

Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství Část II. – Studium účinků UV záření na ATNC a vybrané zástupce N-nitrosoaminokyselin v pivu

Non-Volatile N-Nitrosamines In Brewing Industry Part II. – Study of the Effect of UV Irradiation on the ATNC and Some Representatives of N-nitrosoaminoacids in Beer

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 44 Praha, Czech Republic

e-mail: culik@beerresearch.cz

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M.: Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství. Část II. Studium účinků UV záření na ATNC a vybrané zástupce N-nitrosoaminokyselin v pivu. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 2, s. 26–29.

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 byly proto podány základní informace týkající se jejich výskytu, mechanismu vzniku a metod stanovení v pivu a ostatních potravinách.

Tato část je věnována výsledkům studia účinků UV záření na celkové nitrosovatelné látky (ATNC) a jejich složky, N-nitrosoaminokyseliny nitrososarkosin (NSAR) a nitrosoprolin (NPRO) a hlavního zástupce těkavých N-nitrosaminů v pivu N-nitrosodimethylamin (NDMA). Cílem práce bylo určit na základě znalosti změn obsahu a průběhu rozkladu jednotlivých představitelů při ozařování jejich povahu a podíl na celkovém obsahu ATNC v pivu. Aby bylo možné nalézt rozdíly v průběhu rozkladu ATNC, N-nitrosoaminokyselin a NDMA působením UV světla, byl sledován rozklad celkových nitrosovatelných látek (Apparent Total N-Nitroso Compounds, ATNC) a dále vybraných N-nitrosoaminokyselin v původním a obohaceném pivu. Ke stanovení vybraných zástupců netěkavých nitrosaminů, N-nitrosoaminokyselin nitrosoprolinu (NPRO) a nitrososarkosinu (NSAR), tvořících určitý neznámý podíl ATNC v pivu, byla použita metoda založená na detekci jejich methylesterů pomocí plynové chromatografie a chemiluminiscenční detekce detektorem TEA. Obsah těkavých N-nitrosaminů byl stanoven pomocí přístrojového spojení GC-TEA, obsah ATNC metodou Walterse et al.

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M.: Non-volatile N-nitrosamines in brewing industry. Part II. – Study of the Effect of UV Irradiation on the ATNC and Some Representatives of N-nitrosoaminoacids in Beer. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 2, p. 26–29.

Contrary to volatile N-nitrosamines, about mechanism of decomposition of apparent total N-nitroso compounds and non-volatile nitrosamines e.g. N-nitrosoaminoacids in beer 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.

The second part of this article is dedicated to the study of the effect of UV irradiation on the ATNC and their some components N-nitrosoaminoacids nitrososarkosine (NSAR), nitrosoprolin (NPRO) and the main representative of volatile N-nitrosamines N-nitrosodimethylamine (NDMA) in beer. The purpose of this study was to assign previously unknown contents of selected nitroso compounds found in the ATNC in beer on the account of knowledge about changes of their content and process of degradation during UV irradiation. In order to find the differences between degradation processes of ATNC, N-nitrosoaminoacids and NDMA during exposure to UV light, the decomposition of the ATNC originally present in beer and the decomposition of selected non-volatile nitrosamines added in a model beer were studied. The determination of selected non-volatile nitrosamines and N-nitrosoamino acids N-nitrosoprolin (NPRO) and N-nitrososarkosine (NSAR) was accomplished using a slightly modified gas chromatographic method based on the chemiluminescence detection of the methyl-esters with a thermal energy analyzer (TEA) detector. The content of volatile N-nitrosamines was also determined by using the connection GC-TEA. For the determination of the ATNC content, the method Walters et al. was applied.

Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Jurková, M.: Unflüchtige N-Nitrosamine im Brauwesen. Teil II. – Das Studium der UV Strahlungswirkungen auf ATNC und auf die ausgesuchten N-Nitrosoaminoacids im Bier. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 2, S. 26–29.

Zum Unterschied von den flüchtigen N-Nitrosaminen gibt's in dem Brauwesen nur zu wenige Informationen über unflüchtigen N-Nitrosaminen. Im den ersten Teil unserer Arbeit, der der Problematik von unflüchtigen N-Nitrosaminen gewidmet sei, wurden die Grundinformationen über das Vorkommen von unflüchtigen Nitrosaminen, Mechanismus des Entstehens und Methoden ihrer Feststellung im Bier und in den anderen Lebensmitteln bekanntgemacht. Im den II. Teil wurde die Aufmerksamkeit den Ergebnissen des Studiums der UV Strahlungswirkungen auf die gesamte nitrosierbaren Stoffe (ATNC) und ihre Komponente N-Nitrosoaminoacids, Nitrososarkosin (NSAR) und Nitrosoprolin (NPRO) und auf den Hauptvertreter der unflüchtigen N-Nitrosamine auf den N-Nitrosodimethylamin (NDMA) im Bier gewidmet. Um die Unterschiede während der ATNC, N-Nitrosoaminoacids- und NDMA – Zerlegung durch die UV Bestrahlung feststellen zu können, wurde die Zerlegung der gesamten nitrosierbaren Stoffen (Apparent Total N-Nitroso Compounds, ATNC), weiter hin eine Zerlegung der ausgesuchten N-Nitrosoaminoacids im ursprünglichen und im angereicherten Bier ermittelt. Zur Bestimmung der ausgesuchten unflüchtigen Nitrosaminenvertreter (N-Nitrosoaminoacidsnitrosoprolin (NPRO) und Nitrososarkosin (NSAR), die einen gewissen unbekannten ATNC Anteil im Bier bilden, wurde eine auf Grund einer Methylesterdetektion mittels Gaschromatographie und Chemiluminiscenzdetektion mittels TEA Detektor gegründete Methode angewandt. Der Gehalt an flüchtigen N-Nitrosamine wurde durch Instrumentsverbindung GC-TEA und Gehalt an ATNC durch Methode Walters et al. ermittelt.

Klíčová slova: netěkavé nitrosaminy, ATNC, Apparent Total N-Nitroso Compounds, NSAR, NPRO, rozklad, analýza, pivo

Keywords: non-volatile nitrosamines, ATNC, Apparent Total N-Nitroso Compounds, nitrososarkosine (NSAR), nitrosoprolin (NPRO), UV light, decomposition, beer

1 ÚVOD

Význačnou vlastností N-nitrosaminů je jejich fotosensibilita. K rozkladu světlem dochází jak ve viditelné, tak i ultrafialové oblasti (Chow, Y. L. a Colon, C. J., 1968, Chow, Y. L., 1973). Detailním studiem chování N-nitrosaminů po UV ozáření ve vodném prostředí se zabývali Volmer et al. (Volmer, D. A. a Lay, J. O., 1996).

2 MATERIÁLY A METODY

Detailně byly jednotlivé analytické postupy stanovení těkavých a netěkavých nitrosaminů a ATNC popsány v prvním díle této publikace (Kellner, V. a Čulík, J. 1991, Čulík J. a Kellner V. 1989, Čulík J. a Horák T. 2012).

Účinky UV záření na kinetiku rozkladu těkavých a netěkavých N-nitrosaminů v pivu byly studovány pomocí modelových zkoušek na původních a obohacených vzorcích piv. Z důvodu vzájemné porovnatelnosti výsledků a s ohledem na minimalizaci možného vlivu matričního efektu, byly vyjádřeny původně přítomné látky i přidávané těkavé a netěkavé nitrosaminy jako celkové ATNC. Přítomnost těkavých N-nitrosaminů v modelovém vzorku byla simulována přidávkou N-nitrosodimethylaminu (NDMA). V případě netěkavých N-nitrosaminů byl jejich obsah v modelovém vzorku zvýšen přidávkou směsi N-nitrosoaminokyselin NPRO, NSAR a NPIC (vnitřní standard). Časové závislosti rozkladu NDMA a N-nitrosoaminokyselin v pivu působením UV světla jsou znázorněny na obr. 1 a 2.

Pracovní postup byl následující: 5 ml piva o známém obsahu ATNC bylo smíseno s 5 μ l standardního roztoku NDMA (o přibližné koncentraci 200 mg/l) nebo s 3 x 5 μ l standardního roztoku NPRO, NSAR resp. NPIC (o přibližné koncentraci 100 mg/l). Obohacené vzorky byly ozařovány z bezprostřední vzdálenosti pomocí UV výbojky (vlnová délka 200–280 nm, převládající složka UV činila 254 nm) po dobu 14 hodin. V přesně stanovených časových intervalech byly odebrány vzorky neobohaceného a obohaceného piva rozdílných výrobců a tyto analyzovány na celkový obsah ATNC (Kellner, V. a Čulík, J. 1991), obsah NDMA (Čulík J. a Kellner V. 1989) a N-nitrosoaminokyselin (Čulík, J. a Horák, T. 2012).

3 ZÍSKANÉ VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve zkoumaných vzorcích komerčních piv nebyla potvrzena přítomnost NSAR. Množství stanoveného NPRO se pohybovalo v úzkém rozmezí < 0,1 až 11 μ g/l.

Studium účinků UV záření na těkavé a netěkavé nitrosaminy přítomné v pivu přineslo některé zajímavé výsledky.

Křivky rozkladu těkavého nitrosaminu NDMA, netěkavých N-nitrosoaminokyselin i původně přítomných ATNC vykazují obdobný průběh (obr. 1 a 2). Z toho lze usuzovat, že se v případě ATNC jedná o komplex sloučenin příbuzných těkavým a netěkavým nitrosaminům.

Zajímavým jevem, se kterým jsme se setkali u většiny piv, bylo kolísání obsahu těkavých nitrosaminů i netěkavých N-nitrosoaminokyselin v prvních osmi hodinách po započatí ozařování. Možným vy-

1 INTRODUCTION

A distinctive property of N-nitrosamines is their photosensitivity. Decomposition is running in both the visible and the ultraviolet light regions (Chow, Y. L. a Colon, C. J., 1968, Chow, Y. L. 1973). Volmer et al. (Volmer, D. A. a Lay, J. O. 1996) published a detailed study of the behaviour of N-nitrosamines in water solutions after UV exposure.

2 MATERIAL AND METHODS

Detailed were the individual analytical procedures for estimation of volatile and non-volatile nitrosamines and ATNC described in the first part of this article (Kellner, V. and Čulík, J. 1991, Čulík J. and Kellner V. 1989, Čulík J. and Horák T. 2012)

The influence of UV light on the kinetics of degradation volatile and non-volatile N-nitrosamines in beer was studied by means of model experiments with original and spiked beer samples.

In order to compare the results and with regards to the possible influence of a matrix effect, the compounds originally present and the volatile and non-volatile nitrosamines added were determined as total ATNC. The presence of volatile N-nitrosamines in a model sample was simulated by addition of N-nitrosodimethylamine (NDMA). For the determination of non-volatile N-nitrosamines the samples were spiked with a mixture of N-nitrosoamino acids NPRO, NSAR and NPIC (internal standard). The degradation of NDMA and N-nitrosoamino acids due to UV light over time are shown in Fig. 1 and 2.

The procedure was as follows: 5 mL of a beer sample with a known content of ATNC were mixed with 5 μ L of standard solution of NDMA, (approx. concentration = 200 mg/L) or with 3 x 5 μ L of standard solutions of NPRO, NSAR and NPIC, (approx. concentrations = 100 mg/L). The spiked samples were exposed from a short distance to UV light emitted by a UV lamp (wavelength from 200–280 nm, with dominate wavelength of 254 nm). The samples of spiked and non-spiked beers were taken at precisely measured time intervals and analyzed for the total content of ATNC (Kellner, V. a Čulík, J. 1991). The contents of NDMA (Čulík J. a Kellner V. 1989) and N-nitrosoamino acids (Čulík, J. a Horák, T. 2012) resulted from the difference between the ATNC contents of the spiked and non-spiked samples.

By using the methods described above, the contents of volatile N-nitrosamines, N-nitrosoamino acids and total ATNC in beer samples from different producers were determined. After exposure of the beer samples to UV light for 14 hours, the same analyses were repeated.

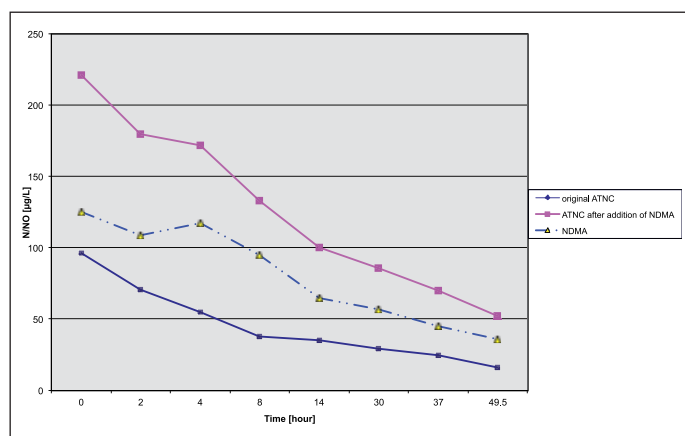
3 RESULTS AND DISCUSSION

In the tested beer samples no NSAR was detected. The amount of NPRO measured varied in a narrow range from <0.1 to 11 μ g/L.

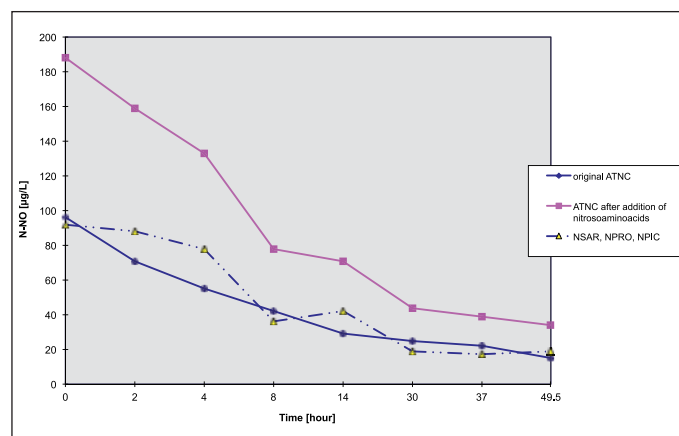
The study concerning the influence of the UV-rays on volatile and non-volatile nitrosamines brought some interesting results.

The degradation processes of the volatile nitrosamines, the non-volatile N-nitrosoamino acids and the ATNC originally present in beer

Obr. 1 Časová závislost úbytku NDMA v pivu působením UV záření (vyjádřeno jako ATNC) / Fig. 1 Time correlation for NDMA losses in beer during exposure to UV light (expressed as ATNC)



Obr. 2 Časová závislost úbytku NSAR, NPRO a NPIC v pivu působením UV záření (vyjádřeno jako ATNC) / Fig. 2 Time correlation for NSAR, NPRO and NPIC losses in beer during exposure to UV light (expressed as ATNC)



světlením by mohl být silný matriční efekt, nelze však vyloučit ani možnost průběhu transnitrosací reakcí.

V tab. 1 jsou uvedeny obsahy jednotlivých zástupců nitrosaminů ve vzorcích komerčních piv před jejich ozáření UV.

Je zřejmé, že lze v porovnání s N-nitrosoaminokyselinami a celkovými ATNC považovat příspěvek NDMA za zanedbatelný. Je to důsledek opatření vedoucí ke snížení jeho obsahu ve sladu. Obsah NPRO se u jednotlivých vzorků příliš neměnil a pohyboval se na mezi stanovitelnosti. Naměřené absolutní hodnoty se blíží publikovaným údajům (Massey, R. a Dennis, M. J. 1990, Johnson P. a Pfab J. 1988). Jak vyplývá z tab. 1, obsah NPRO překročil hranici 10 % celkového obsahu ATNC pouze ve výjimečných případech. Vzájemný vztah mezi obsahem NPRO a celkovým obsahem ATNC však zjištěn ne-

show a similar pattern (Fig. 1, 2). This fact indicates that the other compounds belonging to the ATNC group are similar to volatile and non-volatile nitrosamines.

Another phenomenon which occurred with the majority of the beers was the fluctuation in the content of volatile nitrosamines and non-volatile N-nitrosoamino acids during the first 8 hours after the exposure to UV light. The possible explanations could be a strong matrix effect or a process of transnitrosation reactions.

In Tab. 1 the contents of some nitrosamine compounds from commercial beer samples before UV light exposure are summarized.

It is obvious that in comparison to N-nitrosoamino acids and the total ATNC the amount of NDMA in beer is negligible. The low NDMA content is a result of actions for its reduction in the malt. The pres-

Tab. 1 Počáteční obsah NDMA, NSAR, NPRO ve vzorcích komerčních piv různých výrobců (před ozáření UV světlem / Initial contents of NDMA, NSAR and NPRO in samples of commercial beers from different producers (before exposure to UV light)

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

Tab. 2 Konečný obsah NDMA, NSAR, NPRO ve vzorcích komerčních piv různých výrobců (po ozáření UV světlem) / Final contents of NDMA, NSAR and NPRO in samples of commercial beers from different producers (after exposure to UV light)

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	ND	ND	4.1	1.3	8
B	10	ND	ND	4.1	1.3	22
C	12	ND	ND	4.5	1.4	24
D	12	ND	ND	4.5	1.4	7
E	12	ND	ND	3.7	1.1	10
F	10	ND	ND	3.1	1.0	12
G	12	ND	ND	2.9	0.9	45
H	10	ND	ND	4.3	1.3	68
I	nealko pivo / nonalcoholic beer	ND	ND	3.7	1.1	26
J	10	ND	ND	4.1	1.3	15
K	12	ND	ND	3.8	1.2	73
L	12	ND	ND	ND	ND	17
M	12	ND	ND	ND	ND	10

ND = pod mezí detekce / under the determination limit (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

Tab. 3 Porovnání průběhu rozkladu NPRO a ATNC v pivu působením UV záření/ *Comparison of the decomposition processes for NPRO and ATNC in beer after exposure to UV light*

Pivo / Beer	NPRO (původní / original)*	NPRO (po ozáření / after UV exposure)*	Úbytek NPRO / loss of NPRO	ATNC (původní / original)	ATNC (po ozáření / after UV exposure)	Úbytek / Loss of ATNC
	N-NO (µg/l)	N-NO (µg/l)	(%)	N-NO (µg/l)	N-NO (µg/l)	(%)
A	2.3	1.3	43	20	8	60
B	2.5	1.3	48	53	22	58
C	2.6	1.4	46	57	24	58
D	2.7	1.4	48	20	7	65
E	2.5	1.1	56	40	10	75
F	2.2	1.0	54	32	12	63
G	2.2	0.9	59	119	45	62
H	2.8	1.3	54	174	68	61
I	2.5	1.1	56	71	26	63
J	2.4	1.3	46	38	15	60
K	3.4	1.2	65	102	73	28
L	ND	ND	–	22	17	23
M	ND	ND	–	24	10	58

ND = pod mezí detekce / under the determination limit (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

byl, což ve svém důsledku znamená potvrzení předpokladu, že se může složení ATNC u jednotlivých výrobců diametrálně lišit.

Výsledky získané po ozáření vzorků komerčních piv po dobu 14 hodin jsou uvedeny v tab. 2 a porovnání průběhu úbytku ATNC a NPRO v těchto vzorcích v tab. 3. Naměřené úbytky nitrosoaminokyseliny u reálných vzorků odpovídaly změnám pozorovaným v případě modelových zkoušek. U piv různých výrobců nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly úbytků N-nitrosoaminokyseliny, ať již v závislosti na obsahu extraktu původní mladiny, tak na značce výrobku.

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že více než 90 % ATNC v pivu tvoří látky dosud nezjištěné podstaty. S ohledem na jejich experimentálně zjištěnou fotosenzibilitu lze předpokládat, že se jedná o látky s obdobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jakými se vyznačují těkavé nitrosaminy. Získané poznatky tak korespondují se závěry Johnsona et al. (Johnson, P. a Pfab, J. 1988), podle nichž tvoří NPRO v pivu přibližně 10 % obsahu ATNC, přičemž není přítomný NPRO pravděpodobně vázán peptidickými vazbami. Výsledky spíše nasvědčují tomu, že jsou ATNC v převážné míře tvořeny nízkomolekulárními látkami obsahujícími karboxylovou skupinu.

Poděkování

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

Literatura / References

- 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. *Kvasny Prum.* **35**: 10, 289–292.
- Čulík, J., Horák, T., Čejka, P., Jurková, M., 2012: Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství. I. Vznik a metody stanovení. *Kvasny Prum.* **58**: 1, 6–12.
- Chow, Y. L., 1973: Nitrosamine photochemistry. Reactions of aminium radicals. *Acc. Chem. Res.* **6**, 354–360.
- Chow, Y. L., Colon, C. J., 1968: Nuclear magnetic resonance studies on the configurations and conformations of heterocyclic nitrosamines. *Can. J. Chem.* **46**, 2827–2833.
- Johnson, P., Pfab, J., Massey, C. A., 1988: Method for the investigation of free and protein-bound N-nitrosoproline in beer. *Food Addit. Contam.* **5**, 2, 119–125.
- Kellner, V., Čulík, J., Veselý, J., Špinar, B., 1991: Problematika celkových N-nitrososloženin. *Kvasny Prum.* **37**, 7, 193–196.
- Massey, R., Dennis, M. J., Pointer, M., Key, P. E., 1990: An investigation of the level of N-nitrosodimethylamine, apparent total N-nitroso

ence of NSAR in beer has not been confirmed. The contents of NPRO were at the determination limit and varied only slightly in different beer samples.

The absolute values obtained were comparable to the published values (Massey, R. a Dennis, M. J. 1990, Johnson P. a Pfab J. 1988). 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.

The results for the beer samples obtained after 14 hours of UV light exposure are shown in Tab. 2. The comparison of ATNC and NPRO losses in these samples are presented in Tab. 3. The measured losses of N-nitrosoamino acids in original (non-spiked) samples corresponded to the changes observed in model tests. No significant differences were observed between the reductions in N-nitrosoamino acids contents for beers from different producers. No dependence on the extract content in the wort or on a brand name has been found.

The results described above indicate that more than 90 % of the ATNC in beer are still unknown substances. With regards to their experimentally proven photosensitivity, compounds with similar physico-chemical properties as volatile nitrosamines can be assumed.

These findings are in agreement with the conclusions of Johnson et al. (Johnson, P. a Pfab, J. 1988). According to him NPRO represents only about 10 % of the total ATNC content and is probably not bound with peptide bonds. The results indicate rather that the ATNC are mostly low molecular substances with a carboxyl group.

Acknowledgments

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

compounds and nitrate in beer. *Food Addit. Contam.* **7**, 5, 605–615.

Volmer, D. A., Lay, J. O.; Billedeau, S. M., 1996; Vollmer, D. L. Detection and Confirmation of N-Nitrosodialkylamines Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Coupled On-Line with a Photolysis Reactor. *Anal. Chem.* **68**, 546–552.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 5.10. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 27.11. 2011