chromatografie, byly však také popsány některé metody využívající kapalinovou chromatografii, a to pro stanovení tepelně stabilních i nestabilních těkavých nitrosaminů současně a redukcí celkového času analýzy (Zhao et al., 2006). Tyto separační techniky jsou dále nejčastěji párovány s hmotnostně spektrometrickou detekcí, ať už v tandemovém uspořádání (Zhao et al., 2006; Qiang et al., 2011; Ripollés et al., 2011; Boyd et al., 2011) či s detektory s vysokým rozlišením pracující na principu orbitální iontové pasti (Ngongang et al., 2015; Krauss et al., 2008).

V současné době se problematikou analýzy netěkavých N-nitrosaminů v potravinách zabývá kolektiv autorů Národního potravinářského ústavu Technické dánské univerzity, kde byla vyvinuta metoda pro simultánní stanovení těkavých i netěkavých N-nitrosaminů v masných výrobcích pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí v kombinaci s ionizací za atmosférického tlaku a elektrospreje (Herrmann et al., 2014). Z netěkavých N-nitro-

amounts of NDMA in beer are 0.5 µg/kg, and 1.5 µg/kg for the sum of nitrosamines (including NDMA NDEA, NPYR, NPIP, NMOR and NDBA). These recommendations arise from JECFA compendium (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), which was part of the Czech bill no. 305/2004, which is no longer in force. Similar recommendation is applied to nitrosamines in malt, which is 1 µg/kg for NDMA and 10 µg/kg for the sum of volatile nitrosamines. For example, the recommended maximum amount for NDMA in light malt in Germany is 2.5 µg/kg (Čulík et al., 2011). No legal limits are proposed for ATNC, but values of about 20 µg(N-NO)/l are considered as satisfactory in most cases.

3 ADVANCES IN ANALYSIS OF N-NITROSAMINES

A current trend in the field of analysis of N-nitrosamines is to replace the highly selective, operationally challenging TEA detector by a versatile mass spectrometric detector. Most new analytical methods for N-nitrosamine determination have been developed for meat products, tobacco, cosmetic products and drinking or waste water, where N-nitrosamines can be formed as disinfection by-products (Nawrocki et al., 2011).

Sample preparation for determination of volatile N-nitrosamine in liquid samples (some beverages including beer) is based on solid phase extraction with polymeric carrier (Zhao et al., 2006; Jurado-Sánchez et al., 2007), active carbon or coconut charcoal (Ngongang et al., 2015; Pozzi et al., 2011) and headspace solid phase microextraction (Lona-Ramirez et al., 2015). Advanced extraction techniques for solid samples have been tested, including supercritical fluid extraction (Filho et al., 2007), microwave and ultrasonic extraction (Jurado-Sánchez et al., 2013) and solid phase microextraction with direct extraction devices which allows fast, easy and non-destructive screening of volatile N-nitrosamines and some other volatile toxic compounds in food (Ventanas et al., 2006). After the sample preparation, samples are usually separated by gas chromatography or by liquid chromatography for simultaneous determination of thermally labile and stable volatile nitrosamines and for reduction of analysis time (Zhao et al., 2006). These separation techniques are mostly coupled with mass spectrometric detection either in a tandem mass spectrometry setup (Zhao et al., 2006; Qiang et al., 2011; Ripollés et al., 2011; Boyd et al., 2011) or with high resolution mass spectrometry based on orbital ion trap (Ngongang et al., 2015; Krauss et al., 2008).

Currently, a team from the National Food Institute, Technical University of Denmark is dealing with the analysis of non-volatile N-nitrosamines in food. They developed an analytical method for simultaneous determination of volatile and non-volatile N-nitrosamines in meat products by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection in a combination with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization (Herrmann et al., 2014). They monitored N-nitrososarcosine, N-nitrosohydroxyproline, N-nitrosoproline, N-nitroso-2-methyl-thiazolidine-4-carboxylic acid, and N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid (NSAR, NHPRO, NPRO, NMTCA and NTCA) from the non-volatile group and studied the effect of some factors on resulting concentration of volatile and non-volatile N-nitrosamines in meat products, such as the effect of temperature (Herrmann et al., 2015a) or amount of addend nitrite, erythorbic acid and ascorbyl palmitate as nitrosation inhibitors (Herrmann et al., 2015b).

The traditional but time consuming and laborious method of ATNC determination by a denitrosation mixture of hydrogen bromide and glacial acetic acid has been compared with methods using other denitrosation agents. One of these methods uses a mixture of iodine and potassium iodide in an acidic medium (Kulshrestha et al., 2010). Another method uses denitrosation mixture of cuprous chloride and hydrogen chloride. The authors of this method use one-part commercially available equipment which allows significant simplification of ATNC method and reduces problems with the relatively large apparatus used in the original method (Wang et al., 2005). However, these methods have so far been used only with meat products, soy sauce and drinking or pool water.

4 CURRENT KNOWLEDGE ABOUT THE PROPERTIES OF N-NITROSO COMPOUNDS

The properties of N-nitrosamines have not yet been fully explored, but in recent years a number of important findings have been pub-

saminů byly sledovány především N-nitrososarkosin, N-nitrosohydroxyprolin, N-nitrosoprolin, N-nitroso-2-methyl-thiazolidin-4-karboxylová kyselina a N-nitrosotiazolidin-4-karboxylová kyselina (NSAR, NHPRO, NPRO, NMTCa a NTCA). Autoři studovali vlivy různých faktorů na výsledné koncentrace těkavých i netěkavých N-nitrosaminů v masných produktech, jako vliv teploty (Herrmann et al., 2015a) nebo množství přidaného disitanu a erythorbové kyseliny a askorbil palmitátu jako inhibitorů nitrosace (Herrmann et al., 2015b).

Dnes již klasická, avšak časově náročná a pracná, metoda stanovení ATNC pomocí denitrosací směsi bromovodíku a ledové kyseliny octové byla porovnávána s metodami využívající jiná denitrosací činidla. Jedna z metod využívá k denitrosaci směs jodu a jodidu draselného v kyselém prostředí (Kulshrestha et al., 2010). Další z těchto metod využívá denitrosace pomocí směsi chloridu mědného a kyseliny chlorovodíkové. Autoři této metody využili aparatury, skládající se z komerčně dostupné jednodusové reakční nádoby, která umožnila výrazné zjednodušení této metody a snížila případné problémy spojené s relativně velkou aparaturou původní metody (Wang et al., 2005). Tyto metody však byly dosud aplikovány pouze na masné výrobky, sójovou omáčku a pitnou a bazénovou vodu.

■ 4 NOVODOBÉ POZNATKY O VLASTNOSTECH N-NITROSOSLOUČENIN

Vlastnosti N-nitrosaminů nejsou dosud zcela prozkoumány, avšak v uplynulých letech bylo dosaženo řady významných poznatků. K nim bezesporu patří studie kvantitativních vztahů mezi strukturou molekuly a její karcinogenní aktivitou (QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationships) (Helguera et al., 2008). Z této studie vyplývá vliv substituentů v poloze R₁ a R₂ u symetrických a asymetrických N-nitrosaminů se základní strukturou R₁(R₂)N-NO a také vliv substituentů u N-nitrosomočoviny na karcinogenní aktivitu dané molekuly. Kladný příspěvek k celkové karcinogenní aktivitě N-nitrosaminů mají zejména nesubstituované alkylové zbytky, a naopak záporného příspěvku dosahují nenasyčené řetězce či uhlovodíkové fragmenty substituované polárními skupinami. U N-nitrosomočoviny je situace poněkud složitější. Závisí zde jak na typu substituentu, tak na jeho poloze v řetězci. Obecně však opět platí, že látky s polárnějšími substituenty mají menší karcinogenní aktivitu. Zároveň je z tohoto kvantitativního modelu patrné, že u N-nitrosomočoviny nejvíce přispívá k celkové karcinogenní aktivitě samotná základní centrální struktura N-C(O)-N-NO, substituenty nejsou příliš rozhodující. Tyto závěry jsou v souladu s teorií biotransformace xenobiotik v lidském organismu a teorií metabolické aktivity nitrosaminů, které předpokládají, že hydrofilní látky tělo může přímo bez změny vyloučit, a proto nehraní takové riziko toxického účinku, zatímco látky lipofilní musí být metabolicky přeměněny na hydrofilní (Lüllmann et al., 2007) a touto metabolickou přeměnou dochází k aktivaci karcinogenních vlastností nitrosaminů a jejich interakci s DNA (Kushida et al., 2000). Přestože tedy nitrosaminy s polárními skupinami vykazují malé nebo nulové karcinogenní účinky, mohou být v trávicím traktu transnitrosovány na mnohem toxickejší nitroso sloučeniny (Inami et al., 2015; Inami et al., 2013).

Autoři Yurchenko a kol. publikovali zajímavou studii zabývající se vztahem mezi koncentrací NDMA a objemovým procentem alkoholu v pivu (Yurchenko et al., 2005), kdy podle jejich výzkumu koncentrace NDMA klesá s rostoucím obsahem alkoholu. Tato závislost byla studována na různých typech estonských piv a nalezena byla také napříč světlými pivy z různých evropských zemí. Autoři tento jev vysvětlují inhibičním efektem ethanolu na nitrosací reakci, která byla popsána již v 80. letech dvacátého století (Wainright, 1986a). Autoři Yurchenko a kol. zároveň poukazují i na vyšší koncentrace NDMA v tmavých pivech, což je následek obecně vyššího zastoupení dimethylaminu v tomto druhu piv (Yurchenko et al., 2005). Tento závěr je poněkud spekulativní, zásadní vliv na koncentraci NDMA v tmavých pivech má složení sypání, kdy se používá vyšší podíl mnichovského sladu.

Zvýšený vznik nitroso sloučenin je často podmíněn mikrobiální kontaminací. Současně lze v takto kontaminovaném pivu nalézt látky nazývané biogenní aminy, které jsou považovány za prekurzory N-nitrosaminů a jejich vznik byl studován z různých experimentálních podmínek (Drabik-Markiewicz et al., 2011). Studována byla také korelace mezi přirozeným logaritmem koncentrace ATNC a biogenních aminů v pivech a ze získaných dat nebyl prokázán vztah mezi koncentrací NDMA a celkovými ATNC (Olšovská et al., 2014; Čulík et al., 2012a). Jak již bylo popsáno dříve, látky podílející se na celkové hodnotě ATNC nejsou z velké většiny dosud charakterizované, avšak z principu klasické bromovodíkové metody stanovení ATNC vyplývá, že konkrétně sloučeniny s N-nitroso skupinou nemusejí být

lished. One of these findings is Quantitative Structure-carcinogenic Activity Relationships (QSAR) (Helguera et al., 2008). The study points out the importance of the effect of substituents on carcinogenic activity in positions R₁ and R₂ in symmetrical and asymmetrical N-nitrosamines with basic structure R₁(R₂)N-NO and of substituents in N-nitrosoureas. An enhancement of the total carcinogenic activity of N-nitrosamines has been found especially with non-substituted alkyl chains whereas unsaturated chains or hydrocarbon chains with polar groups have a negative effect on the activity. The situation is more complicated with N-nitrosoureas since the effect depends on both the type and the position of substituent in N-nitrosourea molecule. However, substances with more polar substituents have in general lower carcinogenic activity. The highest contributor to the carcinogenic activity of N-nitrosoureas is the basic central structure N-C(O)-N-NO, the substituents having a lesser influence. These conclusions are in accordance with the biotransformation theory of xenobiotics in human organism and with metabolic activation theory. These theories assume that hydrophilic substances can be directly excreted from the organism without any transformation and therefore do not pose such health risk as do lipophilic substances which have to be metabolically transformed to hydrophilic substances (Lüllmann et al., 2007); this transformation causes metabolic activation of carcinogenic properties of nitrosamines and their interaction with DNA (Kushida et al., 2000). Even though nitrosamines with polar groups exhibit little or no carcinogenic effects, they could be transnitrosated in the digestive tract into more toxic nitroso compounds (Inami et al., 2015; Inami et al., 2013).

Yurchenko et al. published an interesting study about the relationship between NDMA concentration and volume percentage of alcohol in beer (Yurchenko et al., 2005). Their data suggested that concentration of NDMA decreases with increasing volume percentage of alcohol. This dependence has been studied on different types of Estonian beers and it was observed also on light beers from different European countries. The authors explain this phenomenon by inhibitory effect of ethanol on nitrosation reactions which were described in 80's of twentieth century (Wainright, 1986a). However, this dependence can be also hypothetically explained by assuming that more molecules of carbon dioxide are formed and exude during fermentation of beer with a higher percentage of alcohol, dragging NDMA along from the fermenting wort (oral communication, J. Čulík). At the same time the authors point out that the higher NDMA concentration in dark beers can be the consequence of higher concentration of dimethylamine in this type of beer (Yurchenko et al., 2005). This conclusion is also speculative because the major influence on NDMA concentration in dark beers is exerted by the composition of the malts used which usually contain a portion of Munich malt.

Increased formation of nitroso compounds is often due to microbial contamination. Contaminated beer has been found to contain biogenic amines that are considered to act as N-nitrosamine precursors and their formation has been studied under various experimental conditions (Drabik-Markiewicz et al., 2011). Correlation of natural logarithm of ATNC concentration and biogenic amines in beer has been also observed but no dependence was found between NDMA and ATNC (Olšovská et al., 2014; Čulík et al., 2012a). As previously described, compounds that contribute to ATNC value have not yet been characterized. However, as is clear from the basic principle of classical hydrogen bromide method of ATNC determination, compounds with N-nitroso group could not be the only substances of this group. Other compounds detectable by this method could include especially substances with C-nitroso group in the molecule. Various C-nitroso compounds have been studied, but none of them have been identified in beer or in brewery raw materials. The mechanism of C-nitrosation of polyphenols such as catechin, epicatechin or procyanidin B1, B2 and B5 in acidic medium in the presence of inorganic nitrite has been published (Hirota et al., 2015). These and related substances are natural components of hop and malt and they are extracted into the solution during brewing (Olšovská et al., 2015). C-nitroso phenols can therefore be assumed to form part of ATNC.

■ 5 N-NITROSAMINES IN BEER AND MALT DURING THE LAST 15 YEARS

Since 1977, average NDMA concentrations in beer and malt have been gradually decreasing (Lachenmeier et al., 2007) and the occurrence of samples with a significantly higher NDMA level is unique. Higher NDMA concentrations signal a defect in technological process or the presence of microbial contamination. This situation can

jedinými zástupci této skupiny látek. Dalšími látkami mohou být zejména sloučeniny s C-nitroso skupinou v molekule. Různé C-nitroso sloučeniny byly již studovány, avšak dosud nebyly žádné z nich identifikovány v pivu či jeho surovinách. Publikován byl však mechanismus C-nitrosace polyfenolů, jako je katechin, epikatechin, prokyanidin B1, B2 a B5 za kyselých podmínek v přítomnosti dusitanových iontů (Hirota et al., 2015). Tyto a další podobné látky jsou přirozenou součástí chmele a sladu a přecházejí do roztoku během procesu výroby piva (Olšovská et al., 2015), proto lze předpokládat, že takovéto C-nitrosované polyfenoly mohou tvořit část ATNC.

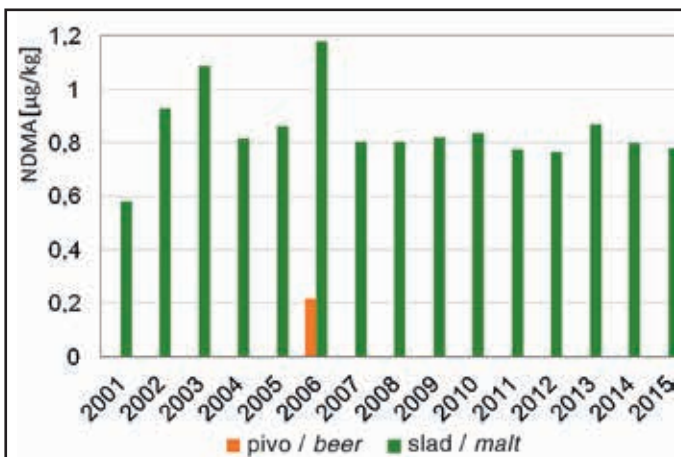
5 N-NITROSAMINY V PIVU A SLADU ZA POSLEDNÍCH 15 LET

Od roku 1977 průměrná koncentrace NDMA v pivech i sladech postupně klesá (Lachenmeier et al., 2007) a výskyt vzorku s výrazně vyšší hodnotou je zcela ojedinělý. V takovém případě zvýšený obsah NDMA pružně signalizuje závadu v technologickém procesu či náhlý výskyt mikrobiální kontaminace. Tento stav lze doložit výsledky Analytické zkušební laboratoře Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského. V období let 2001 až 2015 byly těkavé N-nitrosaminy stanoveny celkem u 4115 vzorků ječných sladů z komerčních sladoven a u 1280 vzorků piv z malých i velkých pivovarů, což je průměrně 274 vzorků sladu a 85 vzorků piv ročně.

Do vyhodnocení byly zahrnuty vzorky pšeničných i mnichovských sladů tuzemské i zahraniční výroby (zejména z Polska, Slovenska, Rumunska a Srbska) a vzorky světlých i tmavých, alkoholických i nealkoholických piv (především z České republiky). Zastoupení mnichovských sladů, které běžně dosahují vyšších koncentrací NDMA než slady pšeničné, bylo napříč studovaným časovým obdobím téměř konstantní a pohybovalo se okolo 15 %. Ostatní těkavé N-nitrosaminy byly ve vzorcích detekovány jen ve výjimečných případech a šlo především o N-nitrosopyrrolidin a N-nitrosodiethylamin.

Střední hodnoty naměřených koncentrací NDMA ve sladech a v pivech jsou pomocí sloupcového grafu znázorněny na obr. 2. Tyto hodnoty jsou u piva pod mezí stanovitelnosti dané analytické metody, která pro NDMA činí 0,2 µg/kg, kromě dat z roku 2006. U vzorků sladu se tyto hodnoty stabilně pohybují okolo 0,8 µg/kg, kromě výchylek v letech 2001 až 2003 a 2006.

Procento vzorků převyšující v jednotlivých letech mez 0,5 µg/kg u vzorků piv a 2,5 µg/kg u vzorků sladů je znázorněno na obr. 3. Tyto mezní hodnoty byly vybrány na základě požadavku na obsah NDMA v pivu, a nejvyšší koncentraci NDMA doporučenou německými úřady ve sladu (viz oddíl 2 Legislativa), protože přísnější hodnotu doporučovanou Českým svazem pivovarů a sladoven (1 µg/kg) převyšovalo 30 – 60 % vzorků sladu. Z grafu je patrný mírný pokles procenta vzorků sladu s obsahem NDMA nad 2,5 µg/kg (s vyloučením hodnoty z roku 2001, kde bylo analyzováno výrazně méně vzorků než v ostatních letech) a ustálení okolo 6 % v posledních 5 letech. Na obr. 4 je znázorněna závislost mezi procentem vzorků sladu s koncentrací nad 2,5 µg/kg a rokem stanovení, výsledný Pearsonův korelační koeficient je roven -0,81, což značí vysokou míru asociace. Zvýšená koncentrace NDMA ve vzorcích piv (nad 0,5 µg/kg) je v posledních letech spíše náhodná, předpokládáme, že většinou byla způsobena bakteriální kontaminací nebo použitím kontaminovaného sladu.



Obr. 2 Střední hodnoty koncentrací NDMA v jednotlivých letech / Fig. 2 Mean values of NDMA concentration in beers and malts in individual years

be illustrated by the data acquired in the Analytical Testing Laboratory of Research Institute of Brewing and Malting. During 2001 – 2015, volatile N-nitrosamines have been determined in a total of 4115 samples of barley malt from commercial malt houses and in 1280 samples of beer from both small and large breweries, i.e. on average 274 samples of malt and 85 samples of beer per year.

The statistical evaluation included samples of Pilsner and Munich malt of Czech and foreign provenance (especially from Poland, Slovakia, Romania and Serbia) and samples of light and dark, alcoholic and non-alcoholic beer (especially from Czech Republic). During 2001–2015 the representation of Munich malts, which has often higher NDMA concentration than Pilsner malts, has been nearly constant at around 15%. Other volatile N-nitrosamines have been detected in samples only exceptionally and included mainly N-nitrosopyrrolidine and N-nitrosodiethylamine.

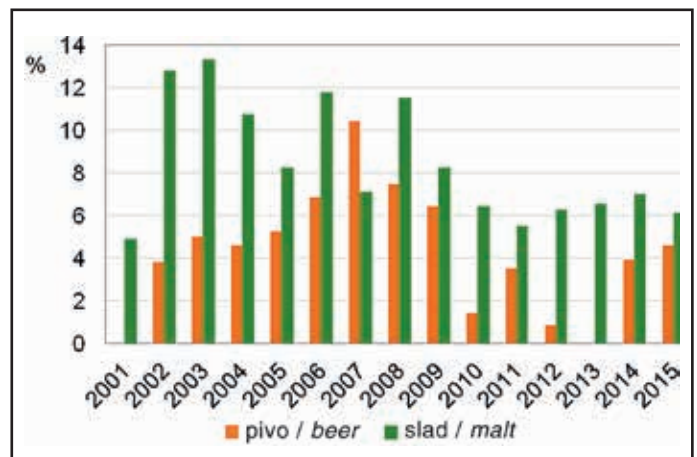
The mean values of NDMA concentration measured in malts and beers are shown in Fig. 2. Except for data from 2006, the values in beer are below the limit of quantification of the analytical method, which is 0.2 µg/kg. The mean values in malt are steadily around 0.8 µg/kg except for data from 2001 – 2003 and 2006.

The percentage of samples exceeding in the respective years the limit of 0.5 µg/kg in beers and 2.5 µg/kg in malts are given in Fig. 3. These limit values have been selected on the basis of required NDMA concentration in beer, and the highest NDMA concentration recommended by German authorities in malt (see part 2, Legislation), because the stricter value recommended by Czech Association of Breweries and Malt Houses (1 µg/kg) was exceeded by 30 – 60% of malt samples. The graph shows a slight decrease of the percentage of malt samples with NDMA concentration over 2.5 µg/kg (except for data from 2001, when considerably fewer samples were analysed in comparison with other years), levelling off around 6% in last five years. A relationship between the percentage of malt samples exceeding NDMA concentration of 2.5 µg/kg and the year of determination is shown in Fig. 4. The resulting Pearson correlation coefficient is -0.81, indicating a high measure of association. The rather randomly increased NDMA concentration in beer samples (above 0.5 µg/kg) in recent years is assumed to have been caused by bacterial contamination or by using contaminated malt.

6 CONCLUSIONS

Exploration of N-nitrosamines has in the last years largely focused on such matrices as meat products, tobacco or water. These compounds, especially volatile N-nitrosamines, are still a subject of attention due to their high toxicity and, based on valid legislation, it is therefore necessary to monitor their concentration. The studies of non-volatile N-nitrosamines have reached some progress and new analytical methods developed for identification and determination of non-volatile N-nitrosamines have been successfully used for analyzing meat products.

Since the 70's of twentieth century the problem with high concentration of volatile N-nitrosamines in malts and beers has been successfully resolved but no new advances in this area have been attained apart from the substitution of TEA detection for MS detection. It should be noted that technological advances during malt produc-



Obr. 3 Procento vzorků vyšších než 0,5 µg/kg u piva a 2,5 µg/kg u sladu / Fig. 3 Percentage of samples exceeding 0.5 µg/kg NDMA in beer and 2.5 µg/kg in malt

6 ZÁVĚR

V posledních letech byla v oblasti tématiky N-nitrosamů věnována pozornost především takovým matricím jako jsou masné výrobky, tabák či voda. Tyto látky, zejména těkavé N-nitrosaminy, jsou stále předmětem pozornosti díky své vysoké toxicitě, a proto je nutno sledovat jejich obsah na základě platné legislativy. Také ve studiu netěkavých N-nitrosaminů došlo k pokroku, byly vyvinuty nové metody jejich identifikace a stanovení a byly úspěšně aplikovány na masných výrobcích.

Od 70. let 20. století, kdy byl úspěšně vyřešen problém s vysokými koncentracemi těkavých N-nitrosaminů ve sladu a v pivu, nebylo v této oblasti kromě převedení TEA detekce na MS detekci účinně žádných nových pokroků. Je potřeba si však uvědomit, že technologické kroky při výrobě sladu minimalizující vznik NDMA nemusejí zcela zabránit vzniku některých netěkavých N-nitrosaminů, například NPRO (Wainwright, 1986b; Smith, 1994). Vlastnosti, toxické účinky a mechanismus vzniku netěkavých N-nitrosaminů nebyly dosud dostatečně prostudovány (kromě NPRO a NSAR), i když je jejich přítomnost v některých potravinách a nápojích včetně piva jasně prokázána (Johnson et al., 1987). Jelikož netěkavé N-nitrosaminy tvoří významný podíl ATNC, nemusí být nízká koncentrace těkavých N-nitrosaminů automaticky brána jako uspokojivá situace. Hladiny ATNC v pivu se ve většině případů pohybují pod hranicí 20 µg (N-NO)/l, což je jistě oproti minulosti významný pokles (Massey et al., 1987). Přesto celková suma ATNC může obsahovat podíl toxických netěkavých N-nitrosaminů, o kterých zatím nic nevíme, neboť je nejsme současnými metodami schopni detekovat. Pokud takové látky byly prokázány v masných výrobcích, mohou se vyskytovat také v pivu. A ač je jejich koncentrace relativně nízká, jejich příjem do našeho těla spolu s pravidelnou konzumací piva může znamenat určité riziko. Přestože nebyly některé dosud známé netěkavé N-nitrosaminy označeny za karcinogeny jako jejich těkavé analogy, ukázalo se, že i tyto látky mohou nepřímo prostřednictvím transnitrosace v trávicím traktu přispívat ke vzniku nádorového onemocnění (Inami et al., 2013; 2015). Proto je zapotřebí vyvinout nové analytické metody zejména pro identifikaci a stanovení látek přispívající k celkové hodnotě ATNC v pivu ale i sladu. Na základě této identifikace by bylo možné posoudit zdravotní riziko občasných zvýšených hodnot ATNC v pivu.

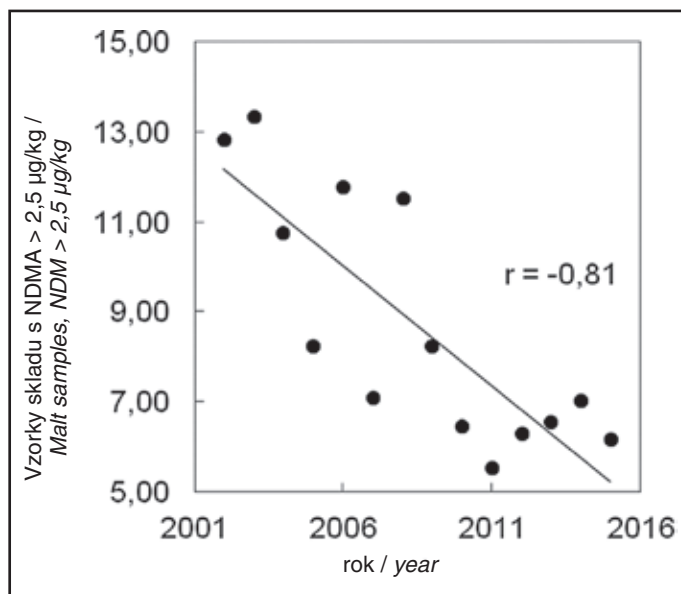
Proto byl v Analytické zkušební laboratoři Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., kde má problematika N-nitrosaminů dlouholetou tradici, zahájen nový výzkumný úkol zabývající se problematikou netěkavých N-nitrosaminů, jejich vztahem k hodnotě ATNC a příčinami jejich vzniku. K řešení úkolu bude využito nové špičkové instrumentální vybavení laboratoře a zcela nové postupy pro přípravu tuhých i kapalných vzorků.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována za podpory projektu LO1312 „Výzkumné senzorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj“, MŠMT, Česká Republika (2014-2019, MSM/LO).

LITERATURA / REFERENCES

- Basařová, G., Psota, V., Šavel, J., Basař, P., Paulů, R., Kosař, K., Doštělek, P., Basař, P., Kellner, V., Mikulíková, R., Čejka, P., 2015: Sladařství, teorie a praxe výroby sladu. Praha, Havlíček Brain Team.
- Bontoyan, W. R., Law, M. W., Wright, D. P. Jr., 1979: Nitrosamines in agricultural and home-use pesticides. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 631-635. DOI: 10.1021/jf60223a009
- Boyd, J. M., Hrudehy, S. E., Richardson, S. D., Li, X.-F., 2011: Solid-phase extraction and high performance liquid chromatography mass spectrometry analysis of nitrosamines in treated drinking water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 30: 1410-1421. DOI:10.1016/j.trac.2011.06.009
- Čulík, J., Kellner, V., 1995: Toxic compounds arising by interaction of food constituents with food additives – Part A: Nitroso compounds. V knize *Natural toxic compounds of foods, formation and changes during food processing and storage*. Ed. Jiří Davídek, CRC Press, Boca Raton FL, USA, s. 229-249.
- Čulík, J., Jurková, M., Horák, T., Čejka, P., Dvořák, J., Olšovská, J., 2011: Těkavé N-nitrosaminy ve sladu, věc již dávno minulá? *Kvasny Prum.*, 57, 11-12: 413-416.
- Čulík, J., Horák, T., Čejka, P., Jurková, M., 2012a: Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství. Část I. – Vznik a metody stanovení. *Kvasny Prum.*, 58 (1): 6-12
- Čulík, J., Horák, T., Čejka, P., Jurková, M., 2012b: Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství. Část II. – Studium účinků UV záření na ATNC



Obr. 4 Korelace mezi procentem vzorků sladu s koncentrací nad 2,5 µg/kg a rokem stanovení / Fig. 4 Correlation between the percentage of malt samples with NDMA concentration above 2.5 µg/kg and the year of determination

tion aimed to minimize NDMA concentration may not completely prevent formation of some non-volatile N-nitrosamines, for example NPRO (Wainwright, 1986b; Smith, 1994). Toxic properties and mechanism of formation of non-volatile N-nitrosamines haven't been sufficiently studied (apart from NPRO and NSAR), even though their presence in some foodstuffs and beverages including beer has been clearly demonstrated (Johnson et al., 1987). Low concentration of volatile N-nitrosamines should not be considered as satisfactory situation because non-volatile N-nitrosamines form a significant part of ATNC. Usual ATNC concentration in beer is below 20 µg(N-NO)/l, which is a significant decrease in comparison with the situation in the past (Massey et al., 1987). Even so, the total value of ATNC can include some portion of as yet unknown toxic non-volatile N-nitrosamines because current analytical methods cannot detect them. If such compounds have been detected in meat products, they may also occur in beer. Even though their concentrations are relatively low, intake of these compounds into the human body may pose some risk, especially with regular consumption of beer. And even though some known non-volatile N-nitrosamines haven't been identified as carcinogenic as volatile N-nitrosamines, it turned out that they can indirectly contribute to the formation of cancer through transnitrosation in the digestive tract (Inami et al., 2013; 2015). The development is therefore needed of new analytical methods for identification and determination of compounds contributing to ATNC in beer and malt. When these compounds have been identified, it can be possible to evaluate the health risk of occasional higher values of ATNC in beers.

The Analytical Testing Laboratory of the Research Institute of Brewing and Malting, Inc., which has a long tradition of N-nitrosamine research, has launched a new research project dealing with non-volatile N-nitrosamines, their relationship to ATNC and the reasons for their production. The project will be addressed by using state-of-the-art instrumentation and completely new procedures for the preparation of solid and liquid samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CR Ministry of Education, Youth and Sports project LO1312, "Sensory Research Centre in Prague and Brewhouse for Research and Development - Sustainability and Development (2014-2019, MSM/LO)".

- a vybrané zástupce N-nitrosoaminokyselin v pivu. *Kvasny Prum.*, 58 (2): 26–29.
- Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Kowalska, T., Paelinck, H., Van der Heyden, Y., 2011: Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 126: 1539–1545. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.149
- Filho, P. J. S., Rios, A., Valcárcel, M., Melecchi, M. I. S., Caramão, E. B., 2007: Method of determination of nitrosamines in sausages by CO₂ supercritical fluid extraction (SFE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *J. Agric. Food Chem.*, 55: 603–607. DOI:10.1021/jf062382j
- Francis, F. J., 2000: *Encyclopedia of food science and technology*, kap. Nitrosamines (A.R. Tricker), John Wiley & Sons, N. Y.: 1707–1716.
- Helguera, A. M., Cordeiro, M. N. D. S., Pérez, M. Á. C., Combes, R. D., González, M. P., 2008: Quantitative structure carcinogenicity relationship for detecting structural alerts in nitroso-compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231: 197–207. DOI:10.1016/j.taap.2008.04.008
- Herrmann, S. S., Duedahl-Olesen, L., Granby, K., 2014: Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization. *J. Chromatogr. A*, 1330: 20–29. DOI:10.1016/j.chroma.2014.01.009
- Herrmann, S. S., Duedahl-Olesen, L., Granby, K., 2015a: Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control*, 48: 163–169. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.05.030
- Herrmann, S. S., Granby, K., Duedahl-Olesen, L., 2015b: Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry*, 174: 516–526. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.101
- Hirota, S., Takahama, U., 2015: Reactions of polyphenols in masticated apple fruit with nitrite under stomach simulating conditions: Formation of nitroso compounds and thiocyanate conjugates. *Food Res. Int.*, 75: 20–26. DOI:10.1016/j.foodres.2015.05.018
- Inami, K., Kondo, S., Ono, Y., Saso, C., Mochizuki, M., 2013: Transnitrosation of alicyclic N-nitrosamines containing sulphur atom. *Bioorg. Med. Chem.*, 21: 7853–7857. DOI:10.1016/j.bmc.2013.10.008
- Inami, K., Shiino, J., Hagiwara, S., Takeda, K., Mochizuki, M., 2015: Transnitrosation of non-mutagenic N-nitrosoproline forms mutagenic N-nitroso-N-methylurea. *Bioorg. and Med. Chem.*, 23: 3297–3302. DOI:10.1016/j.bmc.2015.04.058
- Johnson, P., Pfab, J., Tricker, A. R., Key, P. E., Massey, R. C., 1987: An investigation into the apparent total N-nitroso compounds in malts. *J. Inst. Brew.*, 93: 319–321. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1987.tb04510.x
- Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M., 2007: Gas chromatographic determination of N-nitrosamines in beverages following automatic solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 9758–9763. DOI: 10.1021/jf071437u
- Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M., 2013: Comparison of microwave assisted, ultrasonic assisted and Soxhlet extractions of N-nitrosamines and aromatic amines in sewage sludge, soil and sediments. *Sci. Total Environ.*, 463: 293–301. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.06.002
- Kocak, D., Ozel, M. Z., Gogus, F., Hamilton, J. F., Lewis, A. C., 2012: Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography – nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chemistry*, 135: 2215–2220. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.07.002
- Kraus, M., Hollender, J., 2008: Analysis of nitrosamines in waste water: Exploring the trace level quantification capabilities of a hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 80: 834–842. DOI: 10.1021/ac701804y
- Kulshrestha, P., McKinstry, K. C., Fernandez, B. O., Feelisch, M., Mitch, W. A., 2010: Application of an optimized total N-nitrosamine (TONO) assay to pools: placing N-nitrosodimethylamine (NDMA) determinations into perspective. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 3369–3375. DOI: 10.1021/es100361f
- Kushida, H., Fujita, K., Suzuki, A., Yamada, M., Endo, T., Nohmi, T., Kamataki, T., 2000: Metabolic activation of N-alkyl nitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis*, 21: 1227–1232. DOI: 10.1093/carcin/21.6.1227
- Lachenmeier, D.W., Fügel, D., 2007: Reduction of nitrosamines in beer – review of a success story. *Brew. Sci.*, 60 : 84–89
- Laux, P. et al., 2015: A medical-toxicological view of tattooing. *The Lancet*, In Press, Corrected Proof, Available online 23 July 2015 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60215-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60215-X)
- Lona-Ramirez, F.J., Gonzalez-Alatorre, G., Rico-Ramirez, V., Perez-Perez, M.I., Castrejón-González, E.O., 2015: Gas chromatography/mass spectrometry for the determination of nitrosamines in red wine. *Food Chemistry*, Accepted Manuscript, DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.090>
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., 2007: *Barevný atlas farmakologie, překlad 5. vydání*. Grada Publishing, Praha.
- Ma, Q., Xi, H., Wang, Ch., Bai, H., Xi, G.-Ch., Su, N., Xu, L.-Y., Wang, J.-B., 2011: Determination of ten volatile nitrosamines in cosmetics by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 39: 1201–1207. DOI:10.1016/S1872-2040(10)60466-5
- Massey, R. C., McWeeny, P. E., Knowles, M. E., 1987: An investigation of apparent total N-nitroso compounds in beer. *IARC Sci. Publ.*, 84: 219–221.
- McWeeny, D. J., 1983: Nitrosamines in beverages. *Food Chemistry*, 11 : 273–287. DOI:10.1016/0308-8146(83)90075-4
- Nawrocki, J., Andrzejewski, P., 2011: Nitrosamines and water. *J. Hazardous Materials*, 189: 1–18. DOI:10.1016/j.jhazmat.2011.02.005
- Ngongang, A. D., Duy, S. V., Sauvé, S., 2015: Analysis of nine N-nitrosamines using liquid chromatography-acurate mass high resolution-mass spectrometry on a Q-Exactive instrument. *Anal. Methods*, 7: 5748–5759. DOI: 10.1039/C4AY02967D
- Olšovská, J., Matoulová, D., Čejka, P., Jurková, M., 2014: Pivo a zdraví. *Kvasny Prum.*, 60, 7-8: 174–181.
- Olšovská, J., Dušek, M., Zušťáková, V., Mikyška, A., 2015: Profil proanthokyanidinů v pivu a jeho surovinách. *Kvasny Prum.*, 61, 10-11: 296–304.
- Pollock, J. R. A., 1981: Aspects of nitrosation in malts and beers. I. Examination of malts for the presence of N-nitrosoproline, N-nitrososarcosine and N-nitrosopipercolinic acid. *J. Inst. Brew.*, 87: 356–359. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1981.tb04050.x
- Pozzi, R., Bocchini, P., Pinelli, F., Galletti, G. C., 2011: Determination of nitrosamines in water by gas chromatography/chemical ionization/selective ion trapping mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218: 1808–1814. DOI:10.1016/j.chroma.2011.02.009
- Ripollés, C., Pitarch, E., Sancho, J. V., López, F. J., Hernández, F., 2011: Determination of eight nitrosamines in water at the ng L⁻¹ levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 702: 62–71. DOI: 10.1016/j.aca.2011.06.024
- Smith, N. A., 1992: Nitrate reduction and ATNC formation by brewery wild yeast. *J. Inst. Brew.*, 98: 415–420. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1992.tb01125.x
- Smith, N. A., 1994: Nitrate reduction and N-nitrosation in brewing. *J. Inst. Brew.*, 100: 347–355. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1994.tb00835.x
- Speigelhalter, B., Preussmann, R., 1982: Nitrosamines and rubber. *IARC Sci. Publ.*, 41: 234–243.
- Tricker, A. R., Preussmann, R., 1991: Carcinogenic N-nitrosamines in diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research*, 259: 277–289. DOI:10.1016/0165-1218(91)90123-4
- Ventanas, S., Ruiz, J., 2006: On-site analysis of volatile nitrosamines in food model systems by solid-phase micro extraction coupled to a direct extraction device. *Talanta*, 70: 1017–1023. DOI:10.1016/j.talanta.2006.02.031
- Wainwright, T., 1986a: The chemistry of nitrosamine formation: relevance to malting and brewing. *J. Inst. Brew.*, 92: 49–64. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04373.x
- Wainwright, T., 1986b: Nitrosamines in malt and beer. *J. Inst. Brew.*, 92: 73-80. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04376.x
- Wang, J., Chan, W. G., Haut, S. A., Krauss, M. R., Izac, R. R., Hempfling, W. P., 2005: Determination of total N-nitroso compounds by chemical denitrosation using CuCl. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4686–4691. DOI: 10.1021/jf0481709
- Yurchenko, S., Mölder, U., 2005: N-nitrosodimethylamine analysis in Estonian beer using positive-ion chemical ionization with gas chromatography. *Food Chemistry*, 89: 455–463. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.05.034
- Zhao, Y.-Y., Boyd, J., Hrudey, S. E., Li, X.-F., 2006: Characterization of new nitrosamines in drinking water using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 7636–7641. DOI: 10.1021/es061332s