

Stanovenie obsahu *N*-nitrozodimetylamínu v pivovarníckom slade a pive metódou plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie

IVAN RÚČKA — ANTON KOČAN — ALEXANDER MAĐARIČ

Súhrn. Na stanovenie množstva prechavých *N*-nitrozamínov v pive a slade — predovšetkým *N*-nitrozodimetylamínu — sa vyvinula metóda využívajúca plynovú chromatografiu a hmotnostnú spektrometriu. Medza stanoviteľnosti je $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ pre *N*-nitrozodimetylamín. V práci sa uvádzajú výsledky rozboru série náhodne zvolených československých neexportných pív.

Použité skratky: m/z — relatívna iónová hmotnosť pripadajúca na jednotkový náboj, ppb — pars per billion ($1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), MS — Mass Spectrometry (hmotnostná spektrometria), NDIPA — *N*-nitrozodiizopropylamín, NDMA — *N*-nitrozodimetylamín, PFTBA — perfluórottributylamín, SIM — Selected Ion Monitoring (sledovanie vybraných iónov), TEA — Thermal Energy Analyser (chemiluminiscenčný analyzátor), WCOT — Wall Coated Open Tubular (kapilárna kolóna, typ), WHO — World Health Organization (Svetová zdravotnícka organizácia).

V súvislosti s výskumom v oblasti tzv. civilizačných chorôb sleduje sa bližšie aj vplyv simultánneho pôsobenia veľkého počtu rôznych chemických karcinogénov v mikromnožstvách. Z hľadiska synkancerogenézy nie je zanedbateľná ani prítomnosť potvrdených karcinogénov v niektorých potravinárskych výrobkoch alebo polotovarochoch.

Z tohto hľadiska je významné aj sledovanie kvality piva a pivovarnického sladu vzhľadom na obsah predovšetkým prechavých *N*-nitrozamínov. Počas ostatných 10 rokov autori [1—4] použili rôzne prístupy k riešeniu tohto analytického problému. Známe a osvedčené (WHO) sú predovšetkým metódy využívajúce chemiluminiscenčnú detekciu (TEA) a metódy hmotnostnej spektrometrie (MS).

Opísaná metóda umožňuje priamu detekciu a stanovenie obsahu prechavých *N*-nitrozamínov, predovšetkým *N*-nitrozodimetylamínu (NDMA) v pivovar-

Ing. Ivan Rúčka, Ing. Anton Kočan, Ing. Alexander Madarič, CSc., Výskumný ústav preventívneho lekárstva, Centrum hygieny, Limbova 14, 833 01 Bratislava.

níkom slade, pive a ostatných nápojoch vyrábaných na báze fermentačne spracovaného sladu. Medza stanoviteľnosti metódy je $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppb) v 250 g vzorky pri použití skanovacej techniky. Metóda je optimalizovaná na stanovenie obsahu *N*-nitrózodimetylamínu.

Experimentálna časť

Odber a príprava vzoriek. Vzorky sladu sa odoberajú priamo v sladovni pri hvozdení. Odoberie sa reprezentatívna vzorka a uchováva sa v tesných sklených prachovniciach z tmavého skla. Odporúča sa vzorku spracovať do mesiacu po odobraní a skladovať v chladnom priestore.

Vzorky piva (fľaškové) sa otvoria tesne pred analýzou, čapované pivo sa odoberá do 1–2-litrových nádob a spracuje v deň odberu.

Spracovanie pivovarnického sladu

Vzorky sladu sa spracúvajú metódou vákuovej destilácie. Naváži sa 250 g sladu a vzorka sa homogenizuje v mixéri. Potom sa vzorka vloží do 1000 ml banky s okrúhlym dnom a zábrusom. Podobne sa postupuje aj pri fortifikovanej vzorke.

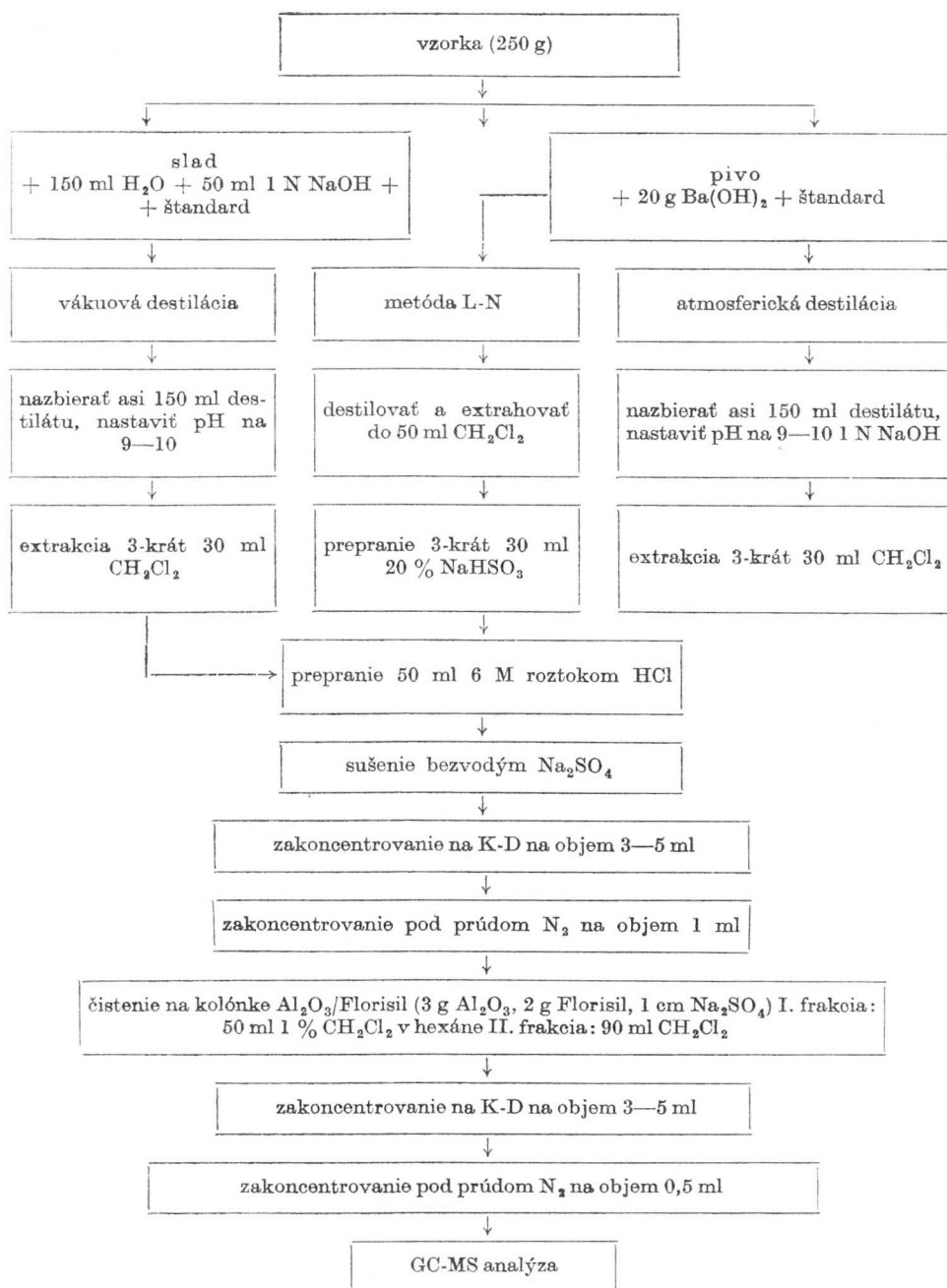
Do vzorky sa postupne pridá 2,5 ml štandardného roztoku *N*-nitrózodiizopropylamínu (NDIPA) ako vnútorný štandard s koncentráciou $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, ďalej 150 ml H_2O a 50 ml 1 M roztoku NaOH. Do fortifikovanej vzorky sa okrem toho pridá 2,5 ml štandardného roztoku NDMA koncentrácie $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Po inštalovaní vzduchom chladeného destilačného mostíka esovitého tvaru a vychladení predlohy pod -50°C sa systém evakuuje. Obsah banky sa postupne zahrieva a vodný destilát sa zachytáva do množstva asi 150 ml.

Po roztopení sa destilát upraví na pH 10, extrahuje dichlórmetánom, prepiera zriedenou HCl a vysuší cez vrstvu bezvodého Na_2SO_4 . Extrakt sa ďalej spracuje rovnako ako pri analýzach vzoriek piva.

Spracovanie piva

Izolácia v prístroji podľa Likensa—Nickersona [1]. Do 1000 ml banky s okrúhlym dnom a zábrusovým hrdlom sa postupne vloží 250 ml piva, 20 g práškového $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ako protipenotvorný prostriedok a 2,5 ml štandardného roztoku NDIPA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); pri fortifikovanej vzorke aj 2,5 ml štandardného roztoku NDMA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).



Obr. 1. Bloková schéma metódy.
Fig. 1. Flow-chart of the method.

Po premiešaní zmesi sa banka s obsahom pripojí na modifikovaný prístroj Likensa-Nickersona pre prácu s rozpúšťadlom ťažším ako voda. Do banky pre extrahovadlo sa vloží 50 ml dichlórmetánu s varnými telieskami.

Simultánna extrakcia a destilácia prebieha 4 hodiny a po jej skončení sa ochladený extrakt pretrepáva 20 % roztokom NaHSO_3 a 6 M roztokom HCl a napokon sa vysuší preliatím cez vrstvu bezvodého Na_2SO_4 . Ďalej sa extrakt spracúva rovnako ako pri postupe využívajúcom atmosferickú destiláciu.

Metóda atmosferickej destilácie. Do 1000 ml banky s okrúhlym dnom a zábrusovým hrdlom sa postupne vloží 250 ml piva, 20 g práškoveho $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ako protipenotvorný prostriedok a 2,5 ml štandardného roztoku NDIPA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); pri fortifikovanej vzorke aj 2,5 ml štandardného roztoku NDMA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).

Po premiešaní sa banka s obsahom pripojí na klasickú destilačnú aparatúru so zostupným chladičom a dobre vychladenou predlohou (ľad, NaCl).

Atmosferická destilácia sa robí až do oddestilovania 200 ml vodného destilátu (1—2 h).

Spracovanie destilátu je obdobné ako pri analýze sladu. Po úprave pH na 9—10 sa extrahuje do dichlórmetánu, pretrepáva 20 % roztokom NaHSO_3 a 6 M roztokom HCl . Vysuší sa preliatím cez vrstvu bezvodého Na_2SO_4 .

Ďalej opísané spracovanie extraktu je spoločné pre všetky tri opísané postupy izolácie. Extrakt sa zakoncentruje na Kudernovom-Danishovom koncentrátore na 3—5 ml a pod prúdom suchého a čistého dusíka na 1 ml.

Za mokra sa pripraví deliaca kolónka s kombinovanou náplňou — 3 g Al_2O_3 a 2 g Florisilu (aktivované 3 h pri 140°C). Sorbenty sú vo vrstvách nad sebou. Na vrchu stĺpca je vrstvička bezvodého Na_2SO_4 .

1 ml extraktu sa zriedi na 4 ml n-hexánom a nechá postupne nasiaknuť na čelo kolónky.

Eluuje sa najprv 1 % dichlórmetánom v n-hexáne (50 ml). Vlastné N-nitrózamíny (NDMA a NDIPA) sa eluujú v 90 ml čistého dichlórmetánu.

Eluát dichlórmetánovej frakcie sa znova zahustí na Kudernovom—Danishovom koncentrátore na 3—5 ml a pod prúdom suchého a čistého dusíka sa dosiahne finálny objem 0,5 ml.

Takýto extrakt sa potom používa priamo na analýzu, kde sa injikuje po 2 μl riadnej aj fortifikovanej vzorky na analytickú kolónu systému GC-MS.

Prehľadná schéma metódy je na obrázku 1.

Vlastné stanovenie

Všetky merania sa robili na prístroji GC-MS HP 5985A Hewlett—Packard. Plynový chromatograf, ktorý je časťou systému, musí umožňovať prácu s kapilárnymi kolónami. Vlastné prepojenie plynového chromatografu a hmotnost-

ného spektrometra sa realizuje alternatívne, buď priamo vyústením kapiláry do iónového zdroja, buď cez medzistupeň obtekaný héliom (open-split interface).

Predpokladom je možnosť práce technikou snímania vybraných skupín iónov počas analýzy (Selected Ion Monitoring).

Podmienky merania.

Plynová chromatografia:

Kolóna: 30 m sklenená WCOT, 0,31 mm ID, Carbowax 20M.

Teplota: inj. priestor 130 °C, kolóna 30° (1 min)/30°.min⁻¹/130 °C.

Nosný plyn: He, 101 kPa, 21 cm.s⁻¹.

Technika dávkovania: bez deliča (splitless), 2 µl extraktu.

Hmotnostná spektrometria:

GS-MS prepojenie: a) Pt/Ir kapilára priamo do iónového zdroja,
b) open-split interface.

Teplota prechodovej zóny: 275 °C.

Teplota iónového zdroja: 200 °C.

Teplota analyzátoru: 200 °C.

Napätie elektrónového násobiča: 2600—2800 V.

Emisný prúd (EI ionizácia): 300 µA.

Ionizačná energia: 70 eV.

MS kalibračný štandard: PFTBA.

Hmotnostný spektrometer je automaticky naladený podľa kalibračného štandardu a potom špeciálne manuálne na oblasť 10—150 m/z — optimalizovaná citlivosť.

Princíp GC-MS stanovenia. Nastavia sa podmienky pre analýzu SIM pre obidve sledované látky — NDMA a NDIPA, t. j. tieto skupiny iónov:

I	NDMA	m/z	74,	30
II	NDIPA	m/z	130,	30

Nastrieknu sa 2 µl štandardu NDMA a NDIPA známej presnej koncentrácie a vykonajú sa príslušné analýzy. Tak isto sa postupne analyzujú všetky vzorky aj fortifikované extrakty. Nástreč štandardu sa opakuje podľa veľkosti zaťaženia systému a stability odozvy po každých 4—8 meraniach vzorky.

Na vyhodnotenie sa zmerajú plochy zodpovedajúcich elučných vln jednotlivých hmotnostných fragmentogramov. Najvhodnejšie sa ukázalo použiť na kvantifikáciu stopy tzv. molekulových iónov (74 a 130 m/z), stopa pre m/z 30, zodpovedajúca nitrozylovej skupine, slúži najmä na kontrolu kontaminácie zložkou s blízkymi alebo identickými retenčnými vlastnosťami.

Výsledky a diskusia

Štatistickým rozborom (súbor 11 analýz) sa zistila priemerná výťažnosť pre NDMA $40,15 \pm 2,35$ % (po korekcii na prirodzený obsah NDMA v pive), NDIPA $97,6 \pm 3,13$ %. Súvzťažnosť súborov výťažností NDMA a NDIPA je charakterizovaná korelačným koeficientom $r_{xy} = 0,934$ ako veľmi tesná.

Metóda sa použila pri hodnotení niektorých druhov 10-stupňového a 12-stupňového piva z hľadiska obsahu *N*-nitrozodimetylamínu. Pre hodnotenie kvality československého exportného piva bolo v Prahe vybudované rezortne pôsobiace oddelenie špeciálnych analýz. Toto laboratórium disponuje prístrojom TEA (chemiluminiscenčný analyzátor). Na základe kapacitného limitu a hygienických noriem pre prácu s chemickými karcinogénmi nemožno očakávať plné pokrytie veľkej skupiny neexportných druhov piva rozborom na obsah *N*-nitrozodimetylamínu. To viedlo autorov k názoru, že vznikla situácia, ktorá umožňuje vývoj alternatívnej laboratórnej metódy.

Tabuľka 1 zhrňa dáta získané rozborom výrobkov niektorých českých, najmä však slovenských pivovarov. Všetky vzorky sa odobrali a analyzovali v priebehu septembra a októbra 1984. Vo všetkých prípadoch sa použila metóda atmosferickej destilácie.

Tabuľka 1. Obsah NDMA vo vybraných vzorkách českého a slovenského piva v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppb)
Table 1. NDMA content in selected Bohemian and Slovak beer samples in $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ppb)

Vzorka ¹	Druh piva ²	Koncentrácia NDMA ³
1	10° svetlé ⁴	1,5
2	11° tmavé ⁵	1,4
3	12° svetlé	1,3
4	12° svetlé	1,2
5	12° tmavé	1,5
6	12° tmavé	6,1
7	12° svetlé	7,8
8	11° tmavé	3,6
9	12° svetlé	3,3
10	12° DIA svetlé	2,6
11	12° svetlé	0,2
12	12° svetlé	5,8
13	12° svetlé	3,1
14	12° svetlé	0,2

¹Sample; ²Beer; ³*N*-nitrosodimethylamine concentration; ⁴Light; ⁵Dark.

Literatúra

1. LIKENS, S. T. — NICKERSON, G. B.: Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 5, 1964, s. 5.
2. TELLING, G. M.: J. Chromatogr., 73, 1972, s. 79.
3. FAZIO, T. — HOWARD, J. W. — HAVERY, D.: IARC Sci. Publ. No. 18, 1978, s. 83.
4. SPIEGELHALDER, B.: Food Cosmet. Toxicol., 17, 1979, s. 29.

Определение *N*-нитрозодиметиламина в пивоваренном солоде и пиве методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии

Резюме

Для определения количества летучих *N*-нитрозаминов в пиве и солоде — прежде всего *N*-нитрозодиметиламина — был разработан метод, использующий газовую хроматографию и масс-спектрометрию. Пределы определяемости составляет 1 мкг.кг⁻¹ для *N*-нитрозодиметиламина. В работе приводятся результаты анализа серии случайно отобранных видов чехословацкого пива, не предназначенного на экспорт.

Determination of *N*-nitrosodimethylamine in brewery malt and beer using the methods of gas chromatography and mass spectrometry

Summary

To be able to determine content of volatile *N*-nitrosamines, especially *N*-nitrosodimethylamine in beer and malt a method making use of gas chromatography and mass spectrometry has been developed. The determination limit for *N*-nitrosodimethylamine is 1 µg.kg⁻¹. In the paper results of analysis are given that was made on a number of randomly selected non-exported beers of Czechoslovak provenance.