

Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství Část I. – Vznik a metody stanovení

Non-Volatile N-Nitrosamines In Brewing Industry Part 1. Arrising and methods of estimation

JIŘÍ ČULÍK, TOMÁŠ HORÁK, PAVEL ČEJKA, MARIE JURKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, plc, Lipova St. 15, 120 144 Praha, Czech Republic*

e-mail: culik@beerresearch.cz

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M.: Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství. Část I. – Vznik a metody stanovení. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 1, s. 6–12.

Na rozdíl od N-nitrosaminů těkavých je toho v pivovarství o nitrosaminech netěkavých, jejich hlavních představitelích a mechanismech vzniku, známo velmi málo.

V první části publikace věnované problematice netěkavých nitrosaminů jsou proto podány základní informace týkající se jejich výskytu, mechanismu vzniku a metod stanovení v pivu a ostatních potravinách.

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M.: Non-volatile N-nitrosamines in brewing industry. Part 1. – Arrising and methods of estimation. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 1, p. 6–12.

Contrary to volatile N-nitrosamines, about representatives and mechanism of arising of non-volatile nitrosamines in brewing industry is known only a little.

In the first part of this article are therefore given the basic information about their incidence, mechanism of arising and method of estimation in beer and other foodstuff.

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M.: Unflüchtige N-Nitrosamine in der Brauwesen. Teil I. – Die Entstehung und Methoden zur Feststellung. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 1, S. 6–12.

Zum Unterschied von den flüchtigen N-Nitrosaminen gibt's in dem Brauwesen nur zu wenige Informationen über unflüchtigen N-Nitrosaminen. Im den ersten Teil, der der Problematik von unflüchtigen N-Nitrosaminen gewidmet ist, werden die Grundinformationen über das Vorkommen von unflüchtigen Nitrosaminen, Mechanismus des Entstehens und Methoden ihrer Feststellung im Bier und in den anderen Lebensmitteln diskutiert.

Klíčová slova: netěkavé nitrosaminy, ATNC, pivo, analýza

Keywords: non-volatile nitrosamines, ATNC, beer, analysis

1 ÚVOD

Současné poznatky o celkových N-nitrososloučeninách v pivu spolu s neustálým pokrokem v oblasti vývoje nových analytických instrumentálních metod umožňují podrobněji studovat jednotlivé zástupce tvořící tuto velmi různorodou skupinu látek. Členění nitrosaminů s ohledem na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a možnosti jejich výskytu v potravinách detailně popsal Tricker, 2000 a McWeeny, 1983. Zatímco skupinu těkavých N-nitrosaminů představují zejména N-nitrosodimethylamin (NDMA), N-nitrosodiethylamin (NDEA), N-nitrosodipropylamin (NDPA), N-nitrosodibutylamin (NDBA), N-nitrosopiperidin (NPIP), N-nitrosopyrrolidin (NPYR) a N-nitrosomorfolin (NMOR) a N-nitrosothiazolidin (NTHZ), skupinu netěkavých N-nitrosaminů tvoří kromě N-nitrososarkosinu (NSAR), N-nitrosoprolinu (NPRO) a N-nitrosohydroxyprolinu (NHPRO) i další N-nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny vzniklé kondenzací přítomných aminokyselin a jednoduchých aldehydů. Patří sem však též i N-nitrosované dipeptidy a polypeptidy a mnohé další látky. Mechanismus vzniku NSAR, NPRO a NHPRO v modelových roztocích studoval Janzowski et al., 1982.

Sloučeniny, jež zahrnujeme mezi ATNC, tvoří různorodou skupinu, přičemž o poměrném zastoupení jednotlivých látek toho zatím příliš známo není. Dle údajů Walterse et al., 1983, mohou tuto skupinu kromě N-nitrosaminů tvořit i N-nitrosamidy, N-nitrosoguanidiny, N-nitrosourethany a N-nitrososulfonamidy. Ačkoli jsou do skupiny nitrosaminů řazeny kromě N-nitrosaminů i C-, O- a S-nitrosaminy (Williams, 1988), hlavní pozornost je věnována zejména N-nitrosaminům s ohledem na jejich nežádoucí zdravotní účinky. Jak vyplývá z mnohých dietických studií zaměřených na studium podílu ATNC na vzniku rakoviny, lze považovat jejich podíl na tomto onemocnění za prokázaný (Mc Weeny, 1983, Stuff et al., 2009, Kuhnle et al., 2007, Buiatti et al., 2006, Lynn et al., 2009, Wu at al., 2006, Bingham et al., 2002).

1 INTRODUCTION

Contemporary findings about the presence of apparent total N-nitroso compounds in beer together with advanced analytical instruments makes possible other detailed studies about the individual substances from this miscellaneous group. Tricker, 2000 and McWeeny, 1983 described in detail the distribution of nitrosamines in terms of their physicochemical properties and their possible presence in foods and beverages. In particular, N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosodipropylamine (NDPA), N-nitrosodibutylamine (NDBA), N-nitrosopiperidine (NPIP), N-nitrosopyrrolidine (NPYR), N-nitrosomorfoline (NMOR) and N-nitrosothiazolidine (NTHZ) belong to the group of volatile N-nitrosamines. The group of non-volatile N-nitrosamines is created from nitrososarkosine (NSAR), nitrosoprolin (NPRO) and nitrosohydroxyproline (NHPRO) and other N-nitroso heterocyclic carboxylic acids formed by a condensation reaction between amino acids present and single aldehydes. N-nitroso dipeptides, polypeptides and other substances also belong to this group. Janzowski et al., 1982 studied the formation process of NSAR, NPRO and NHPRO in model solutions.

Among the ATNC come a miscellaneous group of compounds. The amounts of the particular substances are rather unknown. According to Walters et al., 1983, this group contains as well as N-nitrosamines also N-nitrosamides, N-nitrosoguanidines, N-nitrosourethanes and N-nitrososulfoamides. Although under the group nitrosamines come as well as N-nitrosamines also C-, O-, and S-nitrosamines, Williams, 1988, the greatest attention focuses on N-nitrosamines because of their unwanted health impact. According to the number of dietetic studies dealing with the participation of ATNC in the growth of cancer, their influence can be considered as proven (Mc Weeny, 1983, Stuff et al., 2009, Kuhnle et al., 2007, Buiatti et al., 2006, Lynn et al. 2009, Wu at al., 2006, Bingham et al., 2002).

S ohledem na výsledky získané na našem pracovišti v uplynulých letech se zdá být téměř jisté, že stejný obsah ATNC v pivech různých výrobců neznamená totožné složení přítomných ATNC. Detailní znalosti o zastoupení jednotlivých sloučenin tvořících ATNC by proto lépe umožnily odhadnout z toho vyplývající zdravotní riziko. V budoucnu by toto umožnilo porovnat skutečnou míru rizika plynoucí ze zjištěných hodnot u různých výrobců na rozdíl od současné praxe, porovnávající výhradně absolutní hodnoty obsahu ATNC.

2 PŘÍTOMNOST ATNC V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH

Netěkavé N-nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny NSAR, NPRO a NHPRO se řadí do skupiny ATNC a jsou přítomny v různých potravinách, zejména v masě a tepelně opracovaných masných výrobcích (Hamburg, 2007, Drabik-Markiewicz et al., 2010, Tricker et al., 1985, Massey – Lees, 1992, Massey et al., 1991).

S přítomností ATNC se můžeme setkat i u fermentovaných mléčných výrobků (Massey – Key, 1989, Bouchikhi et al., 1999).

Sen et al., 1983 a Sen – Seaman, 1983, uvádějí obsah NPRO v pivu, rozmezí 0,7 až 6,0 µg/l, přičemž obsah NPRO ve sladu kolísal v rozmezí 5,0 až 113 µg/kg. NSAR nebyl ve sladu detekován. K obdobným závěrům dospěl i Pollock, 1981. Obsah NSAR ve sladu dosáhl dle autora hodnoty 20 µg/kg a NPRO 286 µg/kg. Obdobně Massey et al., 1990, stanovili přítomnost ATNC až u 42 % ze 170 zkoumaných vzorků komerčních piv. Maximální obsah ATNC činil 569 µg (N-NO)/kg.

Ačkoli Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1992 (MAFF) publikovalo údaje svědčící o neustále sestupném trendu v pozorovaných obsazích ATNC v pivu, v roce 1992 se hodnoty obsahu ATNC v britských pivech pohybovaly v rozmezí <20 až 570 µg (N-NO)/kg. Příjem ATNC z piva při průměrném obsahu 54 µg (N-NO)/kg činil dle MAFF až 50 % z celkového denního příjmu. Pro porovnání, v pivech pšezského typu různých výrobců kolísal dle našich poznatků v roce 1997 obsah ATNC v rozmezí <20 až 267 µg (N-NO)/kg, v roce 1998 v rozmezí <10 až 390 µg (N-NO)/kg a v roce 1999 v rozmezí <10 až 230 µg (N-NO)/kg.

Proto jsme se v této práci pokusili o podrobnější studium zastoupení jednotlivých látek spadajících do skupiny ATNC v pivech pšezského typu.

Doposud doporučený limit obsahu ATNC v pivu platí zatím pouze ve Velké Británii a činí 20 µg N-NO/l.

3 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ ATNC A NETĚKAVÝCH N-NITROSAMINŮ A JEJICH OBSAH V PIVU A SLADU

Způsob, jakým jednotliví autoři přistupují ke stanovení ATNC, je velmi odlišný. Důvodem je současný neuspokojivý stav poznání, jaké látky tuto skupinu převážně tvoří. Většina metod zaměřených na stanovení celkového množství nitrososloučenin v pivu pracuje na principu metody publikované Waltersem et al., 1978. Tato metoda spočívá na chemickém rozkladu N-NO skupiny obsažené v molekule sloučenin působením roztoku HBr v kyselině octové. Uvolněný nitrosylbromid, případně oxid dusnatý, je následně stanoven přímo kolorimetricky nebo po katalytickém rozštěpení na nitrosylový radikál chemiluminiscenčním detektorem. Detailně byla metoda a postup popsána a modifikována Waltersem et al., 1983.

Kromě dnes již téměř zapomenuté metody stanovení ATNC pomocí Griessova činidla (Dikun, 1976) se v běžné praxi setkáváme převážně s metodami využívajícími rozklad N-NO skupiny pomocí HBr v ledové kyselině octové (Massey et al. 1984a,b, Walters et al. 1984). Uvolněný oxid dusnatý, respektive nitrosylový radikál je dále stanoven chemiluminiscenčním detektorem TEA (Thermo Energy Analyzer). Společnou nevýhodou výše uvedených metod je neschopnost rozlišit od sebe jednotlivé stanovené analyty a určit jejich podíl na celkovém stanoveném obsahu ATNC. O jisté řešení tohoto problému se pokusili proto Sen a Seaman, 1983, kteří využili ke stanovení ATNC spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a chemiluminiscenčního detektoru (HPLC-TEA). V tomto případě jsou frakce obsahující jednotlivé zástupce ATNC přivedeny z HPLC do reakční baňky, kde refluxuje směs ethylacetátu a 15% roztoku HBr v kyselině octové. Nitrososkupina je odštěpena a po reakci s ozonem následně detekována detektorem TEA. Tento princip štěpení byl poprvé použit Eisenbrandem a Preussmannem, 1970, a později Waltersem et al., 1979, a Massey et al., 1990.

With regards to the results obtained in our laboratory during recent years, the contents of different compounds in the ATNC group present in beers from different producers are almost certainly not identical. Therefore, detailed knowledge about the amounts of particular compounds could contribute to the assessment of the health risk. Unlike the present practice of considering only the total amount of ATNC, an estimation of the real health risk caused by beer from different producers could improve with the help of measured values.

2 THE PRESENCE OF ATNC IN FOODS AND BEVERAGES

The non-volatile N-nitroso heterocyclic carboxylic acids NSAR, NPRO and NHPRO present in different foods, especially in meat and heat-treated meat products, belong to the ATNC group (Hamburg, 2007, Drabik-Markiewicz et al., 2010, Tricker et al., 1985, Massey – Lees, 1992, Massey et al., 1991). ATNC can also be present in fermented dairy products (Massey – Key, 1989, Bouchikhi et al., 1999). Sen et al., 1983 and Sen – Seaman, 1983, gave values from 0.7 to 6.0 µg/L for the content of NPRO in beer. The content of NPRO in the malt varied from 5.0 to 113 µg/kg and no NSAR was detected. Pollock, 1981 presented similar results. According to him, the content of NSAR in malt was 20 µg/kg and the content of NPRO was 286 µg/kg. Massey et al., 1990 found the presence of ATNC in 42 % of 170 tested samples of commercial beers. The maximum content was 569 µg N-NO/kg.

The values for British beers in 1992 ranged from <20 to 570 µg N-NO/kg however, the data published by Ministry of Agriculture, Fisheries and Food in UK, 1992 (MAFF) gives evidence of a downward trend for the contents of ATNC in beer. According to MAFF, the average daily intake of ATNC from beer of 54 µg N-NO/kg came up to 50% of the daily allowance. For comparison, according to our knowledge the content of ATNC in pilsner beers from different producers varied in 1997 from <10 to 267 µg N-NO/kg, in 1998 from <10 to 390 µg N-NO/kg and in 1999 was only in the range from <10 to 230 µg N-NO/kg.

The aim of this study was a more detailed examination of the amounts of particular compounds belonging to the group of ATNC in pilsner beers.

Up to now, the recommended limit of ATNC in beer of 20 µg N-NO/kg was only introduced in Great Britain.

3 ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF ATNC AND NON-VOLATILE N-NITROSAMINES IN BEER AND MALT

The approaches from different authors for the estimation of apparent total nitroso compounds differ considerably. The reason for this is insufficient knowledge about which compounds really belong to this group. The majority of procedures for the determination of ATNC in beer use the principle published by Walters et al., 1978. This method is based on chemical degradation of the N-NO group using hydrobromic acid (HBr) in glacial acetic acid. The nitrosyl bromide or nitric oxide released is determined by a colorimetric method or by a chemiluminescence detector after a catalytic splitting to the nitrosyl radical. This approach was described in detail and modified by Walters et al., 1983.

Apart from the presently almost forgotten method for determination of ATNC by using a Griess reagent (Dikun, 1976) the common methods used in practice base on the degradation of the N-NO group using a mixture HBr in glacial acetic acid and followed by chemiluminescence detection of the nitric oxide or nitrosyl radicals released with a Thermal Energy Analyzer (TEA) (Massey et al. 1984a,b, Walters et al. 1984).

The common disadvantage of the methods mentioned above is the inability to distinguish between the particular analytes both qualitatively and quantitatively. Sen and Seaman, 1983, tried to resolve this problem by using high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a chemiluminescence detector (HPLC-TEA) for the determination of the ATNC. According to this method, the different fractions were collected in reaction flasks by refluxing with a mixture of ethyl acetate and the solution of HBr in glacial acetic acid. The nitroso groups split off and after reaction with ozone are detected by the TEA detector. This splitting method was first used by Eisenbrand and Preussmann, 1970, then later by Walters et al., 1979 and Massey et al., 1990.

Rozsáhlé spektrum těkavých i netěkavých nitrosaminů tvořících určitou část ATNC lze též stanovit metodami využívajícími v prvním stupni denitrosaci pomocí směsi HBr – kyselina octová, avšak významně se lišícími vlastní analytickou koncovkou. Na rozdíl od předešlých metod jsou zde však stanoveny vznikající aminy (Wang et al., 1992, Zheng et al., 1993, Fu et al., 1993).

Havery, 1990, navrhl postup spočívající v dělení jednotlivých nitrosaminů pomocí HPLC, post-kolonové denitrosaci N-nitrososloučenin pomocí směsi 10 % H_2SO_4 a octové kyseliny a 10 % vodného roztoku KJ a následné detekci vznikajícího oxidu dusnatého pomocí TEA. Touto metodou již byl stanoven kromě těkavých N-nitrosaminů i netěkavý N-nitrosamin N-nitrosoprolin.

Denitrosaci lze dle Wang et al., 2005, provést i pomocí roztoku CuCl v 6N HCl.

Možností stanovit netěkavé N-nitrosaminy voltamperometrickou detekcí ve spojení s HPLC se zabývá též práce Sachetta et al., 1992.

Stanovením netěkavých N-nitrosaminů, zejména N-nitrosoamino-kyselin, se zabývali převážně autoři pracující v oblasti potravinářské chemie. První pokus o systematické stanovení N-nitrosoprolinu (NPRO) a N-nitrososarkosinu (NSAR) ve sladu pomocí jejich extrakce ethylacetátem, derivatizací diazomethanem a stanovením na přístrojovém spojení GC-TEA učinil Pollock, 1981. Obdobný postup i způsob detekce zvolili Sen et al., 1983, kteří k extrakci použili opět ethylacetát, ale k derivatizaci směs BF_3 – methanol. Johnson et al., 1988a naproti tomu použili k derivatizaci silylační činidlo bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA).

O odlišení jednotlivých představitelů ATNC v pivu se pokusili Massey et al., 1982. Netěkavé N-nitrosaminy byly extrahovány v kyselém a neutrálním prostředí pomocí speciální kolony (Preptube) a stanoveny pomocí spojení HPLC-TEA. Obdržené chromatogramy se od sebe podstatně lišily, nicméně přístrojové vybavení neumožnilo, s výjimkou NPRO, jejich kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení. Přehled metod použitelných pro stanovení netěkavých N-nitrosaminů uvádí Sen a Kubacki, 1987. Pokroky v oblasti kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie umožnily detekovat další dosud neznámé zástupce netěkavých N-nitrososloučenin v potravinách (Tricker et al., 1984, Cheng – Tsang, 1999, Crews, 2010).

4 MECHANISMUS VZNIKU NITROSO-SLOUČENIN V PIVU A SLADU

N-nitrosaminy vznikají obecně působením nitrosačního činidla. V zásadě se jedná o substituci vodíkového atomu dislokovaného na dusíkovém atomu amino- nebo amidoskupiny nitrososkupinou. Na rozdíl od obecně rozšířeného mylného názoru, že vlastním nitrosačním činidlem je NO^- skupina nebo kyselina dusitá, lze pokládat za skutečné nitrosační činidlo N_2O_3 případně protonizovanou formu kyseliny dusité (Shuker, 1988, Smith, 1991).

Poměr v obsahu jednotlivých nitrosačních činidel je závislý na pH (Shuker, 1988), přičemž v oblasti pH nižší než 2 převládá přítomnost H_2NO_2^+ , zatímco při pH vyšším než 3 dominuje N_2O_3 . Nicméně v oblasti pH 2 až 5 jsou oba ionty přítomny v detekovatelném množství. Je tedy zřejmé, že hodnota pH mladiny a piva má spolu s koncentrací neprotonizovaného aminu rozhodující vliv na množství vznikajících nitrosaminů. Vznik zbývajících dvou nitrosačních činidel nepříchází za standardních podmínek, s ohledem na reakční podmínky v pivu, prakticky v úvahu.

Základní cestou umožňující N-nitrosaci v pivovarství jsou asimilační metabolické procesy u divokých kvasinek (Brown et al., 1974, Cole, 1988, Garrett-Amy, 1979, Smith, 1992) a disimilační procesy probíhající při anaerobním dýchání u kontaminujících fakultativních anaerobů (Cole, 1988, Garrett-Amy, 1979, Ingledew-Poole, 1984, Moodie-Ingledew, 1990, Stouthamer, 1976, Smith et al., 1992). Výskyt ATNC v pivu lze tudíž považovat za projev nedokonalé mikrobiální čistoty výrobního procesu (Caldebrank-Hammond, 1989). Metodami pro zkoumání přítomnosti volného a vázaného NPRO na bílkoviny piva se zabývali Johnson et al., 1988b. Studium mechanismu vzniku ATNC ve sladu se zabývali Pollock, 1981 a Johnson et al., 1987.

5 MATERIÁLY A METODY

Chemikálie

Všechny použité chemikálie, tj. ethylacetát, hydroxid draselný, kyselina octová, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina sulf-

The large spectrum of volatile and non-volatile nitrosamines belonging to the ATNC could also be evaluated by a procedure using as a first step a denitrosation with a mixture of 15 % HBr in glacial acetic acid. The following step is however significantly different. Unlike in other methods, in this case the detected substances are amines (Wang et al., 1992, Zheng et al., 1993, Fu et al., 1993).

Havery, 1990, suggested an approach consisting of separation of the particular nitrosamines using HPLC followed by a post-column denitrosation of the N-nitroso compounds with a mixture of 10 % H_2SO_4 , acetic acid and 10 % KJ in water. The nitric oxides derived were detected by TEA. By this method were determined some volatile N-nitrosamines and the non-volatile N-nitrosamine NPRO.

According to Wang et al., 2005, a mixture of CuCl in 6N HCL could also make the denitrosation.

Sachetto et al., 1992, described a HPLC determination of non-volatile N-nitrosamines followed by voltammetric detection.

Authors involved in food chemistry were mainly dealing with the problem of measurement of non-volatile N-nitrosamines and N-nitrosoamino acids. Pollock, 1981, made a first attempt for systematic determinations of NPRO and NSAR in malt by using an extraction with ethyl acetate followed by derivatization with diazomethane and determination by GC-TEA. Sen et al., 1983, had chosen a similar approach. Accordingly, the extraction was carried out with ethyl acetate but a mixture of BF_3 and methanol was used for the derivatization. Johnson et al., 1988a, used a silylating reagent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) for the derivatization.

Massey et al., 1982, tried to separate individual ATNC in beer. The non-volatile N-nitrosamines were extracted in an acidic and then in a neutral medium using a special column (Preptube) and determined by HPLC-TEA. The chromatograms obtained differ considerably. However, with exception of NPRO they could be evaluated neither quantitatively nor qualitatively. Sen and Kubacki, 1987, published a review of methodologies for the determinations of non-volatile N-nitrosamines. The advancements in liquid chromatography and mass spectrometry have enabled the detection of further hitherto unknown types of non-volatile N-nitroso compounds in foods (Tricker et al., 1984, Cheng – Tsang, 1999, Crews, 2010).

4 MECHANISM OF NITROSO COMPOUND FORMATION IN BEER AND MALT

N-nitrosamines are generated by reaction with nitrosation reagents. This process involves a substitution of a hydrogen atom from the amino group or amide group by a nitrosonium ion NO^+ . According to a generally spread misconception, nitrosyl ion NO^- or nitrous acid HNO_2 are considered as nitrosation reagents. However, the real nitrosation reagents are N_2O_3 and eventually a protonated form of nitrous acid H_2NO_2^+ (Shuker, 1988, Smith, 1991).

The ratio of nitrosation reagents depends on the pH value (Shuker, 1988). At a pH lower than 2 H_2NO_2^+ predominates, whereas at pH's higher than 3 N_2O_3 predominates. In a medium with pH between 2 and 3 both ions are present in detectable amounts. Therefore, it is obvious that the pH's of hopped wort and of beer together with the concentration of non-protonated amines have the final impact on the amount of amines formed. The formation of the two remaining nitrosation reagents is impossible, with regards to the reaction conditions in beer under standard conditions.

The N-nitrosation process in beer production is generally possible due to the assimilation metabolic processes in brewery wild yeasts (Brown et al., 1974, Cole, 1988, Garrett-Amy, 1979, Smith, 1992) and due to dissimilation processes running from the anaerobic respiration in contaminating anaerobic bacteria (Cole, 1988, Garrett-Amy, 1979, Ingledew-Poole, 1984, Moodie-Ingledew, 1990, Stouthamer, 1976, Smith et al., 1992).

Therefore, the occurrence of ATNC in beer can be regarded as a demonstration of the poor microbial purity of the manufacturing process (Caldebrank-Hammond, 1989). Johnson et al. 1988b, dealt with methods for the examination of the presence of free or protein-bonded NPRO in beer. Pollock, 1981, and Johnson et al., 1987, examined the mechanism of ATNC formation in malt.

5 MATERIAL AND METHODS

Chemicals

All reagents used such as ethyl acetate, potassium hydroxide,

anilová, amidosulfonan draselný, byly čistoty p.a. Bromovodík p.a. pocházel od firmy Sigma – Aldrich. Sorbent Extrelut 20 byl dodán firmou (Merck, Germany). SPE kolonky SAX Bond Elute, 3 ml byly dodány firmou Analytichem International Inc., USA. Standardy NPRO, NSAR a NPIC pocházely od firmy ISCONLAB (Heidelberg, Německo), NDMA od firmy Supelco. Ultračistá voda byla vyrobena na zařízení Milli-Q System (Millipore, USA). Technické plyny pro plynovou chromatografii argon, kyslík a dusík a pevný oxid uhličitý byly dodány firmou Messer (ČR).

Vzorky piva

Piva plzeňského typu cizí i tuzemské provenience byla zakoupena v běžné obchodní síti.

Analytický postup pro stanovení ATNC v pivu

Celkový obsah skupiny N-NO ve vzorku byl stanoven denitrosační metodou pomocí HBr a detekcí prostřednictvím detektoru TEA (Kellner et al., 1991).

Vzorek piva odpěněním na ultrazvukové lázni po dobu 5 až 10 minut. K 5 ml odplyněného piva přidáme 1 ml amidosulfonanu amonného ($c = 0,2 \text{ mol/l}$) a 1 ml kyseliny sírové ($c = 0,2 \text{ mol/l}$) a ponecháme 15 až 60 minut stát. Po této době je pivo zbaveno dusičnanů i dusitanů a připraveno k analýze. Kondicionaci kolonky SAX Bond Elute provádíme promytím 3 ml methanolu, 3 ml HCl ($c = 0,01 \text{ mol/l}$) a sorbent krátce vysušíme pomocí vakua (5 s). Směs převedeme přes kondicionovanou kolonku pomocí vakua, přičemž první podíl filtrátu (cca 2 ml směsi) odstraníme.

Do tříhrdlé zábrusové baňky obalené izolační vrstvou (skelná tkanina – Al fólie) nadávkuje 70 ml ethylacetátu, 10 ml denitrosačního činidla (15% hm. HBr v kyselině octové) a 2 g kyseliny sulfanilové. Směs je opatrně zahřívána pod zpětným chladičem (teplota směsi $64^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) a kapilárou, která je postranním hrdlem zavedena ke dnu baňky, ponecháme jemně probublávat argon. Celá aparatura je hermeticky uzavřena a přes dvě promývačky naplněné 33% roztokem KOH, restriktor, dva vymrazovače (-80°C , směs methanol a suchý led) spojené restriktorem a skleněný kapilární restriktor je napojena přes třicestný T-ventil na detektor. Po ustavení rovnováhy v aparatuře a po ustálení základní linie nastříkneme 200 μl standardu ($c = 200 \text{ } \mu\text{g/l}$) postranním hrdlem, které je uzavřeno septem a zahájíme analýzu. Dále nastříkneme 200 μl vzorku. Následuje nástřik slepého vzorku. Měření vzorku uzavírá opět měření standardu.

Analytický postup pro stanovení netěkavých N-nitrosaminů (NSAR, NPRO) v pivu

15 ml vzorku piva (neozářeného nebo ozářeného UV světlem) bylo smíšeno s 3 ml H_2SO_4 ($c = 1,5 \text{ mol/l}$) a s 1 ml 1% roztoku amidosulfonanu amonného (amonná sůl kyseliny amidosírové – $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{NH}_4$). Přídavek amidosulfonanu amonného slouží v tomto případě k odstranění zbytkových množství dusitanových iontů. Nitrosopiepekolová kyselina (NPIC, 1-nitrosopiperidin-2-karboxylová kyselina) byla použita jako interní standard (15 μl , $c = 100 \text{ mg/l}$).

Do skleněné kolony (délka 18 cm, vnitřní průměr 2 cm) opatřené fritou nejprve nasypeme 5 mm vrstvu bezvodého síranu sodného a dále za stálého poklepávání přidáme 12 g sorbentu Extrelut 20 (Merck). Upravený vzorek piva zvolna převedeme na naplněnou kolonu a ponecháme 15 minut vsáknout. Po uplynutí této doby nitrosoaminokyseliny extrahujeme $4 \times 20 \text{ ml}$ ethylacetátu. Extrakt zahustíme na vakuové odparce na přibližný objem 2 ml a koncentrát kvantitativně převedeme do kalibrované nádoby. Residua koncentráty vypláchneme přídavkem 2 ml ethylacetátu. V kalibrované nádobce koncentrát zahustíme proudem dusíku na konečný objem 200 μl .

Organický extrakt (200 μl), respektive roztok standardu v ethylacetátu, smísíme v reakční nádobce s 1 ml derivatizačního roztoku $\text{BF}_3 - \text{MeOH}$. Nádobku uzavřeme a směs ponecháme reagovat v temnu po dobu 30 minut při teplotě $65 \pm 5^\circ\text{C}$. Po ochlazení zbytek derivatizačního činidla odstraníme přídavkem 4 ml redestilované vody. Vzniklé methylestery nitrosoaminokyselin dále vytřepáme do 1 ml dichlormethanu a po oddělení dichlormethanovou vrstvou vysušíme přídavkem bezvodého síranu sodného. Takto získané methylestery lze před vlastním stanovením přechovávat při teplotě -18°C po dobu jednoho týdne. Obsah analytů stanovíme pomocí přístrojového spojení plynového chromatografu a chemiluminiscenčního detektoru (GC – TEA). Použití widebore kapilární kolony BD-5 o vnitřním průměru 0,53 mm a tloušťce filmu stacionární fáze $1,5 \text{ } \mu\text{m}$ umožnilo, díky vysoké kapacitě kolony, nástřik až 5 μl vzorku na kolonu. Důsledkem toho byla dosažena uspokojivá citlivost metody.

acetic acid, sulphuric acid, hydrochloric acid, sulfanilic acid, potassium amidosulfate and hydrobromide were of analytical reagent grade (p.a.) quality. Hydrobromide was obtained from Sigma-Aldrich Chemie, GmbH (Buchs, CH). Sorbent Extrelut 20 was supplied by Merck (Darmstadt, D). SPE columns SAX Bond Elute, 3 mL were purchased from Analytichem International Inc. (Menlo Park, CA, U.S.A.). Standard NPRO, NSAR and NPIC were obtained from ISCONLAB (Heidelberg, D), the standard NDMA from Supelco, Inc. (Bellefonte, PA, U.S.A.). The ultra-clean water was produced by Milli-Q System (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.). Technical gases for the gas chromatography such as argon, oxygen and nitrogen were obtained from Messer Technogas s.r.o. (Praha, CZ).

Beer samples

The Czech and foreign beers of pilsner type were purchased in normal supermarkets and preserved at 4°C .

The analytical approach for the determination of ATNC in beer

The total content of N-NO groups in the sample was determined by using denitrosation with HBr and detection with a TEA detector (Kellner et al., 1991).

The beer samples were degassed in an ultrasonic bath for 5 to 10 minutes. 1 mL of ammonium amidosulfate ($c = 0.2 \text{ mol/L}$) and 1 mL of sulphuric acid ($c = 0.2 \text{ mol/L}$) were added to 5 mL of degassed beer. The mixture was kept for 15 to 60 minutes. After that time, all nitrates and nitrites were removed and the beer samples were ready for analysis. The SAX Bond Elute column was conditioned by rinsing with 3 mL of methanol followed by 3 mL of HCl ($c = 0.01 \text{ mol/L}$). The column was then dried by vacuum for 5 seconds. The mixture was transferred to the conditioned SAX Bond Elute column and extracted by vacuum. The first part of the filtrate (approx. 2 mL) was discarded.

Then, 70 mL of ethyl acetate, 10 mL of denitrosation reagent (15% HBr in acetic acid) and 2 g of sulfanilic acid were transferred to a three-neck round-bottom flask with ground glass joints covered with isolation layer of glass fabric and Al-foil. The apparatus was fitted with condenser and carefully heated by heating mantle. The temperature of mixture was held at $64^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. A capillary joined through the side neck to the bottom of the flask supplied fine bubbles of argon. The whole apparatus was hermetically closed. It was joined by means of a three-way T-valve through two washers filled with a 33% solution of KOH, a restrictor, two dry freezers (-80°C , mixture of methanol and dry ice) joined by a restrictor and a capillary restrictor to the detector. After equilibrium was reached in the apparatus and the steady baseline was set up, 200 μL of the standard solution ($c = 200 \text{ } \mu\text{g/L}$) was added through the side neck closed with a septum and the analysis was started. Then, 200 μL of the sample were added followed by 200 μL of a blank sample. The analysis was completed by the injection of 200 μL of the standard solution.

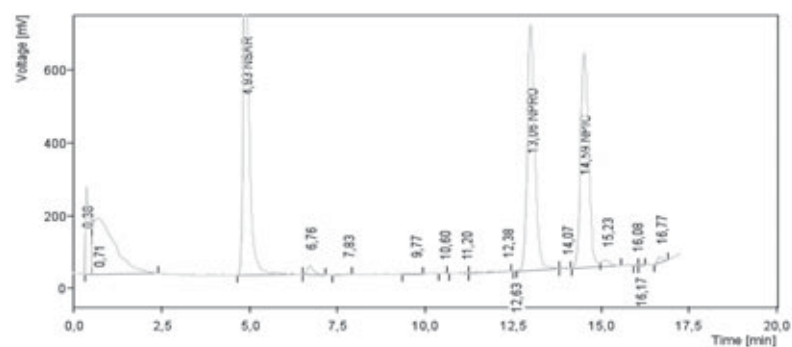
The analytical approach for the determination of non-volatile N-nitrosamines (NSAR and NPRO) in beer

15 mL of the beer sample (exposed and non-exposed to UV light) were mixed with 3 mL of H_2SO_4 ($c = 1.5 \text{ mol/L}$) and 1 mL of 1% ammonium amidosulfate (sulfamic acid ammonium salt – $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{NH}_4$) solution. In this case, the ammonium amidosulfate is added to remove the remaining nitrite ions. The nitrosopiepecolic acid, (NPIC, 1-nitrosopiperidine-2-carboxylic acid) was used as an internal standard (15 μl , $c = 100 \text{ mg/L}$).

A glass column (18 cm x 2 cm i.d.) with a frit was first filled with a 5 mm layer of anhydrous sodium sulphate. Then 12 g of sorbent Extrelut 20 (Merck, Darmstadt) was added with steady tapping. The prepared beer sample was applied slowly to the filled column and left to soak. After 15 minutes, the nitrosoamino acids were extracted four times with 20 mL of ethyl acetate. The extract was concentrated in a vacuum evaporator to an approximate volume of 2 mL and quantitatively transferred to a calibrated vial. The concentrated residue was rinsed with 2 mL of ethyl acetate. Afterwards, the concentrate was evaporated by using a nitrogen stream to the final volume of 200 μL .

This concentrated extract (200 μL) and the solution of the standard in ethyl acetate (for the calibration) were mixed in the reaction vessels with 1 mL of derivatization reagent (BF_3 in MeOH). The vessels were closed and left to react for 30 minutes in the dark at a temperature of $65^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$. After the vessels had cooled down the remaining derivatization reagent was removed with 4 mL of distilled water. The resulting methyl esters of the nitrosoamino acids were extracted with 1 mL of dichloromethane. After the separation, the dichloromethane layer was dried with anhydrous sodium sulphate. The methyl esters obtained by this method could be kept without changes for one week

Obr. 1 Chromatogram obohaceného vzorku piva přidavkem NSAR, NPRO a NPIC (100 µg/l každé látky) / Fig. 1 Chromatogram of spiked beer by addition of NSAR, NPRO and NPIC (100 µg/L each compound)



Podmínky plynové chromatografie

Plynový chromatograf Fisons 8000 Ultra. Fused silica kapilární kolona DB-5 (délka 30 m, ID 0,53 mm, 1,5 µm), Supelco, U.S.A. Teplota injektoru vybaveného wide bore linerem činila 200 °C. Objem nástřiku 5 µl. Nosný plyn argon, průtok 25 ml/min. Teplotní program pece: 80 °C (1 min) – 3,5 °C/min – 150 °C (10 min). Teplota spojení GC-TEA činila 230 °C.

Detektor TEA 502 A byl na vstupu opatřen CTR filtrem (Thermo Electron Corp., USA). Teplota pyrolyzní pece 485 °C. Průtok kyslíku 20 ml/min. Vakuum – 80 Pa (0,6 torr resp. mm Hg). Průtok nosného plynu argonu činil 25 ml/min.

Výtěžnost metody byla ověřena metodou standardního přidavku a činila u NSAR 55,3 %, NPRO 63,0 % a NPIC 133 %. S ohledem na přibližně poloviční výtěžnost u NSAR a NPRO v porovnání s interním standardem byly proto veškeré výsledky získané metodou vnitřního standardu odpovídajícím způsobem korigovány. Chromatogram obohaceného vzorku piva přidavkem NSAR, NPRO a NPIC na koncentraci 100 µg/l každé látky je znázorněn na obr. 1.

Odezva detektoru TEA byla v používaném rozsahu koncentrací 0 až 100 µg/l lineární.

Mez stanovení činila u NSAR, NPRO a NPIC 1 µg/l.

Obsah NDMA byl stanoven standardní metodou pomocí spojení GC-TEA (Spiegelhalder et al., 1983, Čulík et al., 1989).

6 ZÍSKANÉ VÝSLEDKY A DISKUSE

Navržený extrakční postup s využitím sorbentu Extrelut 20 odstranil problémy s tvorbou emulze, ke které dochází v případě klasické extrakce v systému kapalina-kapalina. Maximální objem zpracovávaného vzorku 15 ml lze považovat za dostačující, i když by bylo s ohledem na stopová množství stanovených látek vhodnější zpracovávat větší objem vzorku. Kapacita sorbentu to však neumožňuje. Určitou možností by bylo paralelní zpracování vzorku na více kolonách s následným spojením extraktů a jejich koncentrováním. Pro naše účely však postačovalo zpracování 15 ml piva.

Na základě porovnání výsledků výtěžností NSAR, NPRO, které jsou nižší než výtěžnosti vnitřního standardu NPIC, lze usuzovat, že mohou být tyto sloučeniny, s ohledem na jejich rozdílnou polaritu, vázány na povrchu sorbentu Extrelut 20 s rozdílnou intenzitou, například v důsledku interakce s přítomnými silanolovými skupinami.

Stanovení methylesterů N-nitrosoaminokyselin metodou kapilární plynové chromatografie s detektorem TEA lze považovat za citlivé a selektivní. Dělení analytů na použité koloně bylo, jak v případě standardů, tak i reálného vzorku piva obohaceného přidavkem N-nitrosoaminokyselin, uspokojivé. Výhodou použití widebore kapilární kolony je, kromě výše uvedených předností, i krátký čas analýzy, který činil v našem případě 20 minut.

Ve zkoumaných vzorcích komerčních piv nebyla potvrzena přítomnost NSAR. Množství stanoveného NPRO se pohybovalo v úzkém rozmezí < 1 až 11 µg/l. Obsah NPRO překročil hranici 10 % celkového obsahu ATNC pouze ve výjimečných případech (tab. 1). Získané poznatky korespondují s dříve publikovanými údaji (Massey et al., 1990, Johnson et al., 1988b).

Nebyl zjištěn vzájemný vztah mezi obsahem NPRO a obsahem ATNC. To potvrzuje předpoklad, že se složení ATNC u piv jednotlivých výrobců může podstatně lišit.

at –18 °C. The contents of the individual methyl esters were determined using a gas chromatograph equipped with a chemiluminescence detector (GC-TEA).

The usage of the high capacity wide bored capillary column BD-5 with an internal diameter of 0.53 mm and film thickness of 1.5 µm enabled an injection of up to 5 µL of sample.

Instrumentation and operating conditions

A gas chromatograph Fisons 8000 Ultra (Fisons Instruments Inc., Parkton, MD, U.S.A.) with a TEA 502 detector equipped with a CTR filter (Thermo Electron Corp., Marietta, OH, U.S.A.) was used. The operating conditions were: argon carrier gas at 25 mL/min., the temperature of the injection port equipped with a wide bore liner was 200 °C, the temperature of the connection GC – TEA was 230 °C, the initial oven temperature was held at 80 °C for 1 min., then increased up to 150 °C at a rate of 3.5 °C/min and held for 10 min at this temperature. The injection volume was 5 µL. The temperature of the pyrolysis oven was 485 °C, the oxygen flow rate was 20 mL/min. Vacuum – 80 Pa (0.6 torr or mm Hg). The accuracy of the method was evaluated by using standard addition method. A NSAR recovery of 55.3 %, a NPRO recovery of 63.0 % and a NPIC (internal standard) recovery of 133 % were obtained. Taking into account the approximate half recovery of NSAR and NPRO when compared with the internal standard, all results were correspondingly corrected. The response of the TEA detector was linear within the concentration range from 0 to 100 µg/L. The detection limit for NSAR, NPRO and NPIC was 1 µg/L.

The content of NDMA was determined by a standard method by using GC equipped with TEA detector (Spiegelhalder et al., 1983, Čulík et al., 1989).

6 RESULTS AND DISCUSSION

The commonly used extraction in system liquid-liquid systems causes emulsion formation. The proposed extraction procedure using Extrelut 20 eliminated this problem. The 15 mL maximum volume of beer sample was considered to be sufficient. Considering the trace concentration of the substances determined it would be desirable to collect larger volumes. However, the limiting factor was the capacity of the sorbent column used. Alternatively, the beer samples could be extracted in parallel on more columns and the combined extracts could be then concentrated to the required volume. Nevertheless, for our purpose the 15 mL samples were adequate.

The recoveries of NSAR and NPRO standards are significantly lower than that of the internal standard NPIC. The possible reason could be the different polarity of these compounds. As a result of interaction with the silanol group present, they are more strongly bonded to the surface of the sorbent Extrelut 20.

The determination of the methyl esters of the N-nitrosoamino acids using a capillary gas chromatograph equipped with a TEA detector was satisfactorily sensitive and selective. The separation of the analytes was satisfactory for both the original beer samples and for the beer samples spiked with N-nitrosoamino acids. The additional advantage of using a wide bored capillary column is the short analysis time of 20 minutes.

The presence of NSAR in beer has not been confirmed (Tab. 1). The contents of NPRO were at the determination limit and varied only slightly in interval < 1 až 11 µg/L in different beer samples.

The absolute values obtained were comparable to the former published values (Massey et al., 1990, Johnson et al., 1988b). As shown in Tab. 1, only exceptionally did the content of NPRO exceed the limit of 10 % of the total ATNC content. No correlation has been found between the NPRO content and the total content of ATNC. This fact confirms the assumption that the ATNC content can differ significantly in beers from different producers.

Due to the fact that the majority of nitrosamines have carcinogenic effects, the requirement for the lowest possible content in beer is fully justified and a further investigation in this field is desirable.

Acknowledgements

A part of this study (Project MSM 6019369701) was supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports.

Translated by Ing. Eva Paterson

Tab. 1 Obsah NDMA, NSAR, NPRO ve vzorcích komerčních piv různých výrobců / Contents of NDMA, NSAR and NPRO in samples of commercial beers from different producers

Pivo / Beer	Extrakt pův. mlad. / Original Extract	NDMA	NSAR	NPRO	NPRO *	ATNC
	[%]	[µg/l]	[µg/l]	[µg/l]	N-NO [µg/l]	N-NO [µg/l]
A	12	0.2	ND	7.4	2.3	20
B	10	0.3	ND	8.0	2.5	53
C	12	0.2	ND	8.5	2.6	57
D	12	0.2	ND	8.9	2.7	20
E	12	0.2	ND	8.0	2.5	40
F	10	0.2	ND	7.8	2.2	32
G	12	0.3	ND	7.2	2.2	119
H	10	0.2	ND	9.3	2.8	174
I	Nealko pivo / Non-alcoholic beer	ND	ND	8.3	2.5	71
J	10	0.2	ND	7.8	2.4	38
K	12	0.2	ND	11.0	3.4	102
L	12	0.2	ND	ND	ND	22
M	12	0.2	ND	ND	ND	24

ND = pod mezí stanovení (NDMA < 0,1 µg/l, NSAR, NPRO < 1,0 µg/l) / under the limit of determination (NDMA < 0,1 µg/L, NSAR, NPRO < 1,0 µg/L)

* = obsah NPRO stanoven pomocí GC-TEA a vyjádřen jako ATNC / content of NPRO determined by GC-TEA and expressed as ATNC

Vzhledem k tomu, že většina nitrosaminů vykazuje kancerogenní účinky, zdá se být požadavek na jejich co nejnižší obsah v potravinách oprávněný a další výzkum na tomto poli žádoucí.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MSM 6019369701 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Literatura / References

Bingham, S. A., Hughes, R., Cross, A. J., 2002: Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J. Nutr.* **132**: 3522–3525.

Brown, C. M., McDonald-Brown, D. S., Meers, J. L., 1974: Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. *Advances in Microbiol. Physiol.* **11**: 1–52.

Bouchikhi, B., Mavelle, T., Debry, G., 1999: Effect of the addition of nitrate to milk on the formation of volatile N-nitrosamines and apparent total N-nitroso compounds. *Europ. Food Res. Technol.* **209**(2): 88–92.

Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, D., Avellini, C., Bianchi, S., Bonaguri, Ch., Cipriani, F., Cocco, P., Giacoca, A., Marubini, E., Minacci, Ch., Puntoni, R., Russo, A., Vindigni, C., Fraumeni J. F. Jr., Blot, W., 2006: A case study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrients. *Int. J. Cancer*, **45**(5): 896–901.

Caldebrank, J., Hammond, J. R. M., 1989: Influence of nitrate and bacterial contamination on the formation of apparent total N-nitroso compounds (ATNC) during fermentation. *J. Inst. Brew.* **95**: 277–281.

Cheng, C. F., Tsang, C. W., 1999: Separation of N-nitrosoamino acids by C₁₈ reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography and compatible detection by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **849**(2): 389–402.

Cole, J. A., 1988: The Nitrogen and Sulphur Cycles. *The Society for General Microbiology Symposium* **42**: 281.

Crews, C., 2010: The determination of N-nitrosamines in food. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* **2**(1): 2–12.

Čulík J., Kellner V., Špinar B., Prokeš J., Basařová G., 1989: Těkavé

N-nitrosaminy ve sladu. I. Vliv pesticidů a dusíkatých hnojiv aplikovaných ve vegetačním období na obsah těkavých N-nitrosaminů. *Kvasný Prum.* **10**: 289–292.

Dikun, P. P., 1976: Group evaluation of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds in foodstuffs. *IARC Sci. Publ. No. 14*: 57.

Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., Mey, E., de Impens, S., Kowalska, T., Paelinck, H., Vander Heyden, Y., 2010: Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat. *Anal. Chim. Acta* **657**(2):123–130.

Eisenbrand, G., Preussmann, R., 1970: Eine neue Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Nitrosaminen nach Spaltung der N-Nitrosogruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig. *Arzneim. Forsch.* **20**: 1513–1517.

Fu, C., G., Xu, H., D., Wang, Z., 1993: Sensitive assay system for nitrosamines utilizing high-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection. *J. Chromatogr.* **634**: 221–227.

Garrett, R. H., Amy, N. K., 1979: Nitrate Assimilation in Fungi. *Advances in Microbiol. Physiol.* **18**: 1–65.

Hamburg, A., 2007: N-nitrosoproline and N-nitrososarcosine in Estonian Foodstuffs. *J. Food Safety* **12** (2): 149–159.

Havery, D., C., 1990: Determination of N-Nitroso Compounds by High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Reaction and a Thermal Energy Analyzer. *J. Anal. Toxicol.* **14**: 181–185.

Ingledeu, W. J., Poole, R. K., 1984: The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**: 222–271.

- Janzowski, C., Klein, R., Preussmann, R., Eisenbrand, G., 1982: Nitrosation of sarcosine, proline and 4-hydroxyproline by exposure to nitrogen oxides. *Food Chem. Toxicol.* **20**: 595–597.
- Johnson, P., Pfab, J., Massey, R. C., 1988a: Development of methods for the characterisation of non-volatile N-nitroso compounds in malt. *J. Inst. Brew.* **94**: 19–22.
- Johnson, P., Pfab, J., Massey, R. C., 1988b: method for the investigation of free and protein-bound N-nitrosoproline in beer. *Food Addit. Contam.* **5** (2): 119–125.
- 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** (7–8): 319–321.
- Kellner, V., Čulík, J., Veselý, J., Špinar, B., 1991: Problematika celkových N-nitrososloučenin. *Kvasny Prum.* **37** (7): 193–196.
- Kuhnle, G. G. C., Story, G. W., Reda, T., Mani, A. R., Moore, K. P., Lunn, J. C., Bingham, S. A., 2007: Red meat and colon cancer: Heme proteins and nitrite in the gut. A commentary on „Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract“, **43** (7): 1037–1039.
- Lin, K., Wu, Y., Shen, W., 2009: Interaction of total N-nitroso compounds in environment and in vivo on risk of esophageal cancer in the costal area, China, *Environment Int.* **35** (2): 376–381.
- Massey, R. C., Crews, C., Mcweeny, D. J., 1982: Method for high-performance liquid chromatographic measurement of N-nitrosamines in food and beverages. *J. Chromatogr.* **241**: 423.
- Massey, R., Dennis, M. J., Pointer, M., Key, P. E., 1990: An investigation of the levels of N-nitrosodimethylamine, apparent total N-nitroso compounds and nitrate in beer. *Food. Addit. Contam.* **7** (5): 605–615.
- Massey, R. C., Key, P. E., 1989: Examination of some fermented foods for the presence of apparent total N-nitroso compounds. *Food Addit. Contam.* **6** (4): 453–458.
- Massey, R. C., Key, P. E., Jones, R. A., Logan, G. L., 1991: Volatile, non-volatile and total N-nitrosocompounds in bacon. *Food Addit. Contam.* **8** (5): 585–598.
- Massey, R. C., Key, P. E., Mcweeny, D. J., Knowles, M. E., 1984a: The application of chemical denitrosation and chemiluminescence detection procedure for estimation of apparent concentration of total N-nitroso compounds in food and beverages. *Food. Addit. Contam.* **1**(1): 11–16.
- Massey, R. C., Key, P. E., Mcweeny, D. J., Knowles, M. E., 1984b: The application of chemical denitrosation and chemiluminescence detection procedure for estimation of the apparent total N-nitroso compounds in foods and beverages. *Food. Addit. Contam.* **1**: 11–16.
- Massey, R. C., Lees, D., 1992: Surveillance of preservatives and their interactions in foodstuffs. *Food Addit. Contam.* **9**(5): 435–440.
- Mcweeny, D. J., 1983: Nitrosamines in Beverages. *Food Chem.* **11**: 273–287.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Food, 1992, Surveillance Paper No. 32.
- Moodie, A. D., Ingledew, W. J., 1990: Microbial Anaerobic Respiration. *Adv. Microbiol. Physiol.* **31**: 225–269.
- 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-nitrosopipecolinic acid. *J. Inst. Brew.* **87**: 356–359.
- Sacchetto, G. A. et al., 1992: Liquid chromatographic determination of non-volatile nitrosamines by post-column redox reactions and voltammetric detection at solid electrodes. Behaviour of the Ce(IV)-Ce(III) couple at gold, platinum and glassy carbon electrodes and suitability of the Ce(IV) reagent. *Anal. Chim. Acta* **258**: 99–108.
- Sen, N. P., Kubacki, S. J., 1987: Review of methodologies for the determination of nonvolatile N-nitroso compounds in foods, *Food Addit. Contam. Part A*, **4** (4): 357–384.
- Sen, N. P., Seaman, R., 1983: On/line combination of high-performance liquid chromatography and total N-nitroso determination apparatus for the determination of N-nitrosamides and other N-nitroso compounds, and some recent data on the levels of N-nitrosoproline in foods and beverages. *Proc. on 8 th Intl. Meeting on N-Nitroso Compounds. Occurrence and Biological Effects.* Sept. 5–9, Banff, Alberta, Canada.
- Sen, N. P., Tessier, L., Seaman, S. W., 1983: Determination of N-nitrosoproline and N-nitrososarcosine in Malt and Beer. *J. Agric. Food Chem.* **31** (5): 1033–1036.
- Shuker, D. E. G., 1988: in *N-Nitrosamines – Toxicology and Microbiology*, Ed. Hill M. J., kap. 3, Ellis Horwood Ltd.
- Smith, N. A., 1991: N-Nitrosamines in brewing. *23. Proc. EBC, Lisbon*, 561–568.
- Smith, N. A., 1992: Nitrate reduction and ATNC formation by brewery wild yeasts. *J. Inst. Brew.* **98** (5): 415–420.
- Smith, N. A., Smith, P., Woodruff, C. A., 1992: The role of *Bacillus* spp. in N-nitrosamine formation during wort production. *J. Inst. Brew.* **98** (5): 409–414.
- Spiegelhalter B., Eisenbrand G., Preussmann R., 1983: IARC Sci. Publ. No. 45: 115.
- Stouthamer, A. H., 1976: *Biochemistry and Genetics of Nitrate Reductase in Bacteria*. *Adv. Microbiol. Physiol.* **14**: 315–375.
- Stuff, J. E., Goh, E. T., Barrera, S. L., Bondy, M. L., Forman, M. R. J., 2009: Food Comp. and Anal. Construction of an N-nitroso database for assessing dietary intake., **22**: 42–47.
- Tricker, A. R., Perkins, M. J., Massey, R. C., Mcweeny D. J., 1985: Some nitrosoaminoacids in bacon adipose tissue and their contribution to the total N-nitroso compound concentration, *Z. Lebensmittelforsch.* **180** (5): 379–383.
- Tricker, A. R., 2000: Nitrosamines. In *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Francis, F. J., Ed., John Wiley and Sons: N.Y., pp. 1707–1716.
- Tricker, A. R., Perkins, M. J., Massey, R. C., Bishop, C., Key, P. E., Mcweeny, D. J., 1984: Incidence of some non-volatile N-nitroso compounds in cured meats, *Food Addit. Contam. Part A*, **1** (3): 245–252.
- Walters, C. L., Downes, M. J., Edwards, M. W., Smith, P. L. R., 1978: Determination of a Non-volatile N-nitrosamine on a Food Matrix, *Analyst*, **103**: 1127–1133.
- Walters, C. L., Hart, R. J., Smith, P. L. R., 1983: Analysis of total N-nitroso compounds as a group by denitrosation to nitric oxide, with detection using a chemiluminescence analyser. *IARC Sci. Publ. No.* **45**: 295.
- Walters, C. L., Hart, R. J., Perse, S. Z., 1979: Determination of nitrate at low level without prior extraction and its differentiation from nitrite. *Lebensm. Unters. Forsch.* **169**: 1–3.
- Walters, C. L., Smith, P. L. R., Reed, P. I., 1984: Pitfalls to avoid in determining N-nitroso compounds as a group. In: *N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*. *IARC Sci. Publ. No.* 57: 137.
- Wang, J., Chan, 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.
- Wang, Z., Xu, H., D., Fu, C. G., 1992: Sensitive fluorescence detection of some nitrosamines by precolumn derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **589**: 349–352.
- Williams, C. L. H., 1988: in *Nitrosation*, Cambridge University Press: N.Y.
- Wu., Y., Chen, J., Ohshima, H., Pignatelli, B., Boreham, J., Li, J., Campbell T. C., Peto, R., Bartsch, H., 2006: Geographic association between urinary excretion of N-nitroso compounds and oesophageal cancer mortality in China, *Int. J. Cancer* **54**(5): 713–719.
- Zheng, M., H., Fu, C., G., Xu, H., D., 1993: *Analyst* **118**: 269–271.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 5. 10. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 27. 11. 2011