

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Observační studie dusíkatých látek vzniklých interakcí
nitrosačních činidel s látkami ve sladu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tomáš Vaško

**Obor studia: Kvalita potravin a zpracování zemědělských
produktů (QUALIM)**

**Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.
Odborný konzultant: RNDr. Tomáš Vrzal, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Observační studie dusíkatých látek vzniklých interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Poděkování patří zejména mému odbornému konzultantovi panu RNDr. Tomášovi Vrzalovi, Ph.D., který mi během psaní této práce poskytl odborné rady, vstřícný přístup, ochotu a trpělivost. Také bych tímto rád poděkoval RNDr. Janě Olšovské, Ph.D., Mgr. Michaele Malečkové a ostatním pracovníkům Analytické zkušební laboratoře (AZL) Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (VÚPS) za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě patří poděkování také vedoucímu této diplomové práce panu Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D. rovněž za vřelou součinost. Práce vznikla za institucionální podpory MZE-RO1918 Ministerstva zemědělství České republiky.

Observační studie dusíkatých látek vzniklých interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu

Souhrn

V rámci této diplomové práce byla provedena observační studie na přítomnost dusíkatých látek vznikajících interakcí nitrosačních činidel s látkami přirozeně obsaženými ve sladu. Mezi tyto látky patří nitrososloučeniny, nitroslooučeniny, kyanosloučeniny, oximy a další dosud strukturně necharakterizované molekuly. Cílem práce bylo navázat na nedávný výzkum probíhající ve VÚPS, který byl zaměřený na detekci a strukturní identifikaci těchto analytů v pivu. Podle vědomí autora a prostudování literatury nebyla většina těchto analytů ve sladu dosud zkoumána. V úvodní teoretické části byla zpracována literární rešerše věnující se problematice sladařství a zmíněných dusíkatých látek. V rámci praktické části bylo analyzováno celkem 200 vzorků, převážně komerčně dostupných sladů, ale i nesladovaných ječmenů, experimentálních sladů a vedlejších produktů výroby různého původu. Jelikož se jedná o netěkavé látky, byla na 13 vzorcích provedena malá pilotní studie o jejich schopnostech přecházet do kongresní sladiny. Vzorky byly připraveny miniaturizovanou extrakční metodou kombinovanou s jednostupňovou silylační reakcí. Kongresní sladiny byly připraveny podle upravené metodiky Evropské pivovarské konvence (EBC), extrahovány pomocí extrakce na pevné fázi (SPE), odpařeny a silylovány. Analýza probíhala na plynovém chromatografu s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS) v módu sledování mnoha reakcí (MRM). K vyhodnocení byly použity především vícerozměrné chemometrické metody.

V praktické části byl analýzou uměle nitrosovaných sladů nejprve potvrzen vznik studovaných analytů ve sladové matrici. Dále byly rozpoznány analyty, které byly detekovány převážně v nízkých, přechodných a vysokých analytických odezvách napříč zkoumanými vzorky. Také byly navrženy konkrétní analyty typické pro jednotlivé druhy komerčně dostupných sladů. Zároveň byl potvrzen předpoklad výskytu C-nitrososloučenin ve sladové matrici. Vysoká teplota během hvozdění byla určena jako faktor podporující vznik sledovaných analytů ve sladech. Asociace mezi studovanými analyty a obsahem NDMA nebyla pozorována. Stejně tak nebyla pozorována zřejmá asociace mezi analytickými odezvami zkoumaných analytů a zeměmi původu příslušných matric. Dále bylo potvrzeno, že analyty detekované v komerčně dostupných pivech mohou vznikat i v komerčně dostupných sladech. Hypotézu týkající se přechodu zkoumaných analytů do kongresní sladiny se však nepodařilo za zvoleného designu experimentu spolehlivě potvrdit ani vyvrátit. Jelikož byla provedena observační studie, není vhodné z výsledků vyvozovat jednoznačné závěry a bylo by žádoucí výsledky ověřit dalšími metodami. Budoucí výzkum na tomto poli je tak jistě žádoucí.

Klíčová slova: mód sledování mnoha reakcí (MRM); nitrososloučeniny; plynová chromatografie (GC); silylace; slad; tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Observational Study of Nitrogenous Substances Formed by Interactions of Nitrosating Agents with Substances in Malt

Summary

As part of this diploma thesis, an observational study was performed on the presence of nitrogenous substances arising from the interaction of nitrosating agents with substances naturally contained in malt. These include nitroso compounds, nitro compounds, cyano compounds, oximes, and other structurally uncharacterized molecules. The work aimed to build upon recent research performed in the Research Institute of Brewing and Malting in Prague (VÚPS), which focused on the detection and structural identification of these analytes in beer. Based on the author's knowledge and searching the relevant literature, most of these analytes in malt have not yet been studied. In the introductory theoretical part, a literature search dealing with the issue of malting and the mentioned nitrogenous substances was processed. In the practical part, a total of 200 samples were analyzed, mainly commercially available malts, but also unmalted barley, experimental malts and by-products of various origins. Since these are non-volatile substances, a small pilot study of 13 samples was conducted to research their abilities to pass into congress wort. The samples were prepared by a miniaturized extraction method combined with a one-step silylation reaction. Congress worts were prepared according to the modified methodology of the European Brewery Convention (EBC), extracted by solid phase extraction (SPE), evaporated and silylated. The analysis was performed on a gas chromatograph with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) in multiple reaction monitoring mode (MRM). Multidimensional chemometric methods were preferably used for evaluation.

In the practical part, the analysis of experimentally nitrosated malts first confirmed forming the researched analytes in the malt matrix. Furthermore, the analytes, which were detected predominantly in low, transitional and high analytical responses across the examined samples, were recognized. Specific analytes, typical for the individual types of commercially available malt, have also been proposed. At the same time, the assumption of the presence of C-nitroso compounds in the malt matrix was confirmed. A high temperature during kilning was determined as a factor supporting the formation of the monitored analytes in malts. However, no association was observed between the studied analytes and an NDMA content. Likewise, no apparent association was observed between the analytical responses of the analyte studies and the countries of origin of the respective matrices. Further, it has been affirmed that the analytes found in commercially available beers can also be formed in commercially available malts. However, the hypothesis concerning the examined analytes in the congress wort could not be reliably confirmed or refuted for the chosen design of the experiment. An observational study has been executed. Thus, clear conclusions cannot be drawn from the results. It would be appropriate to verify them by other methods. Future research in this field is therefore undoubtedly desirable.

Keywords: gas chromatography (GC); malt; multiple reaction monitoring (MRM); nitroso compounds; silylation; tandem mass spectrometry (MS/MS)

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Slad	10
3.1.1	Anatomie a chemické složení ječné obilky	10
3.1.2	Technologický postup výroby sladu	13
3.1.3	Změny v chemickém složení obilky vzniklé sladováním	16
3.1.4	Druhy sladů	16
3.1.5	Sladové náhražky	19
3.1.6	Rizikové látky sladu	19
3.2	Dusíkaté látky vzniklé interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu	20
3.2.1	Nitrososloučeniny	21
3.2.2	Ostatní dusíkaté látky vzniklé interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu	29
3.2.3	Mechanismy toxicity	31
4	Materiál a metody	34
4.1	Použité chemikálie	34
4.2	Použité přístroje a laboratorní náčiní	34
4.3	Bezpečnost	35
4.4	Použité vzorky sladů	35
4.5	Postup přípravy extrakčního činidla	36
4.6	Interní standard	36
4.7	Postup přípravy uměle nitrovaných sladů	37
4.7.1	Nitrosace plynným oxidem dusičitým „za horka“	37
4.7.2	Nitrosace plynným oxidem dusičitým „za studena“	37
4.8	Postup přípravy vzorků sladu k analýze na GC-MS/MS	38
4.9	Kongresní sladiny	38
4.9.1	Postup přípravy kongresní sladiny	38
4.9.2	Postup přípravy kongresní sladiny k analýze na GC-MS/MS	39
4.10	Ověření interferencí a kalibrace retenčních časů	40
4.10.1	Ověření interferencí	40
4.10.2	Postup přípravy standardů za účelem kalibrace retenčních časů	40
4.11	Podmínky analýzy na GC-MS/MS	41
4.12	Zkoumané analyty	41
4.13	Analýza získaných dat	44
5	Výsledky	47
5.1	Slady uměle nitrované	47
5.2	Screening komerčně dostupných sladů	48
5.2.1	Shluková analýza	48
5.2.2	Analýza hlavních komponent	55
5.3	Další výsledky	61
5.4	Extrakce do kongresní sladiny	63

6	Diskuze.....	67
7	Závěr	73
8	Literatura	74
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	83
10	Seznam obrázků, tabulek a příloh	85

1 Úvod

Je všeobecně známo, že spotřeba piva na osobu v České republice dlouhodobě dosahuje ve světě předního postavení. V roce 2019 to podle European Beer Trends Statistics Report (2020) bylo 142 litrů, tedy o 35 litrů více před druhým Rakouskem. Hlavní surovinou pro jeho výrobu je v tuzemsku ječný slad (Basařová et al. 2010), který se využívá i v jiných potravinářských odvětví (Baranwal & Sankhla 2019). Podle Českého svazu pivovarů a sladoven (2020) bylo v roce 2019 v České republice vyrobeno 543 000 tun sladu. Zároveň Basařová et al. (2015) uvádějí, že se až 94 % vyrobeného sladu použije pro výrobu piva. Z tohoto důvodu je velmi důležité dobře porozumět rizikovým látkám obsažených ve sladu a provádět jejich pravidelný screening. K těmto látkám řadíme nitrososloučeniny a mezi ně patří N-nitrosaminy, které vznikají reakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu (Davídek 1995). Ve VÚPS však bylo zjištěno, že se těmito reakcemi tvoří i molekuly, které obsahují dusík vázaný ve funkčních skupinách jako je nitro-, kyano-, anebo v oximech (Malečková et al. 2021).

V 70. letech započal výzkum týkající se problematiky těkavých N-nitrosaminů, jelikož bylo prokázáno, že se jedná o silné mutageny, karcinogeny a teratogeny vyskytující se v potravinách. Pro stanovení sumy nitrosylových skupin se používá označení tzv. zdánlivých celkových N-nitrososloučenin (ATNC), které ale neposkytuje informace ohledně struktur (Kellner 1994). Zhruba 1 % ATNC v pivu je tvořeno dobře charakterizovanými těkavými N-nitrosaminy, zatímco zbytek je připisován netěkavým nitrosaminům zejména neznámé struktury (Vrzal & Olšovská 2019). Ačkoli nejsou tak toxické jako jejich těkavé protějšky, jsou v určitých případech popsány mechanismy jejich vzájemné přeměny. Výzkum N-nitrosaminů byl po odhalení mechanismu vzniku těkavých forem v potravinách a vývoji nových technologických postupů pro minimalizaci jejich tvorby značně omezen. Některé problémy však stále nejsou vyřešeny (Vrzal & Olšovská 2016). I z tohoto důvodu byly v této práci použity také starší zdroje odborných informací.

Cílem této práce je provést v převážně komerčně dostupných sladech screening sloučenin, které nepatří pouze mezi N-nitrososloučeniny, ale které rovněž vznikají reakcemi nitrosačních činidel. Dále pak otestovat, zda jsou schopny přecházet do kongresní sladiny. Jedná se o látky, které byly objeveny v pivu a popsány v publikaci podle Malečkové et al. (2021). Na základě prostudované literatury nebyla podle vědomí autora většina těchto sloučenin ve sladu dosud zkoumána. Z důvodu neznámých toxikologických vlastností těchto látek zatím není možné zhodnotit zdravotní rizika vyplývající pro konzumenta (Malečková et al. 2021). Problematiku dusíkatých látek vzniklých interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu je tedy jistě důležité řešit i nadále.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit relevanci dusíkatých látek obsažených ve sladu vznikajících zejména reakcí nitrosačních činidel. Navázat tak na výzkum probíhající ve VÚPS, který je zaměřený na detekci a strukturní identifikaci těchto látek obsažených v pivu, potažmo sladu. Zhodnotit tak relevanci tohoto výzkumu prostřednictvím screeningu zde uvedených látek v různých druzích komerčně dostupných sladů.

Jelikož jsou tyto látky mnohdy netěkavé, lze předpokládat, že přecházejí do sladiny, a tedy i piva. Z tohoto důvodu bylo dílčím cílem práce provedení malé pilotní studie o schopnosti extrakce těchto látek během rmutování do kongresní sladiny.

Hypotézy

H1: Mezi detekovanými dusíkatými látkami ve sladu (vznikajícími zejména nitrosačními reakcemi) a těmito látkami detekovanými v pivu existuje souvislost.

H2: Tyto látky přecházejí při rmutování do kongresní sladiny.

H3: Slady hvozděné při vyšších teplotách (např. mnichovské a speciální) obsahují vyšší hladiny těchto látek.

3 Literární řešerše

3.1 Slad

Slad je jednou ze základních surovin pro výrobu piva a lze ho charakterizovat jako obilovinu, která byla kontrolovaným způsobem naklíčena a následně usušena (Basařová et al. 2010). Uplatnění nachází také v jiných potravinářských odvětvích, jako je výroba whisky (Russell & Stewart 2014) a pekárenství (Baranwal & Sankhla 2019). Procesem sladování dojde k aktivaci hydrolytických enzymů, které během následné výroby piva štěpí makromolekulární látky na látky jednodušší, schopné přejít do roztoku. Zcela zásadní je štěpení škrobu na zkvasitelné sacharidy působením amyláz (Boulton 2013).

K výrobě sladu se nejčastěji používá ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.), konkrétně jeho jarní dvouřadá (*H. vulgare* convar. *distichon*) forma. Méně často pak pšenice, žito a jiné méně obvyklé plodiny, jako je čirok, proso nebo pohanka (Basařová et al. 2015). Výhoda ječmene spočívá ve složení jeho bílkovin poskytující ideální zastoupení aminokyselin pro výživu kvasinek a v obsahu jiných dusíkatých látek žádoucích pro tvorbu pивní pěny společně s jeho technologickými přednostmi (Hough 1991). Nicméně v některých zemích roste tendence využívat pro výrobu piva nesladované plodiny. Důvody jsou zejména ekonomické, ekologické, ale i technologické. Takovéto produkty jsou inovativní, ale vykazují zpravidla nižší obsah dusíkatých látek (Kok et al. 2019).

3.1.1 Anatomie a chemické složení ječné obilky

Z mnoha anatomických struktur ječné obilky lze z technologického hlediska považovat za významné zejména tyto části: zárodek, endosperm, aleuronovu vrstvu a obalové vrstvy obilky (Basařová et al. 2015). Z chemického hlediska ječmen obsahuje především škrob (65 až 68 %), dále pak bílkoviny (10 až 17 %), β -glukany (4 až 9 %), tuky (2 až 3 %) a minerální látky (1,5 až 2,5 %); (Baik & Ullrich 2008).

Ze zárodku či klíčku nebo také *embrya* se postupně vyvíjí celá rostlina a společně se štítkem (*scutellum*) představuje přibližně 3 % hmotnosti obilky. Na jeho složení se majoritně podílí dusíkaté látky (34 %) a jeho význam pro sladování je zcela zásadní, jelikož produkuje fytohormon gibberelin nutný k produkci hydrolytických enzymů (Basařová et al. 2015). Gibberelin difunduje z embrya do distální části endospermu a indukuje genovou expresi v buňkách aleuronové vrstvy. Ta je spojena s tvorbou hydrolytických enzymů, které štěpí makromolekulární látky endospermu a ty z fyziologického hlediska vyživují skrze štítek embryo během klíčení (Betts et al. 2020). Štítek nebo také děložní lístek je bohatý na lipidy a společně s aleuronovou vrstvou produkuje organické kyseliny, jako je kyselina jablečná, citrónová a jantarová podporující štěpení škrobu (Ma et al. 2016).

Endosperm zaujímá největší hmotnostní podíl ječné obilky (až 75 %) a je hlavním zdrojem látek, které během následných výrobních operací přecházejí do mladiny potažmo piva. Hlavní složkou je škrob uložený ve škrobových zrnech, které jsou obaleny zásobními bílkovinami (Kok et al. 2019). Škrobová zrna ječmene dělíme na velká škrobová zrna typu A (průměr 15 až 19 μm) a malá škrobová zrna typu B (průměr 3,1 až 3,7 μm). Škrob v nich

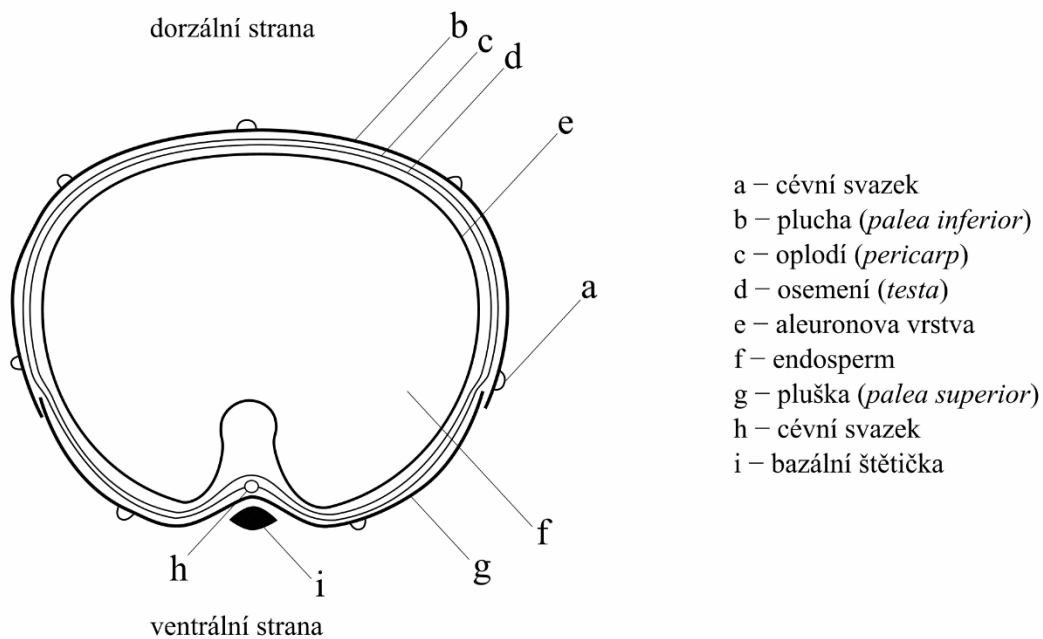
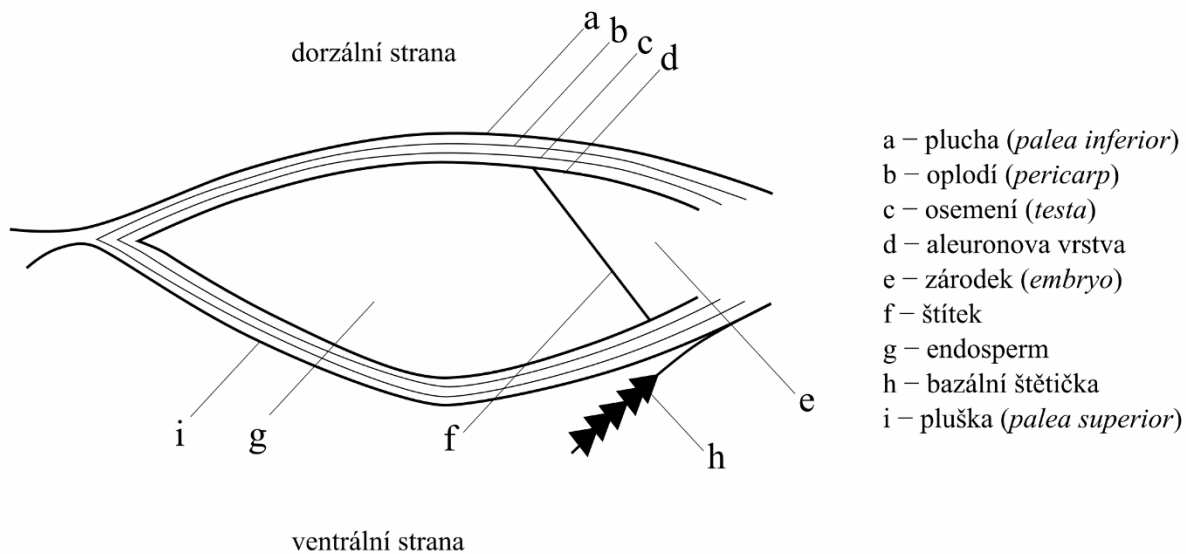
uložený nabývá složité trojrozměrné molekulární struktury, jejímž základem jsou jednotky D-glukózy dávající vzniknout dvěma polysacharidům: amylose a amylopektinu. V obou případech je k sobě D-glukóza v řetězci spojená glukosidickou vazbou α -(1,4), přičemž převládající molekula amylopektinu je navíc větvená glukosidickou vazbou α -(1,6); (Bertoft 2017).

K endospermu těsně přiléhá aleuronová vrstva. Na rozdíl od buněk endospermu jsou její buňky pravidelné, malé s hustě zrnitou cytoplazmou a v případě ječmene jsou uspořádány do tří vrstev (Becraft & Yi 2011). Tyto buňky obsahují převážně bílkoviny, přičemž jejich buněčná stěna je složena zejména z β -glukanů, arabinoxylanů a fenolových kyselin (Jääskeläinen et al. 2013). Zde vyskytující se bílkoviny jsou značně různorodé se složitou a mnohdy neznámou strukturou. V porovnání s endospermem je aleuronová vrstva významným zdrojem minerálních látek, lipidů a tokoferolů (Finnie et al. 2011).

S aleuronovou vrstvou hraničí osemení (*testa*), které je překryto oplodím (*pericarp*). Nejsvrchnější krycí vrstvou u pluchatých obilky je však plucha (*palea inferior*) společně s pluškou (*palea superior*). Všechny tyto struktury se souhrnně označují jako obalové vrstvy obilky (Basařová et al. 2015). Plušku navíc překrývá bazální štětička sloužící jako determinační znak jednotlivých odrůd ječmene (Briggs et al. 2004).

Osemení se skládá z buněk obklopenými dvěma lipidovými vrstvami a na rozdíl od oplodí odolává působení kyseliny sírové při experimentech s odstraňováním obalových vrstev. Zároveň je bohaté na proanthokyanidiny (Stewart et al. 2018). Ty jsou druhem oligomerních flavonoidů označovaných také jako kondenzované taniny. Jejich konzumace je dáвана do souvislosti s nižší prevalencí řady chronických onemocnění skrze jejich antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, přičemž v ječmeni se nachází pestré zastoupení různých chemických forem těchto sloučenin (Zhu 2019). V pivu však interagují s bílkovinami, a to zejména s hordeiny bohatými na prolin, čímž dávají vzniknout technologicky nežádoucím koloidním zákalům (Cejnar et al. 2017). Oplodí je oproti osemení nepropustné pro kyselinu giberelovou, která usnadňuje modifikaci endospermu. Anatomicky je tvořeno vrstvou buněk krytých tenkou voskovou kutikulou (Stewart et al. 2018).

Funkce pluch je ochranná a hydratační (Hough 1991). Plucha kryje obilku ze strany dorzální, přičemž obsahuje pět cévních svazků, zatímco pluška ji chrání ze strany ventrální a prochází jí dva cévní svazky (Briggs et al. 2004). Chemicky jsou pluchy složeny zejména z hemicelulózy, celulózy a ligninu, oproti bílkovinám, které jsou zastoupeny pouze asi ze 3 % (Olkku et al. 2005). Pluchy mají zásadní technologický význam při výrobě piva. Během šrotování sladu dojde k jejich oddělení od endospermu a během scezování sladiny slouží jako filtrační vrstva. Poté se ve formě mláta stávají odpadním produktem (Hardwick 1995). Existují tak dnes snahy o využití této biomasy například pro získání zkvasitelných sacharidů (Demirel et al. 2018). Anatomické struktury ječné obilky jsou uvedeny na **Obr. 1**.



Obr. 1: Anatomie ječné obilky

Zdroj: upraveno podle Briggs et al. 2004

Dusíkaté látky ječné obilky

Podle Prokeše (2000) mají dusíkaté látky v ječné obilce zásadní technologický význam a lze je rozdělit na látky bílkovinné a nebílkovinné povahy, přičemž se nachází zejména v aleuronové vrstvě. Jejich obsah je vysoce variabilní v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí a ve sladovnickém ječmeni se obsah samotného dusíku pohybuje kolem 1,6 až 1,84 % (přepočteno ze vztahu: obsah bílkovin [%] = N * 6,25 → N [%] = obsah bílkovin / 6,25); (Kosař & Procházka 2000). Jeho obsah v zrnu lze účinně ovlivnit hnojením

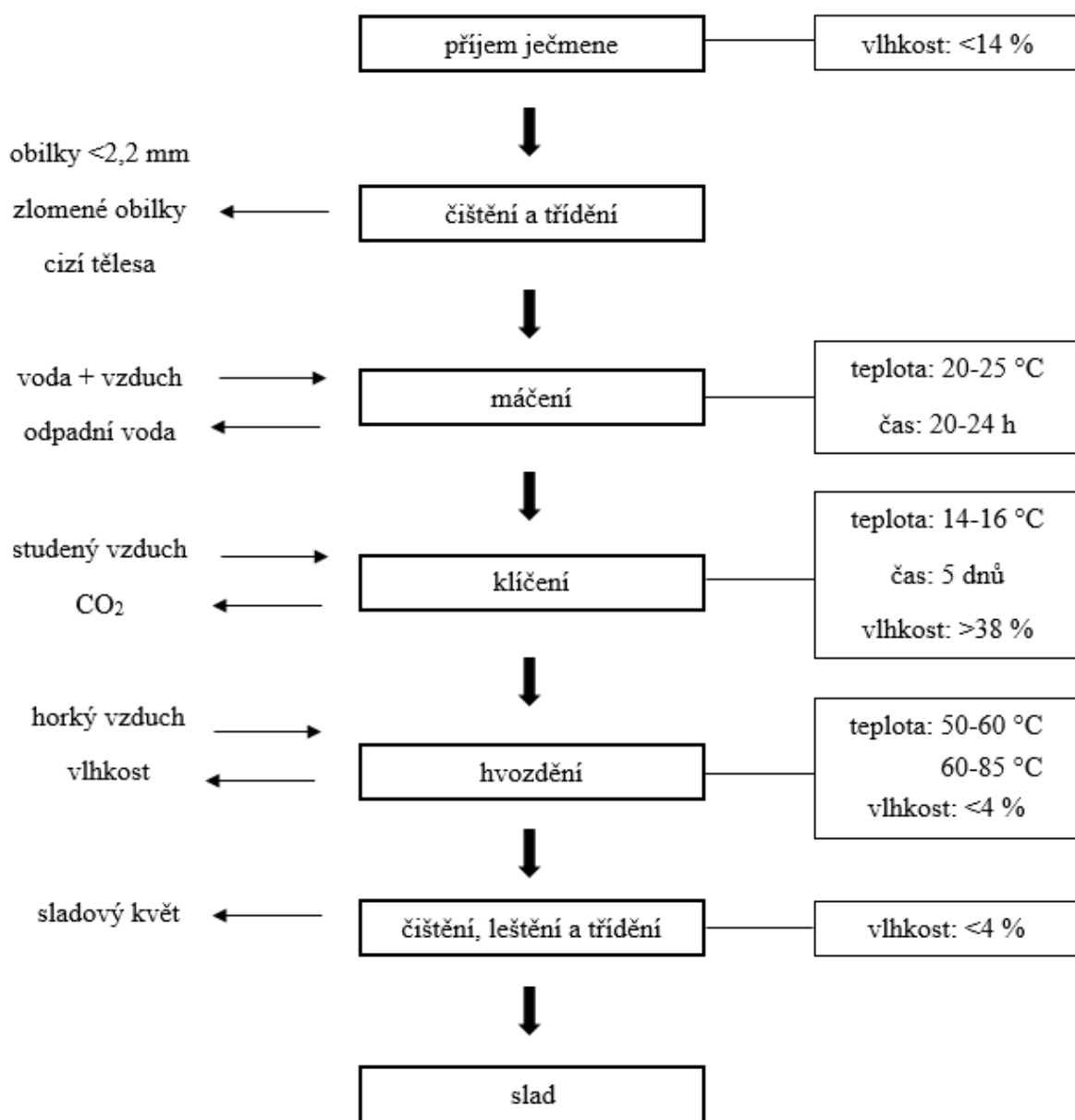
dusíkem, jehož příjem a utilizace je podpořena současnou aplikací síry, která ale výrazně neovlivňuje výskyt siřných aminokyselin v zru ječmene (Hřivna et al. 2011).

Dusík rostlina absorbuje z půdního roztoku skrze kořenový systém. Jeho hlavním zdrojem je nitrátový aniont a amonný kationt, zatímco organické formy dusíku jsou až na výjimky (aminokyseliny) neabsorbovatelné. Následnými složitými procesy se takto přijatý dusík asimiluje do těla rostliny vznikem aminokyselin, bílkovin, nukleových kyselin a dalších dusíkatých látek (Mokhele et al. 2012). Z aminokyselin jsou nejvíce zastoupeny kyselina glutamová a asparagová, dále alanin, leucin, valin, serin a glycin. Méně pak fenylalanin, tryptofan, tyrosin, prolin, arginin, histidin, lysin, threonin, methionin, cystin a izoleucin (Gupta et al. 2010). Při výrobě sladu se stává jeho součástí také dusík vzniklý nitračními a nitrosacími reakcemi. Zde například reagují atmosférické oxidy dusíku s již dusík obsahujícími aminy (Wainright 1986).

Mezi látky bílkovinné povahy řadíme kromě bílkovin (proteinů) také jejich štěpné produkty (peptidy – peptony, albumózy; aminokyseliny) a enzymy (Kosař & Procházka 2000). Bílkoviny ječmene dělíme podle jejich rozpustnosti na albuminy – leukosiny (rozpustné ve vodě), globuliny – edestiny (rozpustné v solných roztocích), prolaminy (rozpustné v alkoholu) a gluteliny (rozpustné v zásadách); (Kunze 2010). V ječmeni jsou podle zastoupení seřazeny takto: gluteliny (54,5 %), prolaminy (25 %), albuminy (12,1 %) a globuliny (8,4 %); (Hulín et al. 2008). Prolaminy jsou zásobní bílkoviny bohaté na glutamin a prolin a v případě ječmene se nazývají hordeiny (Kok et al. 2019). Jelikož se hordeiny řadí k lepkovým bílkovinám jejichž konzumace způsobuje u části populace zdravotní komplikace, existuje dnes snaha o šlechtění odrůd s extrémně nízkým výskytem těchto látek (Tanner et al. 2016). Podle jejich anatomického umístění a funkce lze bílkoviny rozlišit na lepkové (uložené v aleuronové vrstvě), fyziologické/rezervní (uložené pod aleuronovou vrstvou) a bílkoviny histologické/tkáňové (uložené v endospermu); (Basařová et al. 2015). Ječmen obsahuje s hordeiny podobnou, na leucin bohatou a hydrofobní bílkovinu – tzv. protein Z, který je uložen v endospermu navázaný na thioly. Jeho úloha není zcela pochopena, ale uvažuje se o jeho významu v proteinové modulaci. Společně s tzv. proteiny přenašejícími lipidy (LTPs) ovlivňuje kvalitu pивní pěny (Steiner et al. 2011). Zvláštním typem bílkovin jsou proteidy, tedy složené či konjugované bílkoviny, které svým hydrolytickým štěpením poskytují navíc fosfáty, cukry, lipidy, barviva a nukleové kyseliny (Kosař & Procházka 2000). Další dusíkaté látky mající význam prekurzorů pro tvorbu dusíkatých látek vzniklých interakcí nitrosacích činidel s látkami ve sladu jsou popsány v **Kapitole 3.2**.

3.1.2 Technologický postup výroby sladu

Podle Gupta et al. (2010) je podstatou sladování docílit biochemických, fyzikálních a strukturálních změn v obilných zrnech pomocí řízeného procesu vedoucího k enzymatické modifikaci endospermu společně s jeho stabilizací odstraněním většiny vody. Tento proces se skládá ze tří hlavních technologických operací: 1. máčení, 2. klíčení a 3. hvozďení (viz **Obr. 2**).



Obr. 2: Technologický postup výroby sladu

Zdroj: upraveno podle Erzetti et al. 2009

Vhodnost ječmene ke sladování určuje zejména jednotná velikost obilky zajišťující snadný průběh máčení, a tedy i klíčení, dále pak obsah dusíku (1,55 až 1,85 %) společně s nízkým obsahem β -glukanů a samozřejmě absence plísní či dalších kontaminantů (Hough 1991). Pro zajištění rovnoměrného klíčení, a tedy i získání kvalitního sladu je důležité, aby před jeho samotnou výrobou prošel ječmen dormancí (období fyziologického klidu), na kterou navazuje posklizňové dozrávání, které trvá v rámci týdnů (Fišerová et al. 2010). Neméně důležité je z ječmene odstranit nečistoty organického i anorganického původu a roztřídit ho do jednotlivých velikostních tříd. Tyto operace probíhají pomocí aspirátorů, triérů, magnetů, sít, třídících válců a podobně. Rozlišujeme první velikostní třídu ($>2,5\text{mm}$), druhou velikostní třídu ($2,5\text{-}2,2\text{ mm}$) a tzv. propad ($<2,2\text{ mm}$); (Kunze 2010).

Zralý, vyčištěný a velikostně roztríděný ječmen nejlépe stejné odrůdy vstupuje do procesu máčení, kde dojde k jeho smísení s tzv. máčecí vodou v nádobách zvaných náduvníky. Principiálně jde o zvýšení obsahu vody v ječné obilce přibližně z 12 na 45 až 48 %, čímž dojde k její metabolické aktivaci a impulzu k další technologické operaci klíčení. Během máčení začne ječmen intenzivně dýchat a je tak tedy nezbytné provádět vzdušné přestávky zajišťující přísun kyslíku (Mallett 2014). Máčecí voda, která do obilky proniká primárně přes embryo, by měla být bez organického znečištění a spíše teplá, jelikož se zvyšující se teplotou vody stoupá rychlost jejího příjmu obilkou (Kosař & Procházka 2000). Během máčení dojde také k vyplavení zbylých nečistot, přičemž lze zároveň kvalitu budoucího sladu ovlivnit také přidávkem aditiv, jako je vápno, kyselina giberelová, nebo peroxid vodíku (Boulton 2013).

Přestože klíčení může být provedeno různými technologickými cestami, jeho cílem je vždy syntéza a aktivace enzymů společně s tzv. rozluštěním (degradace zásobních látek). Tento proces probíhá při teplotě 16 až 20 °C a v závislosti na použité technologii trvá 3 až 6 dní (Bamforth 2006). Během klíčení roste z embrya v dorzální části obilky tzv. střelka, která by ji z kvalitativních důvodů neměla nikdy přerůst. Oproti tomu je z důvodu modifikace endospermu nutný růst kořínků až do dvojnásobku délky obilky. Po dosažení požadované modifikace endospermu vzniká meziprodukt zvaný zelený slad (Mosher & Trantham 2017).

Zelený slad je následně během hvozdní zbavován nadbytečné vlhkosti, přičemž je zároveň dotvářen jeho charakter vznikem barevných a aromatických látek. Toho je prakticky dosaženo tzv. předsoušením (teplota: <80 °C; vlhkost: 45 → 10 %) a tzv. dotahováním (teplota: 80-105 °C; vlhkost: 10 → 4 %); (Preedy 2009). Z chemického hlediska lze hvozdní v závislosti na rostoucí teplotě rozdělit na fázi růstovou (stále probíhá růst střelky a kořínků), enzymatickou (již neprobíhá růst, zatímco enzymatické reakce ano) a chemickou (vznik látek tvořící charakter sladu). Zvláště v poslední fázi (Kosař & Procházka 2000) se uplatňují reakce neenzymatického hnědnutí (Maillardovy reakce), při kterých reagují redukující cukry s aminosloučeninami za vzniku melanoidinů. Ty mají pozitivní vliv na barvu, chuť, stárnutí a pěnivost piva (Hellwig et al. 2016).

Maillardovými reakcemi však vznikají i látky nežádoucí jako je neurotoxický akrylamid, jehož prekurzorem je aminokyselina asparagin. Tvorba akrylamidu stoupá v teplotním rozmezí 120-180 °C a lze tak za rizikové považovat slady speciální (Mikulíková & Sobotová 2007). Zdraví škodlivou látkou vznikající rovněž při hvozdní, avšak zcela jiným mechanismem, je N-nitrosodimethylamin (NDMA); (Stewart et al. 2018). Operace hvozdní probíhá na tzv. hvozdu, tedy zařízení, kde dochází k vhánění suchého a teplého vzduchu přes vrstvu zeleného sladu (Mallett 2014). V minulosti se používaly hvozdy s přímým vyhříváním, kdy byl slad sušen spaliny topného média, což bylo rizikové z hlediska tvorby NDMA a dalších karcinogenních sloučenin. Dnešní nepřímě vyhřívání hvozdy jsou vybaveny tepelnými výměníky, které toto riziko snižují (Bamforth 2006).

Slad v této fázi výroby stále obsahuje střelku a kořínky (souhrnně označované jako sladový květ), které je nutné v procesu odkličování odstranit. Během odkličování se slad také ochladí a v dodatečném procesu leštění (tzv. polírování) získá lesk (Basařová et al. 2015). Sladový květ je vedlejší produkt výroby sladu, používaný všedně jako krmivo pro hospodářská zvířata. Jelikož je bohatý na dusíkaté látky (22-25 %), vlákninu a minerální látky, především fosfor (0,69 %), nachází dnes uplatnění i v lidské výživě (Karlović et al.

2020). Pro svůj vysoký obsah dusíkatých látek a faktu, že se sladový květ separuje až po hvozdění, kde mohou dusíkaté látky v něm obsažené reagovat s oxidy dusíku, existuje i zde riziko tvorby nitrosaminů, které je třeba brát v potaz (Neylon et al. 2020).

3.1.3 Změny v chemickém složení obilky vzniklé sladováním

Z literární rešerše dosud vyplývá, že přeměna obiloviny na slad je doprovázena mnohými změnami. Kromě fyzikálních a strukturálních změn jsou jimi změny biochemické. K nim lze zařadit tvorbu hydrolytických enzymů, štěpení makromolekulárních látek, vznik barevných, aromatických, nových, ale i rizikových sloučenin. Následující text se věnuje především přeměnám sacharidů, proteinů a lipidů v procesu sladování. Řešenou problematiku názorně kvantifikuje **Příloha I**.

Z ječných bílkovin jsou v procesu klíčení nejvíce štěpeny prolaminy a gluteliny působením endoproteáz a karboxypeptidáz za vzniku peptidů a volných aminokyselin. Během sladování se dále významně uplatňují cysteinové proteázy a dochází ke glykaci proteinu Z, zatímco LTPs působí jako jejich inhibitory (Steiner et al. 2011). α -aminokyseliny, amoniak a nízkomolekulární peptidy se souhrnně označují jako volný aminodusík (FAN), který tvoří zdroj dusíku využitelný kvasinkami v následující výrobě piva, přičemž až 70 % FAN obsaženého v mladině se utváří právě během sladování (Hill & Stewart 2019). V průběhu výroby sladu však nedochází pouze ke štěpným procesům, ale také k syntéze dusíkatých látek za účelem růstu kořínků a stříčky (Basařová et al. 2015).

Zdá se, že při klíčení ječmene je účinkem fosforylázy, α -amylázy, β -amylázy a α -glukosidázy hydrolyzována pouze část škrobových zrn. Dále se snižuje viskozita, a naopak zvyšuje teplota želatizace škrobu společně se zvýšením obsahu amylózy v důsledku odštěpení amylopektinu (Contreras-Jiménez et al. 2019). Modifikace se netýká pouze škrobu, ale i β -glukanů a arabinoxylanů, jejichž obsah je v ječném sladu rovněž nižší než v nesladovaném ječmeni (Langenaeken et al. 2020).

Toto se týká také lipidů, které se hydrolyzují na jednotlivé mastné kyseliny, z nichž je nejvíce zastoupená kyselina linolová, u které byl také jako u jediné během sladovacího procesu zaznamenán nárůst (Bravi et al. 2012). Stejný poznatek přinášejí Özcan et al. (2018), kteří dále uvádějí, že zelený slad vykazuje oproti ječmene a hotovému sladu nejvyšší obsah karotenoidům, fenolických látek a nejvyšší antioxidační aktivitu. Frank et al. (2011) studovali metabolomiku ječmene během máčení, klíčení a hvozdění a dospěli ke zjištění dynamických metabolických změn.

3.1.4 Druhy sladů

Podle Basařové et al. (2010) je výroba různých druhů sladů docílena jak výběrem konkrétní obiloviny a její odrůdy, tak úpravou technologického postupu máčení, klíčení a hvozdění a lze je rozdělit mimo jiné do následujících kategorií:

- Světlé slady plzeňského typu;
- Tmavé slady mnichovského typu;

- Pšeničné slady;
- Speciální slady:
 - Karamelové slady;
 - Barvicí slady;
 - Nakuřované slady.

Pravděpodobně celosvětově nepoužívanějšími slady jsou světlé slady plzeňského typu a jsou tak u většiny sladoven hlavním vyráběným sladem (Kunze 2010). Používají se pro výrobu světlých, ale i speciálních piv. Mají vysokou extraktivnost, enzymatickou sílu, slabou barvu a jejich sušina se pohybuje kolem 96 % (Kosař & Procházka 2000). Po dosažení stupně domočení 43 % následuje klíčení při teplotě nižší než 17 °C. Nejvyšší dosažená teplota během hvozdění je 85 °C (Boulton 2013). Někdy se však přistupuje k vyšším dotahovacím teplotám z důvodu inhibice tvorby dimethylsulfidu (DMS). Typicky dosahují barvy v rozmezí 2,5 až 3,5 j. EBC (Kunze 2010).

Tmavé slady mnichovského typu lze rozdělit do několika kategorií podle intenzity jejich barvy (Mallett 2014). Většina těchto sladů se používá pro výrobu tmavých či silných piv a pro jeho výrobu je vhodný ječmen s vyšším obsahem dusíkatých látek (Kunze 2010). Vyšší barvy je mimo jiné docíleno přelúštením zeleného sladu, který klíčí déle, při vyšší teplotě a s vyšší vlhkostí (Kosař & Procházka 2000), přičemž strelka během klíče vyroste až do tří čtvrtin délky zrna. Nejvyšší hvozdící teplotou je 105 °C, čímž dochází k nižší enzymatické aktivitě, ale vyšší barvě, která odpovídá 15 až 20 j. EBC (Briggs et al. 2004). Jakýmsi přechodem mezi dvěma výše zmíněnými slady je slad vídeňský, jehož výroba je dnes na ústupu (Basařová et al. 2015). Hvozdění probíhá při 90 °C a výsledná barva se pohybuje mezi 5,5 až 6 j. EBC, což dává vzniku typické zlaté barvy piv, která jsou z něj vyrobená (Briggs et al. 2004).

Pšeničné slady se používají pro výrobu speciálních piv a mohou mít různou intenzitu barvy, nicméně převládají světlé varianty. Zároveň se přidávají do piv z důvodu zlepšení pěnivosti. Tyto slady mají vyšší obsah diastatických enzymů, barvu v rozmezí 2 až 6 j. EBC a obsahují 5 % vody (Briggs et al. 2004). Sladování pšenice přináší některé technologické problémy stejně jako její použití v průběhu vaření piva. Absence pluch u pšeničných sladů totiž může způsobit problémy během scezování. Stejně tak problematický může být oproti ječmeni vyšší obsah bílkovin. Technologické vlastnosti lze do určité míry ovlivnit odrůdou pšenice (Mallett 2014).

Existuje mnoho typů karamelových sladů, jejichž členění dle intenzity barvy není jednotné. Využívá se jejich barevných a aromatických vlastností, kterých je dosaženo při jejich 4 až 8% zastoupení v celkovém sypání. Jelikož mají nízkou až nulovou enzymatickou aktivitu, vyšší dávky by mohly být problematické z hlediska zcukření (Basařová et al. 2010). Hvozdící teplota dosahuje až 160 °C, čímž je dosaženo tvorby melanoidinů, jako je maltol mající silné redukční vlastnosti (Boulton 2013). Barva může u nejtmaevších karamelových sladů dosáhnout až 450 j. EBC. Za organoleptické vlastnosti jsou odpovědné především heterocyklické dusíkaté látky (Basařová et al. 2015).

Patrně z důvodu hořkého, svíravého a kyselého chuťového profilu by měly být barvicí slady zastoupeny maximálně z 2 % sypání (Basařová et al. 2010). Teplota během jejich výroby dosahuje až 225 °C, čímž dojde rozkladem škrobu ke tvorbě dextrinů, karamelu

a asamaru. Dosahují barvy až 1500 j. EBC a jsou tak určeny pro výrobu velmi tmavých piv (Basařová et al. 2015). Využití nachází také ve výrobě sladových extraktů (Bamforth 2006).

Principem výroby nakuřovaných sladů je jejich vystavení kouři vzniklého spalováním bukových štěpek. V minulosti měla zřejmě většina piv kouřový charakter z důvodu příslušného technologického vybavení sladoven. Tradičním pivem vyrobeným z těchto sladů je německý Rauchbier, nicméně dnes nakuřované slady nachází uplatnění i jinde díky rozvoji minipivovarů (Boulton 2013). Americké nakuřované slady mají obecně vyšší intenzitu než evropské. Kromě bukového dřeva je možné využít také olši či třešeň (Mallett 2014). Obsahují až 0,2 mg fenolů na kilogram sladu (Basařová et al. 2015).

Odborná literatura se problematice technologických postupů výroby jednotlivých druhů sladů příliš nevěnuje, nebo již nemusí být zcela aktuální. Dále se kvalita sladů může lišit v závislosti na použitém typu sladovadla a technologických postupech specifickými pro každou sladovnu. Z těchto důvodů jsou zde na základě e-mailové komunikace ze dne 17. 1. 2022 také prezentovány poznatky zástupce sladmistra pana Marka Červa z tradiční humnové sladovny benešovského Pivovaru Ferdinand, s.r.o. Ten přisuzuje zásadní vliv na kvalitu sladu především základní surovině jeho výroby, tedy sladovnickému ječmeni. Zároveň považuje za kvalitnější slady vyrobené na klasických humnech vlivem možnosti pohotově reagovat na problémy během jeho výroby vlivem zkušeností a znalostí pracovníků sladovny. Naproti tomu přisuzuje za významný benefit pneumatických sladoven jejich schopnost vyrábět slad ve vyšších objemech, po celý rok s výsledkem vysoce sjednocené kvality výroby. Jediným druhem sladu, který je v dnešní době vyráběn na hvozdech s nepřímým otopem, je podle něj slad nakuřovaný. Za slady s nejvyšším obsahem dusíkatých látek považuje slady diastatické. Dále poznamenává, že se vzrůstající barvou (až na výjimky) klesá extraktivnost a enzymatická aktiva sladu. Celkem překvapivě jsou na humnové sladovně benešovského Pivovaru Ferdinand, s.r.o. prodávány nejvíce slady mnichovské. Jednotlivé slady jsou dále popsány v **Tab. 1**.

Tab. 1: Charakteristika typů sladů

<i>jakostní parametr</i>	<i>jednotky</i>	<i>světlý slad</i>	<i>mnichovský slad</i>	<i>tmavý karamelový slad</i>	<i>barevný slad</i>	<i>pšeničný slad</i>
obsah vody	%	4	2,5-3	2	2	7
barva	j.EBC	3,5-4	-10	+150	+150	+4
viskozita	mPa.s ⁻¹	+1,6	n	n	n	n
pH	-	5,8-6	n	n	n	n
extrakt mladiny	%	-80	+79	+78	+75	-82
obsah bílkovin	%	10-11,5	+12	n	n	-12
rozp. N	mg.100ml ⁻¹	75-85	n	n	n	n

n = nestanovuje se; + = max. hodnota; - = min. hodnota

poznámka: běžné hodnoty v sušině vzorku

Zdroj: upraveno podle Kosař & Procházka 2000

3.1.5 Sladové náhražky

Přestože hlavní zdroj extraktu pro výrobu piva poskytuje tradičně ječný slad, je běžnou praxí nahrazovat určitý podíl sladu sladovými náhražkami, jako je nesladovaný ječmen či jiné nesladované obiloviny, ale i různé cukerné roztoky (Bamforth 2016). Až 90 % celosvětově vyrobeného piva obsahuje sladové náhražky, a to z ekonomických, ale i technologických důvodů, jelikož jimi lze pozitivně ovlivnit jeho trvanlivost, pěnivost a koloidní stabilitu. Zatímco v Německu platí zákaz používání sladových náhražek, v jiných evropských zemích se jimi nahrazuje 10 až 30 % sladu, v USA a Austrálii je to 40 až 50 % a v Africe dokonce 50 až 75 % (Bogdan & Kordialik-Bogacka 2017). Zároveň se objevují i snahy o výrobu piva pouze z nesladovaných obilovin, avšak s nutností použití exogenních enzymů (Zhuang et al. 2017). Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných sladových náhražek jsou uvedeny v **Tab. 2**.

Tab. 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných sladových náhražek

	<i>extrakt</i> (% suš.)	<i>želatinační</i> <i>teplota (°C)</i>	<i>energie</i> (kcal)*	<i>sacharidy</i> (g)*	<i>bílkoviny</i> (g)*	<i>tuk</i> (g)*	<i>hrubá</i> <i>vláknina</i> (g)*	<i>popel</i> (g)*
kukuřice	88-93	62-75	358	73	9,2	1,2	2,8	1,2
rýže	89-94	61-78	362	76	7,9	2,7	1	1,3
čirok	75-82	68-75	329	70,7	10,4	3,1	2	1,6
ječmen	75-80	57-65	-	-	-	-	-	-
pšenice	-	-	348	71	11,6	2	2	1,6
žito	76-80	55-70	-	-	-	-	-	-
žitovec	70-75	55-70	-	-	-	-	-	-
oves	45-50	55-62	390	66	17	6	11	2,6

* vyjádřeno ve 100 g při 12% vlhkosti

Zdroj: upraveno podle Bamforth 2006 & Kaur et al. 2014

3.1.6 Rizikové látky sladu

Celosvětová roční produkce ječmene činí asi 129 000 000 tun, z čehož se pro výrobu sladu použije zhruba třetina (Baik & Ullrich 2008). S tím souvisí rostoucí zájem o jeho analýzu. Kromě N-nitrosaminů může slad obsahovat i další nežádoucí sloučeniny, které buď negativně ovlivňují jeho kvalitu, potažmo kvalitu výrobků z něj vyrobených, anebo jsou přímo zdraví škodlivé. Tyto látky se mohou nacházet již ve vstupních surovinách pro výrobu sladu či vznikat při jeho výrobě (Basařová et al. 2015).

Do první skupiny lze zařadit sírné sloučeniny jako je S-methylmethionin (SMM) společně s dimethylsulfoxidem (DMSO), tedy hlavní prekursorů tvorby dimethylsulfidu, molekuly tvořící primárně ležáků, která ale v nadměrných koncentracích zapříčiňuje sensorické vady (Bamforth 2014). Také byla prokázána souvislost mezi teplotou hvozdění sladu a následným výskytem oxidu siřičitého v mladém pivu. Zdá se, že světlé slady plzeňského typu podporují vyšší tvorbu SO₂ než tmavé a pražené slady (Kunz et al. 2010).

Přestože SO₂ plní funkci konzervačního činidla a tvoří adukty s nežádoucími karbonylovými sloučeninami v pivu, tak stále existuje alergologické riziko při jeho expozici (Guido 2016).

Ječmen poskytuje vhodné prostředí pro kontaminaci mykotoxiny, jejichž požití představuje vážné zdravotní riziko. Nejčastěji vyskytujícím se mykotoxinem ve sladovnickém ječmeni je deoxynivalenol (DON) produkovaný plísněmi rodu *Fusarium*, který je schopný díky své termostabilitě přecházet do sladu a následně piva. Přesto se jeví, že je částečně degradován během hvozdění při teplotě 150 °C. Společně s fumonisiny (FUM) se jedná o ve vodě rozpustné sloučeniny, a tak dochází k částečné eluci z ječmene během máčení (Pascari et al. 2018). Piacentini et al. (2015) upozorňují na alarmující kontaminaci sladovnického ječmene těmito mykotoxiny. V jejich studii byl DON přítomen v 18 % a FUM ve 12 % analyzovaných ječmenů, přičemž za jejich výskytem stály nejvíce zastoupené plísně druhů *Fusarium graminearum* a *Fusarium verticillioides*, produkující toxiny primárně v období před sklizní.

Ze zemědělské prvovýroby se do procesu sladování dostávají také rezidua pesticidů představující pro konzumenta riziko. Jejich koncentrace však lze účinně snižovat vlivem technologických operací výroby sladu a piva. Je ale nutné vzít v úvahu možnost vzniku toxičtějších produktů jejich rozkladu (Yigit & Velioglu 2020). Kaushik et al. (2009) příkládají největší význam ředění vodou. Jako neúčinnější se tedy jeví operace máčení, klíčení a až poté hvozdění.

Společně s pesticidy se do půdy a následně ječmene dostávají těžké kovy (Eticha & Hymete 2014). Ty se akumulují především v kořenech a zdá se, že z kořenů do rostliny, potažmo potravního řetězce nejvíce přechází Cd, Cu a Zn (Soriano-Disla et al. 2014). Podle Čejky et al. (2011) dosahuje v pivu nadlimitních koncentrací pouze As, zatímco ostatní těžké kovy jsou vylučovány do odpadních produktů, jako je pivovarské mláto.

V důsledku jaderné činnosti člověka se do životního prostředí dostávají nebezpečné radionuklidy stroncia (⁹⁰Sr) a cesia (¹³⁷Cs). Ty jsou nejhojněji zastoupeny ve svrchních 30 cm orné půdy, odkud putují do zrn plodin a následně do potravin z nich vyrobených, kde se zdá být závažnější obsah ⁹⁰Sr (Solecki & Kruk 2011). Jejich vstup do rostlin je ovlivněn typem půdy, ale i fyziologií jednotlivých plodin, přičemž obiloviny včetně ječmene vykazují nižší koncentrace těchto radionuklidů (Al-Oudat et al. 2021).

Antropogenní činností také dochází ke znečištění půdy perzistentními organickými polutanty (POPs), známými pro svou toxicitu. K těmto látkám náleží mimo jiné polyaromatické uhlovodíky (PAHs) a polychlorované bifenyly (PCBs), které je i přes jejich lipofilní charakter (Dean & Ma 2007) možné nalézt ve sladovnickém ječmeni a následně i v pivu (Horák et al. 2002). Během procesu výroby sladu vzniká karcinogenní akrylamid, o kterém pojednává **Kapitola 3.1.2.**

3.2 Dusíkaté látky vzniklé interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu

Obiloviny, jako je ječmen, jsou složité matrice obsahující mnoho různorodých sloučenin (Basařová et al. 2015), které při následné výrobě sladu reagují s oxidy dusíku v sušícím vzduchu. Výsledkem této reakce jsou látky řadící se mezi nitrososloučeniny, konkrétně mezi těkavé N-nitrosaminy (Olšovská et al. 2014). Ostatní nitrosační činidla pravděpodobně nemají ve sladařsko-pivovarnickém průmyslu takový význam, alespoň

ne z pohledu tvorby NDMA. Nicméně vznik těchto sloučenin je velmi komplikovaný děj závislý na mnoha proměnných, přičemž výroba sladu je stejně tak komplikovaný reakční systém, kterému je složité z hlediska tvorby nitrosaminů porozumět (Wainright 1986).

Například z nepublikovaných výsledků laboratorních experimentů ve VÚPS vyplývá, že při vystavení sladů extrémním koncentracím nitrosačních činidel (oxid dusičitý) dochází k tvorbě i jiných dusíkatých látek, které nejsou charakterizované nitrososkupinou, ale jinými funkčními skupinami obsahujícími dusík z této reakce.

3.2.1 Nitrososloučeniny

Nitrososloučeniny jsou charakterizované kovalentně vázanou nitrososkupinou (-NO) ve své molekule, která vzniká buď přímým působením nitrosačních činidel, či mezimolekulovými (transnitrosačními) přenosy (Vrzal & Olšovská 2016). Poznatky o této elektrofilní a vysoce reaktivní funkční skupině sahají až do 19. století, kdy se podařilo syntetizovat nitrosobenzen a začal tak být studován její chemismus (Yamamoto & Momiyama 2005), který je v několika ohledech zajímavý. Například proměnlivost délky vazby mezi dusíkem a kyslíkem, nebo schopnost pouze některých nitrososloučenin dimerizovat (Linnett & Rosenberg 1964).

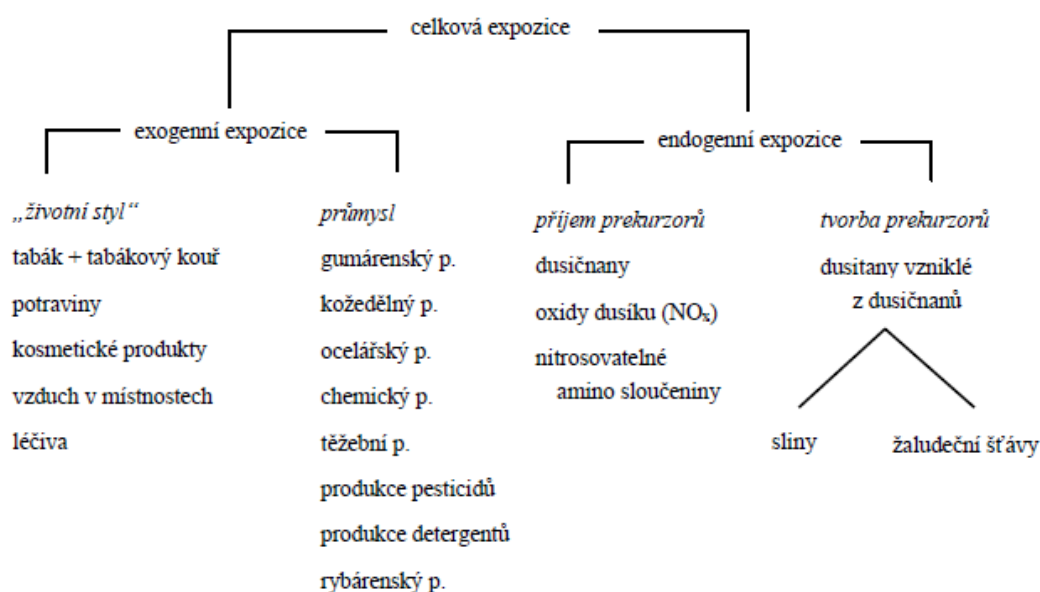
V závislosti, na který atom je nitrososkupina vázána, rozlišujeme C-, S-, O- a N-nitrososloučeniny (Lee et al. 2002). Některé C-nitrososloučeniny jsou například schopny tvořit toxické komplexy s hemoglobinem. Pozornost v této oblasti je věnována především C-nitrosoalkanům a C-nitrosoarenům (Gowenlock & Richter-Addo 2004). Naopak nízkomolekulární S-nitrososloučeniny vykazují fyziologické účinky, jelikož se v těle uplatňují jako účinné vazodilatátory (Tsikas et al. 2000). Obdobné vlastnosti lze sledovat i u O-nitrososloučenin jako je ethylnitrit, který vzniká v kyselém prostředí žaludku reakcí mezi dusitany a ethanolem (Gago et al. 2008). Sloučeniny obsahující nitrososkupinu nacházejí v současné době široké uplatnění při organických syntézách (Huang et al. 2016), naproti tomu se jedná zejména v případě N-nitrososloučenin o silně toxické látky (López-Rodríguez et al. 2020). Právě N-nitrososloučeninám je v následujícím textu věnována největší pozornost.

N-nitrososloučeniny

N-nitrososloučeniny dělíme na N-nitrosaminy, N-nitrosamidy a N-nitrosamidiny (López-Rodríguez et al. 2020). V potravinách je pozornost věnována především N-nitrosaminům, které vznikají reakcí zejména sekundárních aminů s nitrosačními činidly (Park et al. 2015). Nitrosace amidů typu N-alkylmočovín a N-alkylkarbamátů dává vzniku N-nitrosamidům, které se na rozdíl od N-nitrosaminů kvůli své nízké stabilitě pravděpodobně nevyskytují v potravinách (Dietrich et al. 2005). Mezi zástupce řadíme například silně karcinogenní N-nitroso-N-methylmočovinu (NMU); (Inami et al. 2015). Nitrosace dvojné vazby mezi uhlíkem a dusíkem v amidinové funkční skupině není dosud přesvědčivě prozkoumána. Přestože některé amidiny nitrosaci vůbec nepodléhají, existuje obava z jejich příjmu skrze léčiva, kde se hojně vyskytují a následně tvorby N-nitrososloučenin v organismu (Loeppky & Yu 2004).

N-nitrososloučeniny jsou do prostředí exponovány déle skrze metalurgický, gumárenský, kožedělný, farmaceutický, kosmetický, agrochemický a tabákový průmysl. Potravou však lze přijímat buď přímo N-nitrososloučeniny, či prekursorů pro jejich následnou syntézu v těle. Zde mohou například interagovat aminy či amidy s dusitany v kyselém prostředí žaludku za vzniku N-nitrososloučenin (Dietrich et al. 2005). Předpokládá se, že tyto látky v organismu vznikají výhradně touto neenzymatickou reakcí. Naproti tomu existují názory ohledně mnohem složitějšího mechanismu tvorby *in vivo*, na kterém se podílejí enzymatické procesy (He et al. 2019). Například dusičnany redukující bakterie jsou teoreticky schopny tvořit N-nitrososloučeniny i při neutrálním pH také ve střevech a močovém měchýři (Montesano & Bartsch 1976). Samotná endogenní syntéza N-nitrososloučenin je ovlivněna mnoha faktory jako je pH, složení střevního mikrobiomu či inhibitory nitrosace obsažených v požitých stravě. Mezi ně řadíme antioxidanty, jako jsou některé polyfenolické látky nebo vitamin C (Kobayashi 2018).

O toxicitě N-nitrososloučenin se uvažuje již od roku 1937, kdy byli dva chemici vystaveni inhalaci průmyslově vyráběného NDMA, jemuž byly připisovány antikorozi vlastnosti. U osob došlo k mnoha zdravotním komplikacím, přičemž nejvíce byla zasažena játra, ve kterých se NDMA redukoval na hydrazin (Freund 1937). V současnosti jsou N-nitrososloučeniny považovány za vysoce toxické, mutagenní a karcinogenní látky poškozující mnoho živočišných druhů včetně člověka, u něhož jsou potraviny jedním z hlavních zdrojů jejich expozice (Fan et al. 2018). Přestože karcinogenita nebyla prokázána u všech látek s funkční skupinou N-nitroso, uvádí se, že některé tyto látky jsou schopny způsobit nádorové bujení v mnoha orgánových soustavách, čímž se odlišují od ostatních karcinogenů (Lijinsky 1986). Toto multiorgánové působení je typické především pro skupinou N-nitrosaminů (Dietrich et al. 2005). Jak znázorňuje **Obr. 3**, N-nitrososloučeniny jsou do prostředí exponovány z mnoha zdrojů. Následující text, tak bude zaměřen na tvorbu těchto látek ve sladařsko-pivovarnickém průmyslu, potažmo potravinářství.



Obr. 3: Zdroje environmentální expozice N-nitrososloučenin

Zdroj: upraveno podle Preussmann 1984

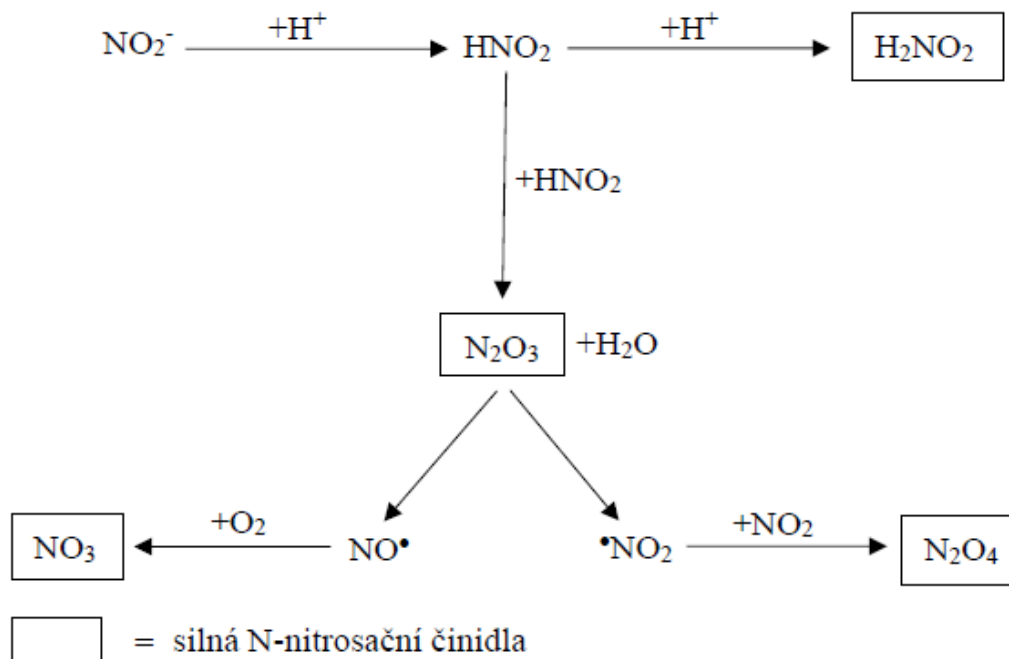
Nitrosační reakce

Při výrobě sladu působí jako přímá nitrosační činidla oxidy dusíku. V průběhu hvozdní vznikají při vysokých teplotách reakcí mezi atmosférickým kyslíkem a dusíkem. Zdrojem dusíku mohou být též použitá topná paliva, přičemž znečištěné okolí sladovny může poskytovat samotné oxidy dusíku (viz **Tab. 3**); (Wainwright 1986). Přestože dusičnany a dusitany nachází své uplatnění v řadě fyziologických pochodů v lidském těle a zároveň chrání potraviny před růstem patogenních mikroorganismů, podílí se také na nitrosaci (Ma et al. 2018). Při výrobě sladu může dojít k bakteriální redukci dusičnanů vyskytujících se v máčecí vodě na dusitany (Briggs et al. 2004). Stejný mechanismus lze pozorovat během následné výroby piva v procesu rmutování a hlavního kvašení (Olšovská et al. 2014). Dusitany ale nezpůsobují nitrosaci přímo, nicméně z nich mohou v kyselém prostředí vznikat právě oxidy dusíku (viz **Obr. 4**); (Smith 1994).

Tab. 3: Formy oxidů dusíku

<i>vzorec</i>	<i>název</i>	<i>vlastnosti</i>
N_2O	oxid dusný	<ul style="list-style-type: none">• nezpůsobuje nitrosaci
NO	oxid dusnatý	<ul style="list-style-type: none">• nezpůsobuje nitrosaci, dokud částečně nezoxiduje na NO_2
NO_2	oxid dusičitý (monomer)	<ul style="list-style-type: none">• způsobuje nitrosaci, ale pouze jako dimer N_2O_4
N_2O_3	oxid dusitý/anhydrid kyseliny dusité	<ul style="list-style-type: none">• $N_2O_3 + H_2O \leftrightarrow 2HNO_2$• lze považovat za: $NO + NO_2$ – pravděpodobně nejaktivnější formu oxidu dusíku při nitrosaci• v roztoku se chová jako: $ONO-NO \leftrightarrow O_2N-NO_2$<ul style="list-style-type: none">• pravá strana rovnice způsobuje spíše nitraci
N_2O_4	oxid dusičitý (dimer)	<ul style="list-style-type: none">• $N_2O_4 \leftrightarrow 2NO_2$• aktivní při nitrosaci• lze považovat za: $ON-NO_3 \leftrightarrow O_2N-NO_2$<ul style="list-style-type: none">• pravá strana rovnice způsobuje spíše nitraci

Zdroj: upraveno podle Wainright 1986



Obr. 4: Kyselě katalyzovaná tvorba N-nitrosačních činidel

Zdroj: upraveno podle Smith 1994

Průběh nitrosace je ovlivněn faktory jako je teplota a pH prostředí (Rostkowska et al. 1998). Největší význam je připisován pH, přičemž se většina aminů nejrychleji nitrosuje při pH 2,5 až 4. Ačkoli některé sekundární nitrosaminy mohou vznikat i za pokojové teploty, riziko tvorby nitrosaminů obecně roste se vzrůstající teplotou nad 80 °C (Trégner & Trejbal 2017). Nitrosační reakci katalyzují anionty, jako jsou chloridy, jodidy či bromidy a dále slabé kyseliny, acetát a ftalát (Tricker & Kubacki 1992). Naopak za inhibitory nitrosace lze považovat kyselinu sorbovou, askorbovou, isoaskorbovou, askorbát sodný, isoaskorbát sodný, oktylgallát, dodecylthiodipropionát, α -tokoferol nebo cystein (Kellner et al. 1982).

ATNC

Je známa existence velkého množství různorodých netěkavých N-nitrososlučenin. Jejich detekce a popis jsou však kvůli jejich nesourodým vlastnostem současnými analytickými metodami problematické (na rozdíl od těkavých), a tak se přistupuje ke stanovení ATNC. K netěkavým N-nitrososlučeninám řadíme i N-nitrosamidy, ke kterým dále náleží nitrosoquanidiny a nitrosopeptidy (Kellner et al. 1991). Jak již bylo uvedeno tyto látky se, ale v potravinách pravděpodobně nevyskytují, a tak se lze domnívat, že ATNC ve sladařsko-pivovarnickém průmyslu je tvořeno zejména N-nitrosaminy. Tohoto názoru jsou Basařová et al. (2010), kteří ATNC považují za skupinu nitrosaminů. Čulík et al. (2012a) mají ale odlišný názor.

Principem tohoto stanovení je odštěpení veškerých nitrosylových skupin (těkavých i netěkavých nitrososlučenin) bromovodíkem a kyselinou octovou za vzniku nitrosylbromidu či oxidu dusnatého, který je následně stanoven chemiluminiscenčním detektorem jako suma nitrosylových skupin N-NO v $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{l})$ potraviny (Kellner 1994). Stanovení ATNC

je již dlouhou dobu dobře zavedené, nicméně v posledních letech neprošlo výraznou obměnou. Za výjimku lze označit používání účinnějšího denitrosačního činidla n-propylacetátu či odstraňování interferonů nitritů za účelem zvýšení citlivosti metody, tedy snížení meze detekce N-NO až na 10 µg/kg potravin (Crews 2010).

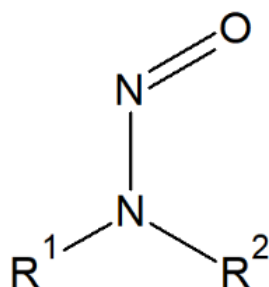
Stanovení ATNC ale neposkytuje poznatky ohledně struktur ani o poměrech molekul obsahující N-NO skupinu. Přesto je více než pravděpodobné, že množství ATNC v různých vzorcích piva má odlišné složení, tudíž představuje rozdílné zdravotní riziko (Čulík et al. 2012a). Ačkoli C-nitrososloučeniny nebyly ve sladu zatím nalezeny, mechanismus C-nitrosace polyfenolů nacházejících se i ve sladu je znám a není tak vyloučeno, že C-nitrosované polyfenoly jsou součástí ATNC (Vrzal & Olšovská 2016). Tomu nasvědčuje i studie Vrzala & Olšovské (2019).

Při nadměrném výskytu oxidů dusíku během hvozdnění lze očekávat vysoký obsah ATNC v komerčně dostupných sladech. Vezmeme-li v úvahu pouze částečnou extrakci ATNC ze sladu do sladiny nezdá se být slad při dodržení správné technologické praxe z hlediska ATNC rizikový (Johnson et al. 1987). Přesto se v některých pivech nachází extrémní koncentrace ATNC, mnohonásobně přesahující doporučenou hranici N-NO 20 µg/kg potravin (Massey et al. 1990). To je vysvětlováno přítomností dusičnanů v mladině společně s kontaminací bakteriemi *Obesumbacterium proteus*, které redukuje dusičnany na dusitany a ty následně reagují s aminy během kvašení piva za vzniku ATNC (Calderbank & Hammond 1989). Dalšími bakteriemi, rovněž patřícími do řádu *Enterobacterales*, které produkují netěkavé N-nitrosaminy během kvašení piva, jsou *Serratia marcescens*, *Shimwellia pseudoproteus* a *Enterobacter cloacae* (Matoulková et al. 2018). V průběhu rmutování je pak rizikový rod *Bacillus* (Olšovská et al. 2014). Čulík et al. (2012b) předpokládají, že ATNC v pivu je soubor látek podobný těkavým a netěkavým nitrosaminům, jehož složení se ale u různých výrobců může zásadně lišit, přičemž se jedná spíše o nízkomolekulární látky charakterizované karboxylovou skupinou.

N-nitrosaminy

N-nitrosaminy lze charakterizovat jako N-nitrosované organické aminy (viz Obr. 5), přičemž nejčastěji vznikají z aminů sekundárních. V porovnání s nimi jsou primární aminy nestabilní a terciální se téměř nenitrosují (Park et al. 2015). Jako první je pojmenoval Otto Witt v roce 1878. Jsou to ubikvitární kontaminanty životního prostředí náležící k hydrofilním sloučeninám, avšak vyskytující se v nízkých koncentracích (Gushgari & Halden 2018). Podle možnosti jejich destilační separace rozlišujeme N-nitrosaminy těkavé, tvořené z cyklických sloučenin či jednoduchých dialkylaminů a N-nitrosaminy netěkavé tvořené z aminokyselin, hydroxylovaných sloučenin a kondenzačních produktů aminokyselin s aldehydy (Tricker & Kubacki 1992). Na rozdíl od těkavých N-nitrosaminů jsou ty netěkavé látky polární mající vyšší molekulovou hmotnost (Davídek 1995). Vrzal & Olšovská (2016) uvádějí ještě skupinu málo těkavých N-nitrosaminů, u nichž jsou substituenty tvořeny fenylovou skupinou (například N-nitrosomethylfenylamin – NMPH_A). Podle Olšovské et al. (2014) jsou hlavními zdroji N-nitrosaminů v pivu slad a mikrobiální kontaminace v průběhu výroby piva, a to zejména v minipivovarech. Erzetti et al. (2009) podotýkají riziko užívání nestandardizovaných surovin s neznámým obsahem dusíku v takovýchto provozech. Kellner

et al. (1982) pak zmiňují fotosensibilitu N-nitrosaminů způsobující jejich rozklad ve viditelné ale i ultrafialové oblasti společně s citlivostí na γ -záření.

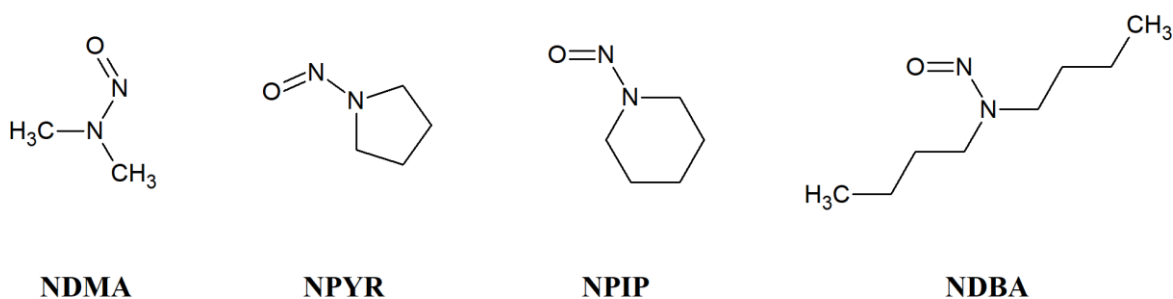


Obr. 5: Obecná struktura N-nitrosaminů

Zdroj: upraveno podle Beard & Swager 2021

Těkavé N-nitrosaminy

Ve sladu byly z těkavých N-nitrosaminů (viz Obr. 6) nalezeny NDMA a N-nitrosopyrrolidin (NPYR); (Kubacki et al. 1989). V pivu pak navíc ještě N-nitrosomethylamin (NMEA), N-nitrosodiethylamin (NDEA), N-nitrosodi-*n*-propylamin (NDPA), N-nitrosodinbutylamin (NDBA) a nejvíce N-nitrosopiperidin (NPIP); (Fan & Lin 2018). V jiných potravinách pak N-nitrosomorfolin (NMOR); (Lee 2019).

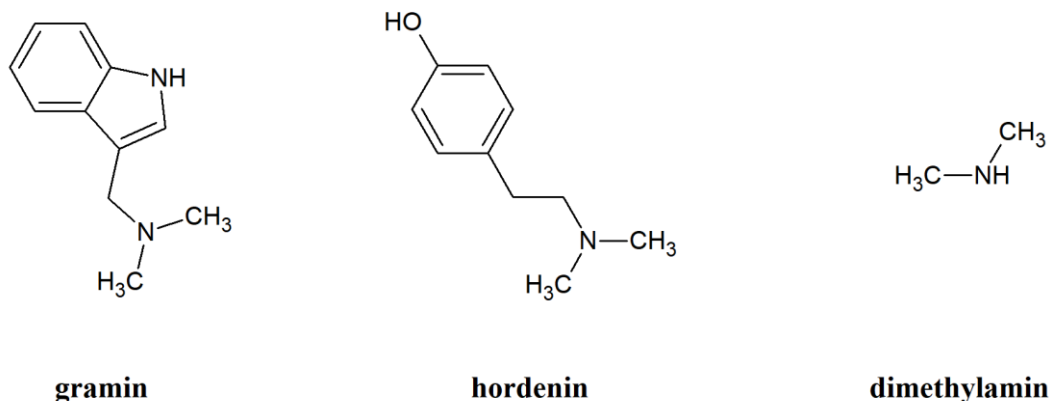


Obr. 6: Zástupci těkavých N-nitrosaminů

Zdroj: PubChem.gov

Největší pozornost je však věnována NDMA, který do piva přechází výhradně ze sladu tak jako ostatní těkavé nitrosaminy. To ale neplatí pro nitrosaminy nětěkavé, jejichž nejvyšší koncentrace se tvoří až během samotné výroby piva (Basařová et al. 2015). Přesto, že se těkavé N-nitrosaminy mohou nacházet již v ječmeni či zeleném sladu (Čulík et al. 1989a) a mohou vznikat i tepelným rozkladem netěkavých nitrosoaminokyselin (Čulík et al. 2011), jsou nejvíce tvořeny v průběhu sladování reakcemi nitrosačnických činidel s přirozenými prekurzory ječmene. V případě NDMA jsou jimi atmosférické oxidy dusíku, jako je oxid dusičitý a aminy gramin, dimethylamin (DMA) a především hordenin (viz Obr. 7) reagující v průběhu hvozdní (Wainright 1986). Naopak použití oxidu dusičitého (monomeru)

v průběhu klíčení následnou tvorbu NDMA překvapivě inhibuje, a to mechanismem zamezení tvorby jeho prekurzorů (O'Farrel 1987).



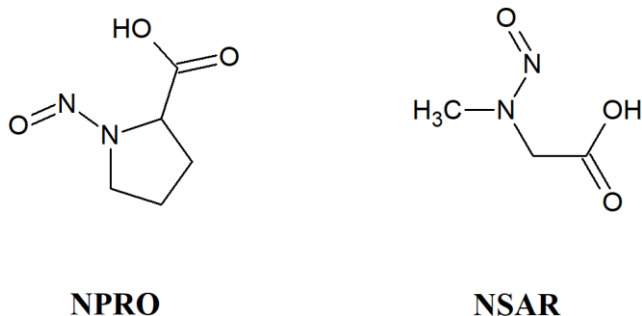
Obr. 7: Prekurzory NDMA

Zdroj: PubChem.gov

Použití hvozdů s nepřímým vyhříváním společně se vstřikováním oxidu siřičitého, nebo spalováním elementární síry je dalším účinným způsobem, jak inhibovat tvorbu NDMA (Davídek 1995). Jako efektivní opatření se jeví také snížení teplot klíčení či klíčení v atmosféře oxidu uhličitého (Čulík et al. 1990). Rovněž lze zmínit dodržení správné technologie hvozdění, tedy docílit vlhkosti 15 až 20 % a přitom nepřesáhnout teplotu 40 až 50 °C (Čulík et al. 1989b). Ačkoli existuje podezření vlivu některých agrochemikálií na obsah těkavých N-nitrosaminů ve sladu, nezdá se, že by se jednalo o významné riziko (Čulík et al. 1989a). Nejnížší koncentrace NDMA lze nalézt u pšeničných piv z důvodů absence přirozených prekurzorů jeho tvorby v pšeničných sladech (Frommberger 1989). Překvapivý je také nízký obsah NDMA v nakuřovaných sladech. Naopak nejvyšší koncentraci NDMA vykazují piva tmavá (Erzetti et al. 2009).

Netěkavé N-nitrosaminy

V pivu představují těkavé N-nitrosaminy zhruba 1 % z ATNC, a přestože zde ATNC není tvořeno pouze N-nitrosaminy, tak se jeví, že netěkavé N-nitrosaminy tvoří většinu z ATNC v pivu (Vrzal & Olšovská 2019). Zástupci netěkavých N-nitrosaminů (viz **Obr. 8**) nalezenými v potravinách jsou N-nitrosoprolin (NPRO), N-nitrosohydroxyprolin (NHPRO), N-nitrosohydroxypyrrolidin (NHPYR), N-nitrososarkosin (NSAR), N-nitrosothiazolidin-4-karboxylová kyselina (NTCA), N-nitroso-2-(hydroxymethyl)thiazolidin-4-karboxylová kyselina (NHMTCA), N-nitroso-2-methylthiazolidin-4-karboxylová kyselina (NMTCA), N-nitrosooxazolidin-4-karboxylová kyselina (NOCA), N-nitroso-5-methyloxazolidin-4-karboxylová kyselina (NMOCA) a N-nitroso-2-(hydroxymethyl)thiazolidin (NHMTHZ); (Tricker & Kubacki 1992).



Obr. 8: Zástupci netěkavých N-nitrosaminů

Zdroj: PubChem.gov

Ačkoliv netěkavé N-nitrososloučeniny nevykazují tak závažnou karcinogenitu, existují mechanismy jejich přeměny na mnohem rizikovější těkavé formy (Kellner 1994). Kromě již zmíněného termického štěpení (Čulík et al. 2011) se dále jedná o transnitrosační přenosy jako v případě NPRO, který za specifických podmínek poskytuje nitrososkupinu pro vznik vysoce karcinogenní NMU (Inami et al. 2015). Ve sladu je pak významný vždy přítomný NPRO (Tricker & Preussmann 1991) a méně pak NSAR, který ale snadno dekarboxyluje na NDMA (Pollock 1981). V pivu NPRO představuje přibližně 10 % z ATNC, zatímco NSAR zde nebyl detekován (Čulík et al. 2012b). U experimentálně nitrosovaných piv byl detekován také NPRO-ethylester (Vrzal & Olšovská 2019). Experimentálně bylo zjištěno, že ječný terciální aminový alkaloid gramin poskytuje při vystavení umělým nitrosačním podmínkám netěkavou N-nitrososloučeninu N-nitroso-3-nitromethylindol (Ahmad et al. 1985).

Legislativní rámec

Podle dnes již zrušené *Vyhlášky č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách*, bylo nejvyšší přípustné množství pro NDMA v pivu $0,0005 \text{ mg.kg}^{-1}$. Pro sumu nitrosaminů, která zahrnovala NDMA, NDEA, NPYR, NPIP, NMOR a NDBA bylo nejvyšší přípustné množství $0,0015 \text{ mg.kg}^{-1}$. *Vyhláška č. 304/2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin*, dále definovala použití dusičnanů a dusitanů, tedy nitrosačních činidel v potravinách.

Legislativní rámec chybí i v případě sladů, a tak Český svaz pivovarů a sladoven radí nepřesahovat obsah NDMA ve sladech $1 \text{ } \mu\text{g/kg}$ a sumy těkavých N-nitrosaminů $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$, což je v případě NDMA přísnější limit, než v Německu (Čulík et al. 2011). Stejně tak žádný právní předpis Evropské unie nedefinuje mezní hodnoty pro ATNC, nicméně obsah ATNC menší než $20 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (N-NO) či $40 \text{ } \mu\text{g/kg}$ (N-NO) je tolerován (Olšovská et al. 2014). Rusko, Bělorusko a Kazachstán jsou součástí Celní unie mající potenciál rozšířit se o další členské státy, jako je Arménie, Tádžikistán, Kyrgyzstán a Uzbekistán (Krotov 2011). Zde je obsah nitrosaminů v potravinách regulován *Technickými předpisy Celní unie, O bezpečnosti potravinářských výrobků (TR CU 021/2011)*, přičemž pro slad je nejvyšší přípustné množství nitrosaminů $0,015 \text{ mg/kg}$ a pro pivo $0,003 \text{ mg/kg}$ (Amelin & Bol'shakov 2019).

Ostatní nitrososloučeniny

Sušina ječmene obsahuje 0,1 až 0,3 % fenolických látek uložených v aleuronové vrstvě a pluchách, které vykazují antioxidační aktivitu (Kunze 2010). V průběhu máčení jsou vystaveny vodě, která zpravidla obsahuje dusičnany, a ty se mohou bakteriálně redukovat na dusitany (Briggs et al. 2004). Fenoly zde tak mohou při nízkém pH reagovat s dusitany za vzniku *p*-nitrosofenolů, které samy o sobě působí mutagenně a zároveň katalyzují nitrosaci sekundárních aminů za vzniku NDMA, NPYR a jiných N-nitrosaminů (Gilbert et al. 1980).

Pražením ječmene vzniká aromatická těkavá sloučenina guajakol (Joung et al. 2018). Bölicke & Ternes (2016) prokázali, že v masné matrici při 80 °C reaguje guajakol s dusitanem sodným za vzniku 6-nitrosoguajakolu, který je ale účinně inhibován přísadkou kyseliny askorbové.

Dále ječný slad obsahuje isoenzymy α -amylázy, na jejichž složení se podílí také kyselina glutamová a pyroglutamová (Svensson et al. 1985). Kyselina pyroglutamová je přítomna i v dalších potravinách a je syntetizována mimo jiné i z kyseliny glutamové. V přítomnosti dusitanů je kyselina pyroglutamová nitrosována za vzniku kyseliny nitrosopyroglutamové, která je spojována se vznikem rakoviny žaludku (Yamada et al. 1981). Na přirozených imunitních reakcích ječmene se podílí kyselina pipekolová mechanismem akumulace reaktivních forem kyslíku a produkce oxidu dusnatého (Lenk et al. 2019). Existuje podezření, že kyselina pipekolová může být nitrosována za vzniku N-nitrosopipekolové kyseliny (NPIC); (Malečková et al. 2021).

3.2.2 Ostatní dusíkaté látky vzniklé interakcí nitrosačnických činidel s látkami ve sladu

Nitrososloučeniny

Některé nitrososloučeniny poskytují látky, které lze považovat za potravinové mutageny (Wild 1990). Jsou také známy mechanismy nitrace přirozeně se vyskytujících látek v ječmeni. Například oxid dusitý se kromě nitrosace podílí i na nitraci, a to zejména fenolů, které mohou být nitrovány přímo, či oxidací nitroso skupiny (Wainright 1986).

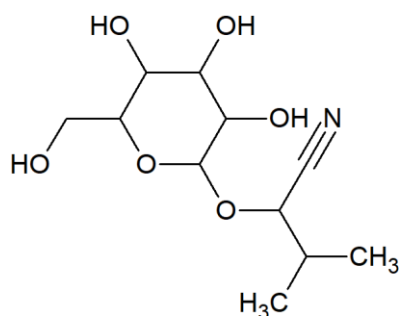
Slad přispívá největším podílem k celkovým fenolickým látkám piva, mezi které řadíme kyselinu benzoovou a její deriváty, jako jsou kyselina 2-hydroxybenzoová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová a kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová (Preedy 2009). Uvádí se, že některé deriváty kyseliny benzoové jsou schopny vázat radikály a vykazují tak chemoprotektivní aktivitu (Gerhäuser 2005). Na druhou stranu je kyselina benzoová (E210) a její sodná sůl benzoan sodný (E211) častými konzervačními činidly v potravinách a nápojích, které v kombinaci s kyselinou askorbovou dávají vzniknout rizikovému benzenu mechanismem dekarboxylace benzoátu (Rabiu et al. 2021). Kyselina L-askorbová (γ -lakton *L-threo*-hex-2-enonové kyseliny), její analogy (kyselina D-isoaskorbová) a deriváty (natriumaskorbát) nachází své využití i v pivovarské výrobě jako antioxidační stabilizátory (Basařová et al. 2010). Je možné, že se reakcí nitrosačnických činidel s kyselinou benzoovou v pivu generuje kyselina nitrobenzoová (Malečková et al. 2021).

Další fenolickou látkou obsaženou v ječmeni, potažmo ječném sladu, je kyselina vanilová vyskytující se ve formě volné a ve formě rozpustných esterů. Obsah volné formy kyseliny vanilové se během sladování snižuje, zatímco kyselina vanilová vázaná

v rozpustných esterech vykazuje u některých odrůd nárůst (Dvořáková et al. 2008). Kyselina vanilová reagující s dusitany v pivu poskytuje 2-methoxy-5-nitrofenol, nikoliv kyselinu nitrovanilovou, jak by se mohlo očekávat (Malečková et al. 2021). Tito autoři dále uvádí jako možné prekurzory vzniku dusíkatých látek vzniklých interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu aminokyseliny prolin a tyrosin. Podle Gupta et al. (2010) patří tyto aminokyseliny v ječmeni k minoritním. Meng et al. (2015) uvádějí v případě zeleného sladu zastoupení prolinu 0,55 a tyrosinu 0,40 g/kg sušiny, přičemž lze jejich obsah významně navýšit světelným režimem během pěstování. Basařová et al. (2015) naproti tomu považují prolin za nejhojněji zastoupenou aminokyselinu v ječmeni a sladu.

Kyanosloučeniny

Mnoho druhů rostlin, včetně ječmene obsahuje fytotoxiny označované jako kyanogenní glykosidy uvolňující vysoce toxický kyanovodík (Cho et al. 2013). V případě ječmene lze jmenovat epiheterodendrin (viz **Obr. 9**) odvozený z aminokyseliny leucinu, který během následné výroby piva produkuje kyanid působením β -glukosidázy původem z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Nielsen et al. 2002). Kyanosloučeniny mohou v pivu vznikat i reakcemi dusičnanů, jelikož byl v této matici detekován 4-kyanofenol, který pravděpodobně vzniká rovněž z aminokyseliny, nicméně z tyrosinu (Malečková et al. 2021).



epiheterodendrin

Obr. 9: Kyanogenní glykosid

Zdroj: PubChem.gov

Oximy

Například estery cyklohexanon oximu, jako jsou cyklohexanon O-(2-methylpropanoyl)oxim, cyklohexanon O-(3-methylbutanoyl)oxim a cyklohexanon O-(cyklohexylkarbonyl)oxim, nachází své uplatnění v potravinářství jako aromatizující látky (Dikusar & Zhukovskaya 2008). Samotný cyklohexanon oxim vykazoval během experimentů s laboratorními zvířaty hematotoxické účinky. V organismu se účinně absorbuje skrze zažívací ústrojí a zároveň je možným inhibitorem oxidačního metabolismu ethanolu (Parmar & Burka 1991). Cyklohexanon aerobně dehydrogenuje na nenasycený cyklohexenon (Diao

et al. 2013). Existuje podezření na výskyt látek s podobnou strukturou i v pivu (Malečková et al. 2021).

Během metabolického profilování ječmene v průběhu sladování bylo zjištěno, že je kyselina pyrohroznová nejvíce tvořena ke konci sladovacího procesu (Frank et al. 2011). V pivovarnictví má tato polární nearomatická nízkomolekulární organická kyselina význam jako fermentační biomarker a sensoricky aktivní látka. V pivu dále patří mezi nejhojněji se vyskytující organické kyseliny a dosahuje v něm poměrně vysokých koncentrací (Erny et al. 2009). Oxim kyseliny pyrohroznové byl detekován v pivu. Jedná se o tautomer kyseliny 2-nitrosopropanové, který může vznikat činností kontaminujících bakterií *Obesumbacterium proteus* (Malečková et al. 2021).

Strukturní identifikace

Látky, které nepatří mezi N-nitrososloučeniny, ale vznikají rovněž reakcí nitrosačních činidel, a které jsou předmětem této práce, byly ve VÚPS objeveny následujícím necíleným přístupem. Vzorek piva byl okyselen a uměle nitrosován dusitanem sodným, případně jím byla nitrosována standardní látka. K nitrosaci byl také využit izotopicky značený dusitan sodný ($\text{Na}^{15}\text{NO}_2$) z důvodu ověření původu vytvořené funkční skupiny. Následně byly získané produkty analyzovány pomocí GC-MS (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) v módu měření skenových spekter, které byly porovnány s knihovnou hmotnostních spekter (NIST). Poté se přistoupilo k MS/MS experimentům v módu sledování prekurzorových a produktových iontů, na jejichž základě byly načrtnuty základní fragmentace molekul, případně fragmentace izotopů. Pro potvrzení struktur se přistoupilo k použití umělé inteligence výpočetního nástroje DeepReI, který vypočítal teoretické retenční indexy molekul. Ty byly následně porovnány s experimentálními retenčními indexy. V případě, že se lišily, přistoupilo se opět k fragmentacím a navržení jiných struktur. Pokud se shodovaly, byly molekuly připraveny laboratorně, či byly opatřeny standardy a následně opět srovnány s teoretickými retenčními indexy (Malečková et al. 2021).

3.2.3 Mechanismy toxicity

Toxicita N-nitrososloučenin vztahující se k mutagenitě, karcinogenitě a teratogenitě je již dlouho známa (Preussmann 1984). Pro stabilní nitrosaminy je typické jejich karcinogenní působení daleko od místa vstupu, na rozdíl od labilních nitrosamidů působících lokálně (Crosby & Sawyer 1976). Je známo nejméně 300 kongenerů N-nitrosaminů (Gushgari & Halden 2018). Podle metaanalýzy, kterou provedli Thresher et al. (2020), lze pouze asi 18 % nitrosaminů považovat za nekarcinogenní. Jelikož jejich karcinogenní aktivita v některých případech převyšuje benzo[a]pyren, azbest či PCBs, je povzbudivé, že mezi lety 1980 až 1990 klesl obsah N-nitrosaminů v pivu až o 96 %, zatímco jiné zdroje jejich expozice vykazovaly stagnaci (Gushgari & Halden 2018).

Z hlediska příjmu N-nitrosaminů potravinami (expozice malými dávkami) představuje riziko zejména chronická toxicita (Crosby & Sawyer 1976), která je dávana do vyšší souvislosti s tvorbou rakoviny, než toxicita akutní (Lijinsky 1986). Vzhledem k tomu, že nejčastěji postiženým orgánem jsou játra, uvažuje se, že toxicky působí až metabolity

nitrosaminů. Příkladem mohou být dialkylnitrosaminy, u kterých působí toxicky až metabolity, jako jsou diazoalkan, monoalkylnitrosamin a konečné karboniové ionty. V případě NDMA tato látková přeměna probíhá v játrech na úrovni mikrozomů a buněčné mízy (Crosby & Sawyer 1976). Aktivace NDMA je zde realizována monoxygenázou cytochromem P-450 (Jain et al. 2020). Nejprve ale podléhá hydroxylaci a dealkylaci a následně konjuguje například s aminokyselinami za vzniku polárních sloučenin, které se snáze vylučují z organismu (Rostkowska et al. 1998). Karcinogenitu indukuje konečný elektrofilní karboniový iont alkylující DNA (Helguera et al. 2008), která je často alkylována v poloze N7 guaninového zbytku (Gates 2009). NDMA je toho v případě RNA schopný za vzniku 7-methylguaninu (Crosby & Sawyer 1976). Samotná nitrosací činidla poškozují DNA také mechanismem deaminace (Gates 2009).

Tato metabolická aktivace ale neplatí pro nitrosomočoviny, které působí karcinogenně samy o sobě. Z důvodu horší schopnosti procházet biomembránami platí, že s rostoucím alkylovým řetězcem klesá toxicita nitrososloučenin (Helguera et al. 2007). Nitril, alkylchlorid, alifatické terciární aminy a dále heteroaromatické a hetero N nebazické fragmenty lze považovat za vysoce toxické substrukтуры N-nitrososloučenin (Fan et al. 2018). Konkrétně u N-nitrosomočoviny se jedná dále o ethylové skupiny. U N-nitrosaminů karboxyalkylové a hydroxyalkylové skupiny nevykazují vlivem vyšší polarita, a tedy snazší exkrece, tak značně toxický efekt, na rozdíl od methylových a ethylových skupin (Helguera et al. 2008).

Poznatky o toxicitě N-nitrososloučenin pochází z *in vivo* experimentů s laboratorními zvířaty (viz **Tab. 4**); (Lijinsky 1986). Vystává tak otázka extrapolace těchto dat na člověka, u něhož jsou známy pouze případové studie akutní toxicity. Zdá se být ale velmi pravděpodobné, že je člověk vystaven stejným rizikům (Preussmann 1984). Po zadání hesla „nitrosamines“ do fulltextového vyhledávače databáze ClinicalTrials (2021) bylo ke dni 22. 10. 2021 nalezeno 9 klinických studií, z toho 5 bylo kompletních, 3 rozpracované a 1 nespecifikována. V těchto studiích byla věnována pozornost zejména tabákovému kouři a dietní expozici masných výrobků, přičemž se žádná nevěnovala této problematice ve sladařsko-pivovarnickém průmyslu.

Tab. 4: LD₅₀ (orální expozice) pro vybrané N-nitrososloučeniny u potkanů

<i>N-nitrososloučeniny</i>	<i>LD₅₀</i>	
	<i>mmol/kg tělesné hmotnosti</i>	<i>mg/kg tělesné hmotnosti</i>
<i>alkyl-nitrosaminy</i>	-	-
NDMA	0,54	40
NMEA	1	88
NDEA	2,8	290
NDPA	3,7	480
NDBA	7,6	1200
<i>fenyl-nitrosaminy</i>	-	-
NMPhA	2,1	290
<i>heterocyklické nitrosaminy</i>	-	-
NPYR	9	900
NPIP	1,7	190
NMOR	2,8	330
<i>nitrosomočoviny</i>	-	-
NMU	1,1	110

Zdroj: upraveno podle Buist et al. 2015

Oxim kyseliny pyrohroznové, 4-kyanofenol, 2-methoxy-5-nitrofenol a další dosud strukturálně necharakterizované sloučeniny jsou látky, které nelze zařadit mezi nitrososloučeniny. Vznikají ale rovněž vlivem nitrosačních činidel s prekurzory v potravinách. Tyto látky však nejsou z toxikologického hlediska zatím prozkoumány (Malečková et al. 2021).

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

Extrakce probíhala s využitím acetonitrilu (99,96 % p.a., Lach-Ner) a pyridinu (≥ 99 %, Sigma-Aldrich). Derivatizačním činidlem byla směs N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a trimethylchlorosilanu – dále jen BSTFA (99:1, v/v, Sigma-Aldrich). Jako interní standard (IS) byl použit DL-fenylalanin-1- ^{13}C (99 %, Sigma-Aldrich). Z něj byl za použití deionizované vody připraven zásobní roztok. Deionizovaná voda byla ve všech případech vyrobená pomocí přístroje Milli-Q (Merck). Hexan (≥ 99 % p.a., Honeywell) společně s acetonitrilem (99,96 % p.a., Lach-Ner) byly použity na proplach chromatografické mikrostríkačky v autosampleru při GC-MS/MS analýze. Acetonitril byl použit rovněž k přípravě zásobního roztoku IS. K rozkladu případných reziduí dusitanů ze vzorků kongresní sladiny byl použit roztok amidosíranu amonného (99 % p.a., Merck) – 0,2 mol/l v kyselině sírové (96 %, Merck) – 0,2 mol/l. Ke kondicionaci SPE kolonek byl použit methanol ($\geq 99,9$ %, Honeywell). Jako eluční činidlo byl aplikován dichlormethan ($\geq 99,9$ % p.a., Honeywell). Odpar elučního činidla byl zajištěn argonem (Air Products). Za účelem přípravy roztoků standardních látek z důvodu ověření interferencí byly použity: DL-kyselina jablečná (≥ 99 %, Sigma-Aldrich), N-nitroso-L-prolin (≥ 98 %, Glentham Life Sciences) jako ethanolový roztok 10 mg/ml. K ověření retenčních časů (RT) byly použity 4-kyanofenol (95 %, Sigma-Aldrich) a *p*-nitrosofenol (Výzkumný ústav syntetického kaučuku Kralupy nad Vltavou).

4.2 Použité přístroje a laboratorní náčiní

Vzorky sladů byly namlety pomocí elektrického kávového mlýnku SCG 3050SS (Sencor). Namleté vzorky sladů byly naváženy na analytické váze 1602 MP (Sartorius). Roztoky popsané v metodice byly pipetovány pomocí automatických pipet 100 a 1000 μl (Transferpette S Brand) a 5000 μl (Research plus Eppendorf). Extrakce, derivatizace a rmutování vzorků proběhlo na blokové lázni Pierce Reacti-Therm I #18822 Heating Module (Thermo Scientific). K centrifugaci byla použita odstředivka MiniSpin (Eppendorf). Vzorky byly analyzovány pomocí plynového chromatografu 7890B GC System (Agilent Technologies). Mobilní fází bylo helium (Air Products). K separaci analytů byla použita kolona HP-5MS UI (Agilent Technologies) s délkou 30 m, průměrem 0,250 mm a tloušťkou vrstvy stacionární fáze 0,25 μm , tvořenou (5%-Phenyl)-methylpolysiloxanem. Detekce analytů proběhla s využitím hmotnostního spektrometru 7000D GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies). Kolizním plynem byl dusík (Air Products). K SPE byly použity SPE kolonky Discovery DSC-18, 500 mg (Supelco) v kombinaci s SPE manifoldem Visiprep (Supelco) a membránovou vývěvou VM-20D (MEZ).

Mezi další laboratorní pomůcky a materiál patřily: pipeta (40 ml); pipeta (20 ml); pipetovací balónek; reagenční láhev (100 ml), odměrná baňka (100 ml), laboratorní lžička a mikrolžička; laboratorní pinzeta; vialky se šroubovacím víčkem s gumovým septem (sklo čiré, 2 ml); inserty s plochým dnem (sklo čiré, 0,4 ml); centrifugační zkušavky (plast čirý,

1,5 ml); vialky krimpovací (sklo čiré, 20 ml); krimpovací hliníková víčka s gumovým septem (20 mm), pipetovací špičky; buničina; skleněné tyčinky; skleněný teploměr; filtrační papír; nálevky, stojan.

4.3 Bezpečnost

Podle Malečkové et al. (2021) je důležité při práci se zde zkoumanými sloučeninami dodržovat bezpečnostní opatření zamezující jejich expozici. Přestože tyto látky mají neznámou toxicitu, strukturně se podobají nebezpečným N-nitrosaminům, a je tak třeba s nimi zacházet obezřetně.

4.4 Použité vzorky sladů

Pro analýzu bylo použito 200 vzorků převážně komerčně dostupných sladů z České, Slovenské, Polské a Francouzské republiky, které byly do VÚPS zaslány z důvodu rutinních analýz. Jednalo se o slady plzeňské, mnichovské, speciální (karamelové, nakuřované, barvící) a pšeničné. V menší míře byly zastoupeny i nesladované ječmeny, sladový květ a slady uměle nitrosované. Studie byla navržena tak, aby zastoupení vzorků zhruba odpovídalo přibližnému zastoupení sladů v rámci sypaní určeného pro výrobu klasických českých piv. Z tohoto důvodu byly nejvíce zařazeny slady plzeňské, následované slady mnichovskými a až poté slady speciálními. Každý vzorek byl připraven dvakrát (myšleno do dvou vialek), přičemž každá vialka byla analyzována duplicitně. Celkem tak bylo získáno 800 chromatogramů určených k vyhodnocení.

Vzorky byly označovány standardním pětimístným interním číslem AZL VÚPS, případně doplněny písmennými znaky pro větší přehlednost. Hodnoty koncentrace NDMA pocházely ze standardně prováděných analýz ve VÚPS. Bližší charakteristika souboru zkoumaných vzorků je uvedena v **Tab. 5**, **Tab. 6** a také v **Příloze II**.

Tab. 5: Četnost jednotlivých matic, které byly analyzovány

<i>matrice</i>	<i>počet</i>
plzeňský slad	98 (+ 1 experimentální)
neznámý*	46
mnichovský slad	28
karamelový slad	9
pšeničný slad (světlý)	6
nesladovaný ječmen	6
barvící slad	2
uměle nitrosovaný slad	2
nakuřovaný slad	1
sladový květ	1
CELKEM	200

* chybějící popis v databázi AZL VÚPS, podle makroskopických znaků se ale jednalo ve všech případech o slady plzeňské

Tab. 6: Původ matric

<i>země původu</i>	<i>počet matric</i>
Česká republika	156
Slovenská republika	16
Srbská republika	9
neznámý*	9
Polská republika	8
Francouzská republika	2
CELKEM	200

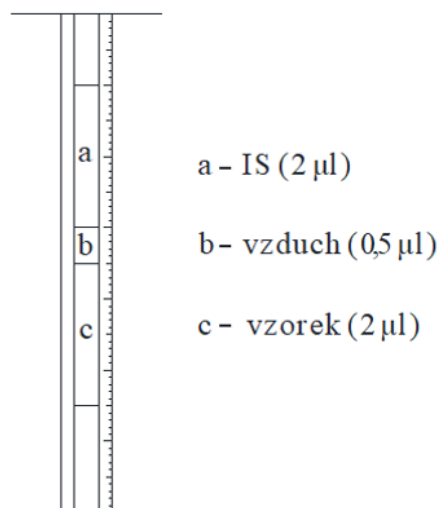
* chybějící popis v databázi AZL VÚPS

4.5 Postup přípravy extrakčního činidla

Jako extrakční činidlo byla zvolena směs pyridinu a acetonitrilu (60:40, v/v). 60 ml pyridinu a 40 ml acetonitrilu bylo odpipetováno do hnědé reagenční láhve a protřepáno.

4.6 Interní standard

Jako IS byl použit izotopicky značený DL-fenylalanin. Ten byl jako IS použit i v předchozím výzkumu podle Malečkové et al. (2021). Kvůli nutnosti vzájemného porovnání výsledků měření musel být použit i v tomto případě. Fenylalanin byl izotopicky značený z důvodu předpokladu přirozeného výskytu fenylalaninu ve zkoumaných vzorcích, a tedy možného ovlivnění měření. Během experimentů však bylo zjištěno, že izotopicky značený DL-fenylalanin se při přípravě vzorku pravděpodobně silně váže na částice namletého sladu a není schopen se extrahovat do extraktu. Přestože byly provedeny pokusy s vysokými koncentracemi roztoku fenylalaninu přidaným v různých fázích přípravy vzorku, v chromatogramu nebyla nikdy zaznamenána žádná odezva analytu. Z tohoto důvodu byla použita metoda duálního nástřiku, kdy byl IS připraven do samostatné vialky a do chromatografické mikrostřikačky byl nasán společně se vzorkem, avšak odděleně (viz **Obr. 10**). Jedna vialka s IS byla vždy použita pro analýzu 2 sérií vzorků. Zásobní roztok IS byl připraven odpipetováním 830 μ l vodného roztoku izotopicky značeného DL-fenylalaninu o koncentraci 100 mg/l (připraveného z: DL-fenylalanin-1-¹³C; 99 %, Sigma-Aldrich) do 10ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla po risku doplněna acetonitrilem a protřepána. Koncentrace zásobního roztoku IS tak činila 8,3 mg/l. IS pro analýzu na GC-MS/MS byl připraven následujícím způsobem. Do 2ml vialky byl vložen 0,4ml insert s plochým dnem, do něhož bylo odpipetováno 10 μ l zásobního roztoku IS a 200 μ l směsi BSTFA. Jednostupňová derivatizace probíhala po dobu 30 minut při teplotě 65 °C v blokové lázni. Následovalo teplotní ustálení po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a analýza na GC-MS/MS. Regulační diagram je uveden v **Příloze III**.



Obr. 10: Schéma duálního nástřiku

Zdroj: vlastní nákres

4.7 Postup přípravy uměle nitrovaných sladů

NO₂ vznikal v obou případech („za horka“ i „za studena“) následující chemickou reakcí:



4.7.1 Nitrosace plynným oxidem dusičitým „za horka“

Slad nitrosovaný „za horka“ pomocí plynného oxidu dusičitého byl připraven v rámci diplomové práce Malečková (2018):

Celý slad (plzeňský – 46 g) byl navlhčen (pomocí 10 ml destilované vody) a umístěn do reakční baňky s kulatým dnem. Do baňky generující NO₂ byla umístěna koncentrovaná kyselina dusičná (50 ml, 65 %, Merck) společně s kovovým zrněným zinkem, který byl dávkován postupně. Vznikající NO₂ přecházel aparaturou do reakční baňky, která byla uzavřena a 2 h zahřívána na topném hnízdě, přičemž teplota nad sladem byla 36 až 40 °C. Následovalo sušení sladu po dobu 120 minut při teplotě 83 °C.

4.7.2 Nitrosace plynným oxidem dusičitým „za studena“

Slad nitrosovaný „za studena“ pomocí plynného oxidu dusičitého byl připraven v rámci diplomové práce Malečková (2018):

Celý slad (plzeňský – 20 g) byl v baňce se zábrusem navlhčen pomocí destilované vody (4 ml) a ponechán v atmosféře dusíku (40 minut). Přibližně polovina sladu byla převedena do druhé baňky se zábrusem. Slad v původní baňce byl ponechán v atmosféře dusíku bez přístupu světla do druhého dne. Druhá baňka se zábrusem byla ponechána působení NO₂. Ten byl připraven následujícím způsobem: 10 ml koncentrované kyseliny dusičné (65 %, Merck) bylo převedeno do baňky generující NO₂ a následně k ní byl postupně přidáván kovový zrněný zinek (≥99,0 % p.a., Chemopol). NO₂ tak ústl do baňky

se zábrusem, ve které byl umístěn slad. Ta byla uzavřena a ponechána v temnu do druhého dne. Následovalo sušení obou sladů po dobu 120 minut při teplotě 40 °C.

Postup přípravy všech uměle nitrosovaných sladů k analýze na GC-MS/MS probíhala stejným způsobem uvedeným v **Kapitole 4.8.**

4.8 Postup přípravy vzorků sladu k analýze na GC-MS/MS

Pro přípravu vzorků byla použita miniaturizovaná extrakční metoda pro screening netěkavých nitrososlučenin ve sladu podle Malečkové (2018).

Celý postup přípravy vzorku pro analýzu na GC-MS/MS lze shrnout do následujících kroků: 1. mletí sladu; 2. extrakce; 3. derivatizace; 4. teplotní ustálení; 5. centrifugace.

Přibližně 5 g dobře homogenizovaného vzorku sladu (celých zrn) bylo namleto pomocí elektrického kávového mlýnku na jemnou sladovou moučku. Přibližně 2,5 g této moučky bylo pomocí laboratorní lžičky převedeno do 20ml vialky a zhomogenizováno. Poté byla moučka pomocí laboratorní mikrolžičky převedena do dvou 0,4ml insertů s plochým dnem, přičemž její hmotnost činila přesně asi 50 mg (v jednom insertu). Inserty byly následně vloženy do 2ml šroubovacích vialek. Přidáním 50 µl směsi pyridinu a acetonitrilu (60:40, v/v) započala 30minutová extrakce při teplotě 65 °C v blokové lázni. Jednostupňová derivatizace započala přidáním 150 µl derivatizačního činidla BSTFA a probíhala opět po dobu 30 minut při teplotě 65 °C v blokové lázni. Následně byly vialky teplotně ustáleny po dobu 10 minut při laboratorní teplotě (cca 18 °C). Poté byly inserty pomocí laboratorní pinzety vloženy do centrifugační zkumavky a centrifugovány po dobu 5 minut při 12 000 ot./minutu. Dále bylo odpipetováno přibližně 100 µl extraktu do nových insertů, které byly umístěny do původních vialek. Následovala analýza vzorků pomocí GC-MS/MS. U analyzovaných látek se předpokládala fotosensibilita, z tohoto důvodu probíhala extrakce, derivatizace, teplotní ustálení a centrifugace v uzavřených vialkách/zkumavkách v temnu. Takto byl k analýze připraven jeden vzorek dvakrát (myšleno do dvou vialek). V jedné sérii bylo možno připravit 6 vzorků, tedy 12 vialek (limitováno počtem pozic v blokové lázni), přičemž během jednoho laboratorního dne (8 h) byly připraveny dvě série vzorků, tedy 12 vzorků ve 24 vialkách.

4.9 Kongresní sladiny

Celý postup přípravy kongresní sladiny pro analýzu na GC-MS/MS lze shrnout do následujících kroků: 1. mletí sladu; 2. rmutování; 3. filtrace; 4. rozklad dusitanů; 5. SPE; 6. odpar elučního činidla; 7. derivatizace; 8. teplotní ustálení.

4.9.1 Postup přípravy kongresní sladiny

Při přípravě kongresní sladiny se vycházelo z metodiky podle Analytica-EBC – Method 4.5.1., která byla miniaturizována a dále upravena pro potřeby analýzy.

Přibližně 10 g dobře homogenizovaného vzorku sladu (celých zrn) bylo namleto pomocí elektrického kávového mlýnku na jemnou sladovou moučku. Přesně asi 2 g této moučky byly

naváženy do 20ml vialky. Následně byly přidány 4 g deionizované vody o teplotě 45 °C. Vzniklý rmut se promíchal skleněnou tyčinkou, která byla opláchnuta dalšími 4 g deionizované vody o teplotě 45 °C, která stékala do 20ml vialky. Vialka byla vložena do blokové lázně přehřáté na teplotu 45 °C, kde za občasného míchání probíhalo rmutování po dobu 30 minut. Poté byla teplota zvyšována přibližně o 1 °C/minutu do dosažení teploty 70 °C za občasného míchání. Při této teplotě byly přidány další 4 g deionizované vody o teplotě 70 °C. Teplota 70 °C byla za občasného míchání udržována 1 h. Teplotní režim byl kontrolován skleněným laboratorním teploměrem. Následovalo ochlazení na přibližně 20 °C během 10 až 15 minut při laboratorní teplotě v temnu. Skleněná tyčinka byla následně opláchnuta deionizovanou vodou, která stékala do 20ml vialky se sladinou. Obsah vialky byl deionizovanou vodou dovážen na 18 g. Po promíchání byl rmut filtrován přes filtrační papír (skládaný filtr) do čisté 20ml vialky. První 4 ml filtrátu byly znovu vráceny na filtrační papír. Když se mláto zdálo suché, filtrace byla ukončena. Takto bylo získáno kolem 15 ml filtrátu/sladiny. Kongresní sladina byla připravena ze 13 vzorků sladů, přičemž z každého vzorku byly připraveny 2 kongresní sladiny. Vzorky byly označovány standardním interním číslem AZL VÚPS (viz **Kapitola 4.4**) a zároveň označeny písmeny „KS“. Každý vzorek sladů, ze kterého byla připravena kongresní sladina byl opět připraven způsobem uvedeným v **Kapitole 4.8** a analyzován pomocí GC-MS/MS z důvodu možnosti zhodnocení extraktivnosti sledovaných analytů. Tyto vzorky byly kromě kódu VÚPS označeny ještě písmeny „KSS“. Bližší charakteristika sladů, ze kterých byly připraveny kongresní sladiny, je uvedena v **Tab. 7** a v **Příloze IV**.

Tab. 7: Četnost jednotlivých sladů, ze kterých byla připravena kongresní sladina

<i>slad</i>	<i>počet</i>
plzeňský slad	4
neznámý*	2
mnichovský slad	6
uměle nitrovaný slad	1
CELKEM	13

* chybějící popis v databázi AZL VÚPS, podle makroskopických znaků se ale jednalo ve všech případech o slady plzeňské

4.9.2 Postup přípravy kongresní sladiny k analýze na GC-MS/MS

K 6 ml kongresní sladiny byl přidán 1 ml 0,2 molárního roztoku amidosíranu amonného v 0,2 molární kyselině sírové. Při laboratorní teplotě byl vzorek ponechán 15 až 30 minut v temnu z důvodu rozložení případných reziduí dusitanů. Během této prodlevy byl sorbent v SPE kolonce kondicionován 6 ml methanolu a 6 ml deionizované vody. Poté bylo 7 ml vzorku kongresní sladiny nanášeno na SPE kolonku. Po extrakci byl vzorek následně promyt ze sorbentu 1 ml deionizované vody a vysušen. Přidáním 12 ml dichlormethanu byly extrahované látky ze sorbentu eluovány do 20ml vialky. Během celého procesu vakuování podtlak nepřekročil 10 mm Hg. Extrakt byl následně při 45 °C odpařen do sucha pod mírným proudem argonu. Následovalo přidání 1 ml dichlormethanu, jímž byly extrahované látky rozpuštěny z 20ml vialky. Následně byl dichlormethan odpipetován do 2ml vialky. Proces

rozpuštění byl opakován ještě s 0,5 ml dichlormethanu. Dále byl z 2ml vialky dichlormethan stejným způsobem odpařen do sucha. Rezidua extraktu byla rozpuštěna v 200 μ l BSTFA a derivatizována 1 h při 65 °C. Následovalo teplotní ustálení 10 minut při laboratorní teplotě. Postup vycházel z publikace Malečkové et al. (2021). Přípravené vzorky byly případně podle potřeby zamrazeny při teplotě -19 °C v temnu.

4.10 Ověření interferencí a kalibrace retenčních časů

4.10.1 Ověření interferencí

Postup přípravy vzorků pro analýzu v módu MRM, skenu a SIM

Příprava jednoho vzorku ječmene (TCV351) a jednoho vzorku mnichovského sladu (65761) probíhala stejně jako v **Kapitole 4.8**. S rozdílem, že vzorek byl připraven pouze do jedné vialky a během analýzy nebyl použit IS. Následovala analýza na GC-MS/MS v módu MRM, skenu (mód skenování s využitím pouze 1. kvadrupólu) a SIM (mód sledování vybraných iontů).

Postup přípravy standardu kyseliny jablečné k analýze na GC-MS/MS

Přibližně čtvrt mikrolžičky sypké kyseliny jablečné bylo převedeno do 0,4ml insertu s plochým dnem, který byl předtím umístěn do 2ml vialky. Následně bylo přidáno 200 μ l BSTFA. Kyselina jablečná byla derivatizována po dobu 30 minut při teplotě 65 °C v blokové lázni. Následovalo teplotní ustálení po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a analýza na GC-MS/MS v módu SIM.

Postup přípravy standardu NPRO k analýze na GC-MS/MS

10 μ l roztoku vzniklého rozpuštěním 10 mg N-nitroso-L-prolinu v 1 ml ethanolu bylo odpipetováno do 0,4ml insertu s plochým dnem umístěným ve 2ml vialce. Přidáním 200 μ l BSTFA započala v blokové lázni derivatizace trvající 30 minut při teplotě 65 °C. Po teplotním ustálení (10 minut) při laboratorní teplotě následovala analýza na GC-MS/MS v módu SIM.

4.10.2 Postup přípravy standardů za účelem kalibrace retenčních časů

Postup přípravy standardu 4-kyanofenolu a *p*-nitrosfenolu

Do 2ml vialek byly vloženy 0,4ml inserty, do nichž bylo převedeno zhruba čtvrt mikrolžičky sypkého 4-kyanofenolu a *p*-nitrosfenolu. Následovala jednostupňová derivatizace odpipetováním 200 μ l BSTFA při 65 °C po dobu 30 minut. Po teplotním ustálení (10 minut) při laboratorní teplotě následovala analýza na GC-MS/MS v módu MRM.

Postup přípravy uměle nitrovaného piva k analýze na GC-MS/MS

Byl použit vzorek uměle nitrovaného piva, připravený v rámci výzkumu Malečková et al. 2021. Další postup přípravy vzorku byl analogický s postupem uvedeným v **Kapitole 4.9.2.**

4.11 Podmínky analýzy na GC-MS/MS

Analýza na GC-MS/MS, pokud není uvedeno jinak, probíhala v módu MRM. Nástřik probíhal technikou split (6:1), při teplotě 210 °C a jeho objem činil 2 µl. Teplotní program během analýzy byl následující: 50 °C (1,5 minuty) - 20 °C/minutu - 150 °C (5 min) - 10 °C/minutu - 210 °C (3 minuty) - 10 °C/minutu - 320 °C (5 minuty). Konstantní rychlost průtoku mobilní fáze během analýzy činila 6 ml/minutu. Oplach septa byl 3 ml/minutu. Chromatografická stříkačka byla promývána hexanem a acetonitrilem. Průtok dusíku v kolizní cele činil 1,5 ml/minutu. Teplota iontového zdroje byla 230 °C a teplota na kvadrupólech 150 °C. Celková doba analýzy byla 36,5 minuty.

4.12 Zkoumané analyty

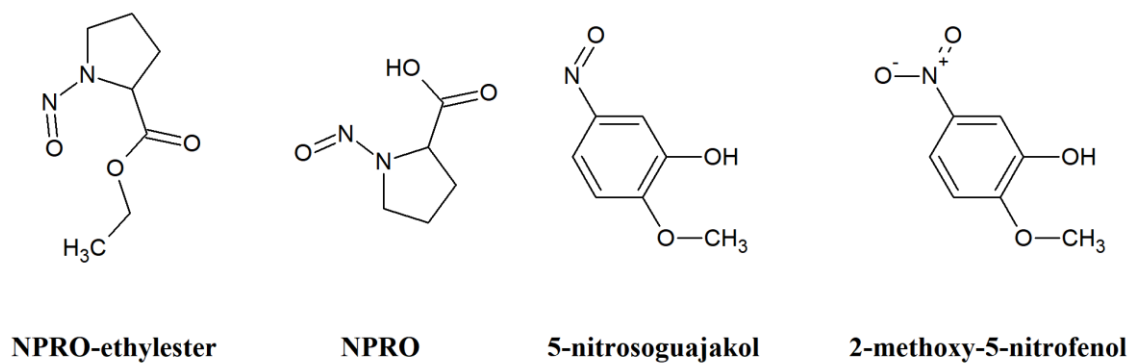
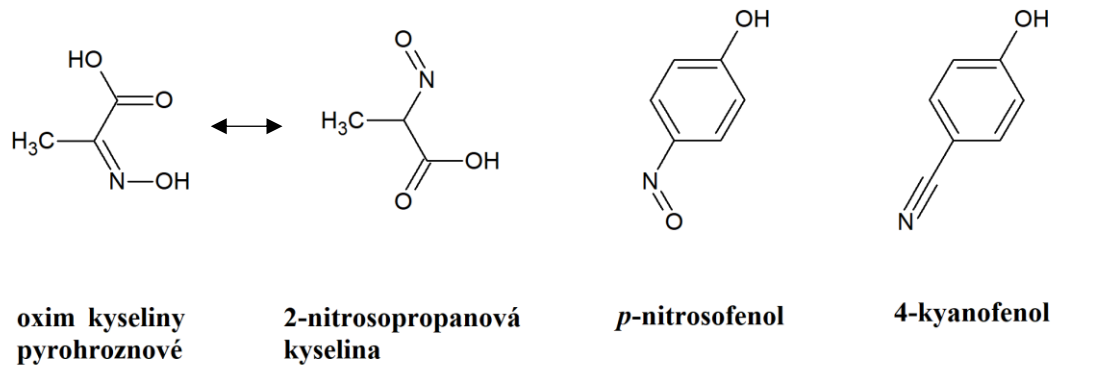
Analyty, které jsou předmětem této diplomové práce, jsou zobrazeny v **Tab. 8**, společně s jejich RT, prekurzorovými/produktovými ionty a případnými informacemi o jejich prekurzorech a pravděpodobných strukturách. Analyty byly změřeny jako silylované (TMS) molekuly, nicméně struktury jsou zobrazeny jako nesilylované (viz **Obr. 11**). Hmotnostní spektra strukturně charakterizovaných analytů jsou uvedena v **Příloze V**. Pravděpodobné analyty (viz **Obr. 12**) a struktury prekurzorů (viz **Obr. 13**) jsou rovněž uvedeny.

Tab. 8: Sledované analyty, jejich RT, MRM přechody a CE

<i>pořadí</i>	<i>analyt</i>	<i>RT</i> <i>(minuty)</i>	<i>prekurzorový</i> <i>ion (m/z)</i>	<i>produktový</i> <i>ion (m/z)</i>	<i>CE</i> <i>(eV)</i>	<i>poznámka</i>
1.	unk 1	8,6	168	94	15	-
2.	oxim kyseliny pyrohroznové	8,9	204	131	25	tautomer 2- nitrosopropanové kyseliny
3.	<i>p</i> -nitrosofenol	12,5	195	180	5	-
4.	4-kyanofenol	13,3	191	176	10	prekurzor tyrosin
5.	unk 2	13,5	212	168	5	-
6.	NPRO- ethylester	13,7	172	99	10	prekurzor prolin
7.	NPRO	14,7	201	157	5	prekurzor prolin
8.	unk 3	15,6	200	156	5	NPIC/N- nitrosopyroglutamová kyselina
9.	5- nitrosogajakol	17,0	225	210	10	prekurzor kyselina vanilová, guajakol
10.	unk 4	17,4	224	150	15	prekurzor kyselina benzoová
11.	IS (DL- fenylalanin-1- ¹³ C)	17,73	295	205	10	-
12.	unk 5	17,7	218	203	10	-
13.	2-methoxy-5- nitrofenol	18,2	226	211	10	prekurzor kyselina vanilová
14.	unk 6	20,5	306	191	15	prekurzor tyrosin
15.	unk 7	22,1	312	179	30	-
16.	unk 8	21,3	254	223	15	-
17.	unk 9	22,2	398	206	5	-
18.	unk 10	22,6	337	332	10	-
19.	unk 11	23,0	271	137	25	-
20.	unk 12	23,2	326	236	10	prekurzor tyrosin
21.	unk 13	24,6	342	223	25	prekurzor tyrosin
22.	unk 14	25,9	413	236	15	prekurzor tyrosin
23.	unk 15	26,2	338	219	25	prekurzor tyrosin
24.	unk 16	26,4	338	219	25	prekurzor tyrosin

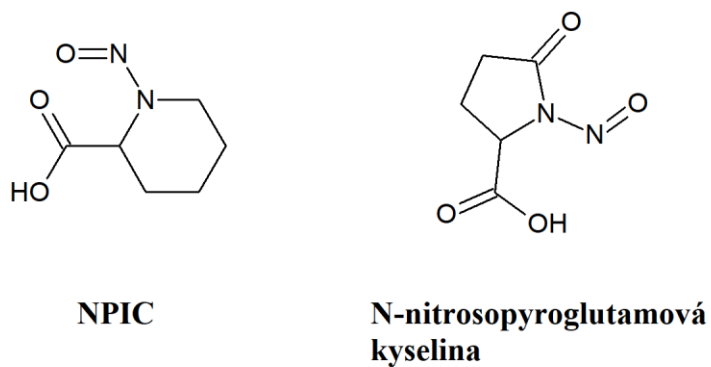
poznámka: unk = neznámý analyt (z angl. unknown)

Zdroj: upraveno podle Malečková et al. 2021



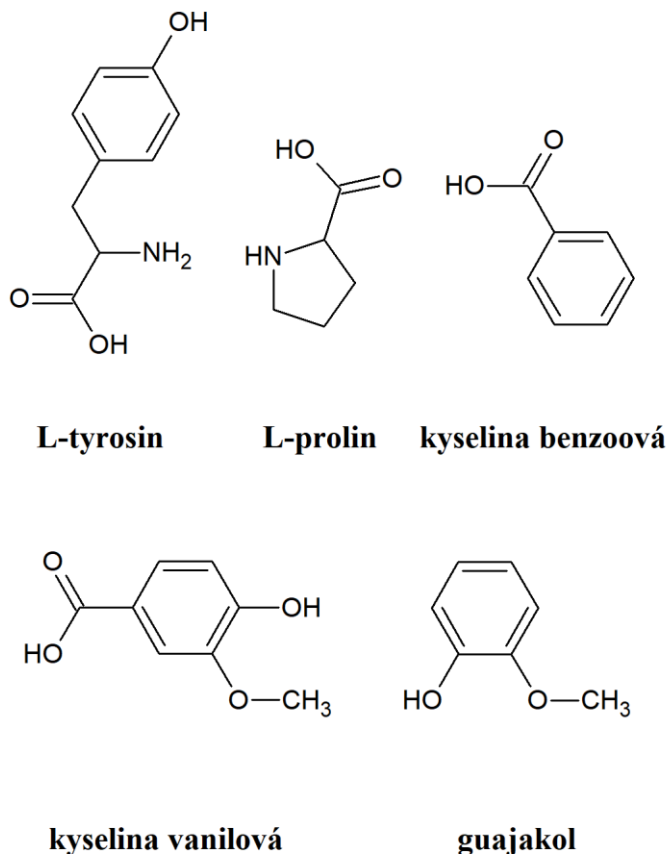
Obr. 11: Struktury sledovaných analytů

Zdroj: PubChem.gov



Obr. 12: Pravděpodobné analyty

Zdroj: PubChem.gov



Obr. 13: Struktury prekurzorů

Zdroj: PubChem.gov

4.13 Analýza získaných dat

Daty určenými ke zpracování byly plochy chromatografických píků, případně hodnoty koncentrací (NDMA). K integraci chromatografických píků a k dalšímu zpracování chromatogramů byl použit software Agilent MassHunter Quantitative Analysis (forQQQ), případně Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00. U dat byla v průběhu analýz průběžně kontrolována linearita pomocí Q-Q grafů. Data byla zpracována zejména vícerozměrnými chemometrickými metodami, shlukovou analýzou a analýzou hlavních komponent (PCA).

Data pro zpracování shlukové analýzy a PCA byla upravena následujícím způsobem. Analyty, u kterých nebyla zaznamenána odezva ve všech případech, byly ze souboru dat odstraněny. Jedná se o analyty NPRO-ethylester, unk 14 a unk 15. Ze souboru dat byly rovněž odstraněny i data z některých chromatogramů. Konkrétně se jedná o všechny chromatogramy nitrosovaných sladů (37015, 37015N, 37015NS). Tyto chromatogramy byly odstraněny z důvodu, že pochází z experimentálních sladů a výrazně by zkreslily výsledky u komerčně dostupných sladů, kterých je naprostá většina. Dále byly odstraněny hodnoty chromatogramu 60664_1A, který byl chybně zanalyzován z důvodu výměny kolony. Ostatní data byla zlogaritmována dekadickým logaritmem. V dalším kroku byly odezvy analytů

standardizovány na navážku*, tedy na 1 g vzorku. Následovalo zpracování dat shlukovou analýzou a PCA. Odezvy analytů pro zpracování shlukové analýzy a PCA byly přepočítány na z-skóre**. Pro PCA byl soubor dat dále redukována o odlehlé hodnoty. Tedy o všechny chromatogramy karamelových sladů, nesladovaných ječmenů, barvicích sladů a sladového květu s cílem lépe zobrazit hlavní seskupení chromatogramů, kterých byla většina.

$$\text{standardizace na navážku vzorku}^* = \frac{\text{odezva analytu}}{\text{navážka vzorku}} + 1$$

$$z - \text{skóre}^{**} = \frac{\text{hodnota znaku} - \text{průměrná hodnota znaku}}{\text{směrodatná odchylka}}$$

Analytické odezvy u uměle nitrosovaných sladů jsou graficky znázorněny na *Obr. 14*. Data pro tento graf nebyla zlogaritmována a standardizována na navážku, ale byla z jednotlivých měření zprůměrována prostým aritmetickým průměrem, přičemž chybějící (nezaznamenané) hodnoty nebyly nahrazeny nulou. Na osu Y bylo aplikováno logaritmické měřítko. Za účelem porovnání koncentrací NDMA u jednotlivých druhů sladů byly použity hodnoty koncentrací NDMA (µg/kg) získané z databáze VÚPS. Hodnota koncentrace pro každý vzorek byla použita čtyřikrát, jelikož v případě screeningu byl každý vzorek analyzován rovněž čtyřikrát. Hodnoty NDMA pod mezí detekce (<0,2 µg/kg) byly nahrazeny hodnotou 0,1 µg/kg. Za účelem tvorby histogramů (viz *Obr. 28*) byla data zlogaritmována dekadickým logaritmem. V případě *Obr. 29*, byla použita data bez aplikace dekadického logaritmu a seřazená od nejnižší po nejvyšší hodnotu. Chybějící data byla odstraněna. Pro vytvoření grafu znázorňující NPRO u jednotlivých druhů sladů (viz *Obr. 30*) byly ze souboru dat odstraněny hodnoty NPRO u všech chromatogramů plzeňského sladů s kódem 37015 a dále chybně zanalyzovaný chromatogram 60664_1A. Ostatní data byla zlogaritmována dekadickým logaritmem a chybějící hodnoty byly nahrazeny nulou. V dalším kroku byly odezvy analytů standardizovány na navážku*, tedy na 1 g vzorku stejně jako v případě vícerozměrných chemometrických metod. Jednotlivé hodnoty byly také vzestupně seřazeny.

Ke statistickému zpracování byl využit následující software:

- *programovací jazyk R:*

RStudio:

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

Raivo Kolde (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

Sebastien Le, Julie Josse, Francois Husson (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software, 25(1), 1-18. 10.18637/jss.v025.i01

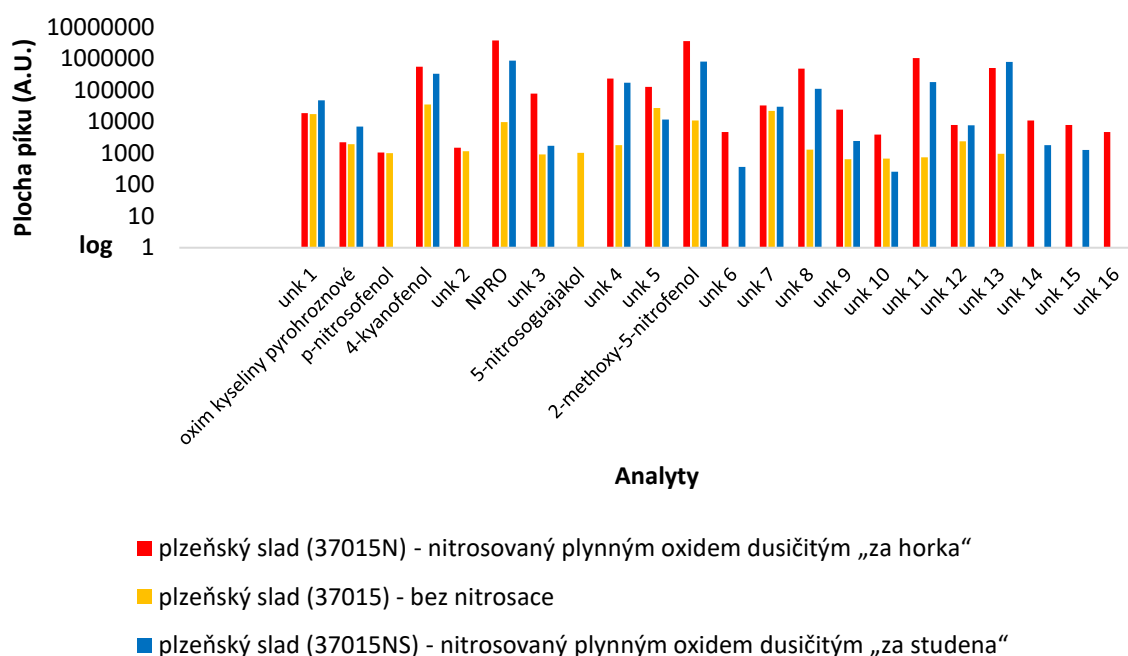
Alboukadel Kassambara and Fabian Mundt (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>

- *Statistica 12 (StatSoft)*

5 Výsledky

5.1 Slady uměle nitrosované

Obr. 14 demonstruje, že zde studované látky mohou vznikat i ve sladové matici. U většiny analytů byla zaznamenána vyšší analytická odezva právě u sladů, které byly nitrosovány oxidem dusičitým, oproti sladu, který nitrosován nebyl. Každý sloupec představuje průměrné plochy chromatografických píků u jednotlivých měření konkrétního vzorku. Z důvodu přehlednosti grafu byla data zlogaritmována. U surových dat byly rozdíly extrémní v rámci několika řádů. Lze to uvést na příkladu NPRO, u kterého byl tento rozdíl nejznatelnější. Slad nitrosovaný „za horka“ dosahoval hodnoty 3792814 A.U., slad nitrosovaný „za studena“ dosahoval hodnoty 870185 A.U. a slad nenitrosovaný 9740 A.U.

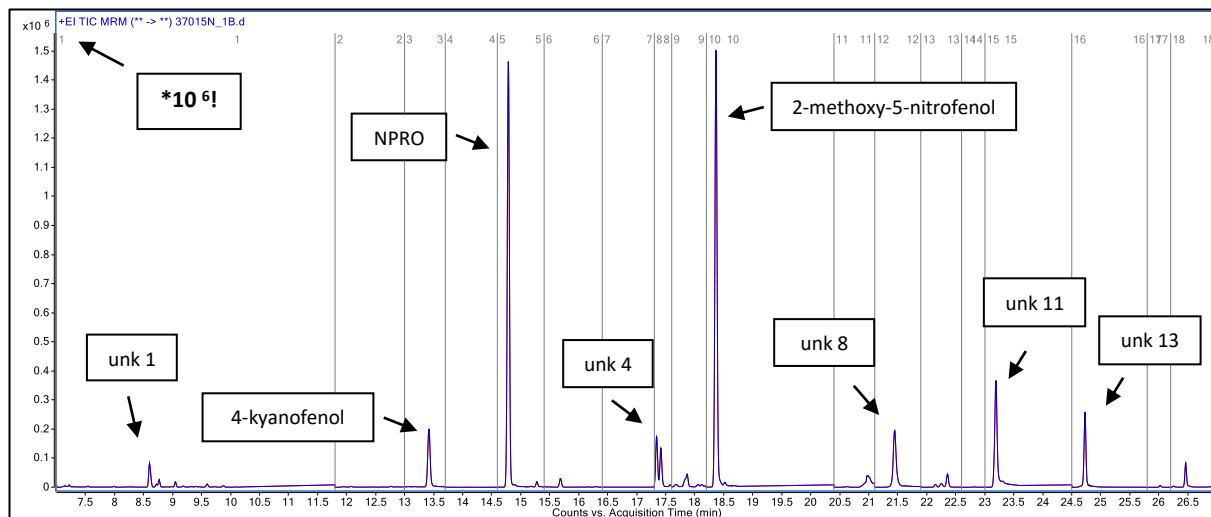


Obr. 14: Porovnání ploch píků u plzeňského sladu a jeho uměle nitrosovaných analogů

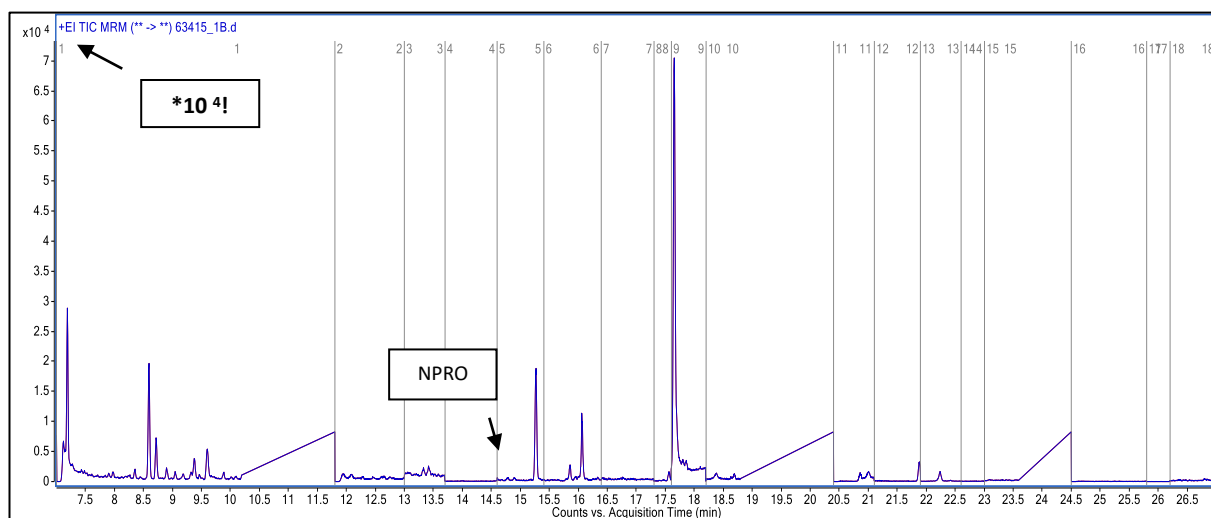
Jedinými analyty, u kterých byla zaznamenána vyšší analytická odezva u nenitrosovaného sladu než u nitrosovaného analogu, byly unk 5, unk 10 a 5-nitrosogvajakol, který byl také jako jediný detekován pouze u sladu nenitrosovaného. Naopak u analytů unk 6, unk 14, unk 15 a unk 16 byla analytická odezva zaznamenána pouze u sladů nitrosovaných. U *p*-nitrosafenolu a unk 2 se zdála být nitrosace „za studena“ neúčinná. Při celkovém pohledu se nitrosace „za horka“ jevila jako účinnější než nitrosace „za studena“.

Je třeba si uvědomit, že slad bez nitrosace prošel stejným experimentálním procesem jako slad nitrosovaný „za studena“, až na vystavení účinku oxidu dusičitého (viz **Kapitola 4.7**). Nelze ho tak považovat za komerčně dostupný slad. Rozdíly mezi sladem nitrosovaným a běžným komerčně dostupným plzeňským sladem ilustrují MRM chromatogramy uvedené na **Obr. 15** a **Obr. 16**. Pro porozumění rozdílů mezi nimi je nutné porovnat měřítka na ose Y,

kteřá vypovídají o vysokých rozdílech v analytických odezvách potažmo koncentracích. Na **Obr. 16** nejsou některé sledované analyty bez přiblížení zjevné a nejsou tak ani popsány. Některé píky naopak zřetelné jsou, přičemž se ale nemusí jednat o sledované analyty. Pro demonstraci účinku umělé nitrosace je označen NPRO.



Obr. 15: MRM chromatogram uměle nitrosovaného plzeňského sladu „za horka“ (37015N)



Obr. 16: MRM chromatogram komerčně dostupného plzeňského sladu (63415)

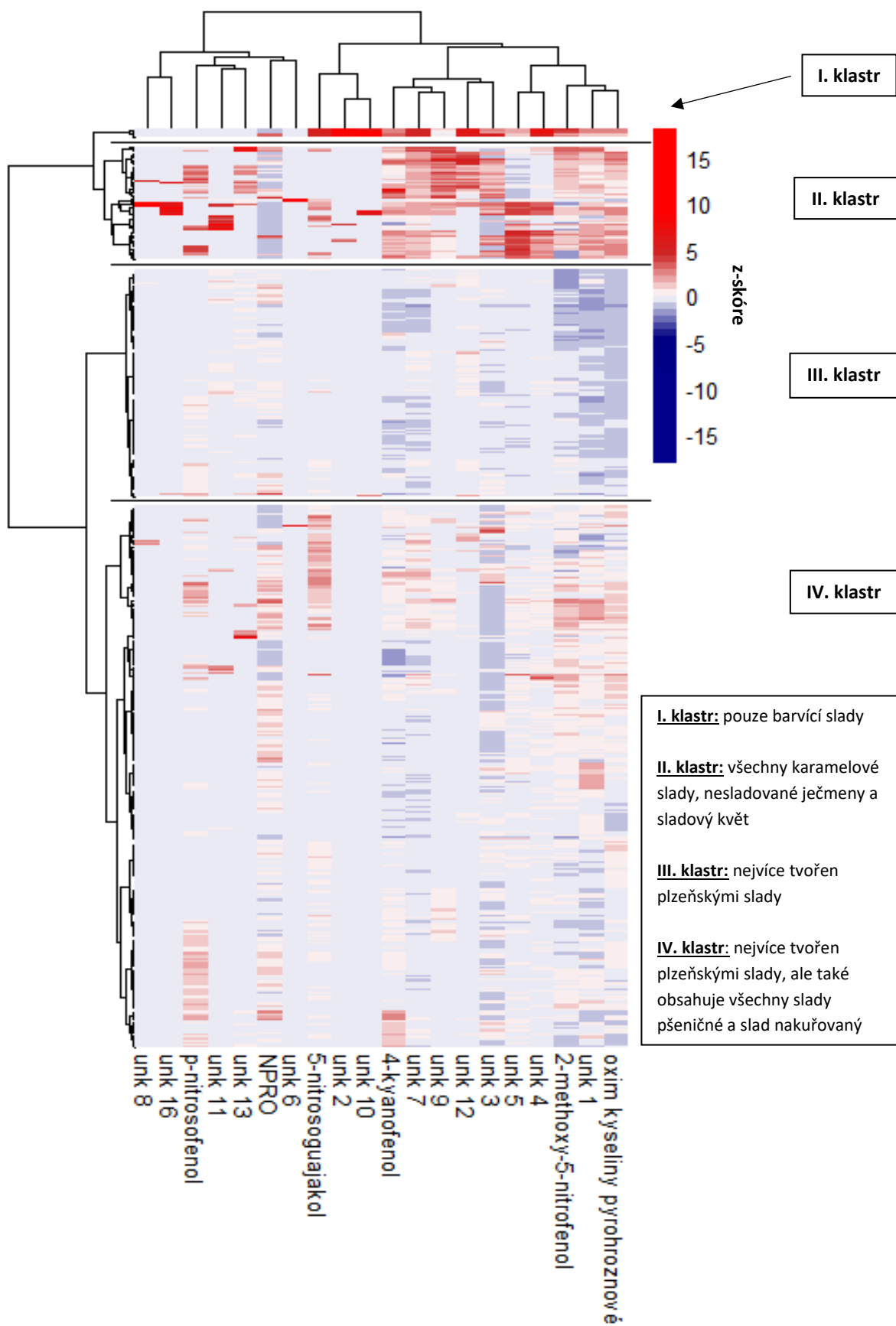
5.2 Screening komerčně dostupných sladů

5.2.1 Shluková analýza

Jedním z nevýznamnějších výstupů této práce je zpracování získaných dat shlukovou analýzou. Její grafické zpracování je uvedeno ve formě teplotních map. Metodika zpracování dat je uvedena v **Kapitole 4.13**. Teplotní mapy zobrazují odezvy analytů formou z-skóre.

Červené odstíny představují vyšší (+) než průměrné z-skóre, tedy vyšší než průměrnou analytickou odezvu, potažmo koncentraci. Modré odstíny vyjadřují opak, tedy nižší (-) než průměrnou hodnotu z-skóre, či analytické odezvy, potažmo koncentrace. Světle modré a bezbarvé úseky odpovídající hodnotě z-skóre kolem 0 pak představují nulovou analytickou odezvu, tedy nezaznamenaný pík příslušného analytu.

Teplotní mapa uvedena na **Obr. 17** mezi sebou porovnává jednotlivé vzorky. Vzorky, jsou vyneseny na pomyslné vertikální ose, zatímco analyty na ose horizontální. Vzorky byly na základě shlukové analýzy rozděleny do čtyř hlavních klastrů, ve kterých si byly vzorky navzájem podobné, přičemž jednotlivé klastry mezi sebou byly odlišné. Popis jednotlivých vzorků, nebyl kvůli jejich vysokému počtu (787) možný a je tak sumarizován v rámci jednotlivých klastrů (viz **Tab. 9**).



Obr. 17: Teplotní mapa porovnávající jednotlivé vzorky

Tab. 9: Zastoupení jednotlivých vzorků (v chromatogramech) v rámci Obr. 17

	I. klastr	II. klastr	III. klastr	IV. klastr	celkem
velikost	8/787 (1,02 %)	89/787 (11,31 %)	234/787 (29,73 %)	456/787 (57,94 %)	787/787 (100 %)
klastru					
plzeňský slad	0/391 (0 %)	6/391 (1,53 %)	147/391 (37,6 %)	238/391 (60,87 %)	391/787 (49,68 %)
neznámý	0/184 (0 %)	19/184 (10,33 %)	65/184 (35,33 %)	100/184 (54,35 %)	184/787 (23,38 %)
mnichovský	0/112 (0 %)	0/112 (0 %)	22/112 (19,64 %)	90/112 (80,36 %)	112/787 (14,23 %)
slad					
karamelový	0/36 (0 %)	36/36 (100 %)	0/36 (0 %)	0/36 (0 %)	36/787 (14,23 %)
slad					
pšeničný slad	0/24 (0 %)	0/24 (0 %)	0/24 (0 %)	24/24 (100 %)	24/787 (3,05 %)
nesladovaný	0/24 (0 %)	24/24 (100 %)	0/24 (0 %)	0/24 (0 %)	24/787 (3,05 %)
ječmen					
barvicí slad	8/8 (100 %)	0/8 (0 %)	0/8 (0 %)	0/8 (0 %)	8/787 (1,02 %)
nakuřovaný	0/4 (0 %)	0/4 (0 %)	0/4 (0 %)	4/4 (100 %)	4/787 (0,51 %)
slad					
sladový květ	0/4 (0 %)	4/4 (100 %)	0/4 (0 %)	0/4 (0 %)	4/787 (0,51 %)

První klastř obsahoval pouze barvicí slady. Vyšší analytická odezva než u průměru byla zaznamenána ve všech případech u 5-nitrosogujakolu, unk 2, unk 10, 4-kyanofenolu, unk 9, unk 7, unk 12, unk 3, unk 5, unk 4, 2-methoxy-5-nitrofenolu, unk 1 a oximu kyseliny pyrohroznové.

Druhý klastř pak zahrnoval všechny vzorky nesladovaných ječmenů, karamelových sladů a sladových květů. Nesladované ječmeny obsahovaly v nadprůměrných odezvách analyty: oxim kyseliny pyrohroznové, unk 1, 2-methoxy-5-nitrofenol, unk 3, unk 12, unk 7 a 4-kyanofenol. Většina karamelových sladů pak vykazovala vyšší analytické odezvy u oximu kyseliny pyrohroznové, analytu unk 1, 2-methoxy-5-nitrofenolu, analytů unk 4, unk 5, unk 3, unk 9, unk 7 a 4-kyanofenolu. Méně často, zato intenzivněji, u analytů unk 10, 5-nitrosogujakolu, *p*-nitrosofenolu, unk 16 a unk 8. Sladový květ se vyznačoval vyššími než průměrnými analytickými odezvami u analytů unk 13, NPRO, 4-kyanofenolu, unk 7, unk 9, unk 4, 2-methoxy-5-nitrofenolu a unk 1.

Třetí klastř byl tvořen pouze slady plzeňskými, slady neznámými a slady mnichovskými. Tento klastř obsahoval vzorky s nejnižšími analytickými odezvami. Nejvyšších analytických odezev dosahovaly v tomto klastřu slady plzeňské. Konkrétně vzorek 64509 u analytu unk 12, 64455 u analytů unk 9 a NPRO a 64346 u analytů unk 8 a unk 11. To by bylo možné vysvětlit tím, že plzeňské slady byly nejhojněji zastoupené a tudíž zde existovala vyšší pravděpodobnost výskytu extrémů. U mnichovských sladů bylo lehce vyšší než průměrné *z*-skóre zaznamenáno pouze v případě vzorku 62693 u *p*-nitrosofenolu. Slady neznámé vykazovaly zvýšenou analytickou odezvu pouze u vzorků 63038 a 63467 u analytu NPRO a zdá se tak, že se jednalo o slady plzeňské.

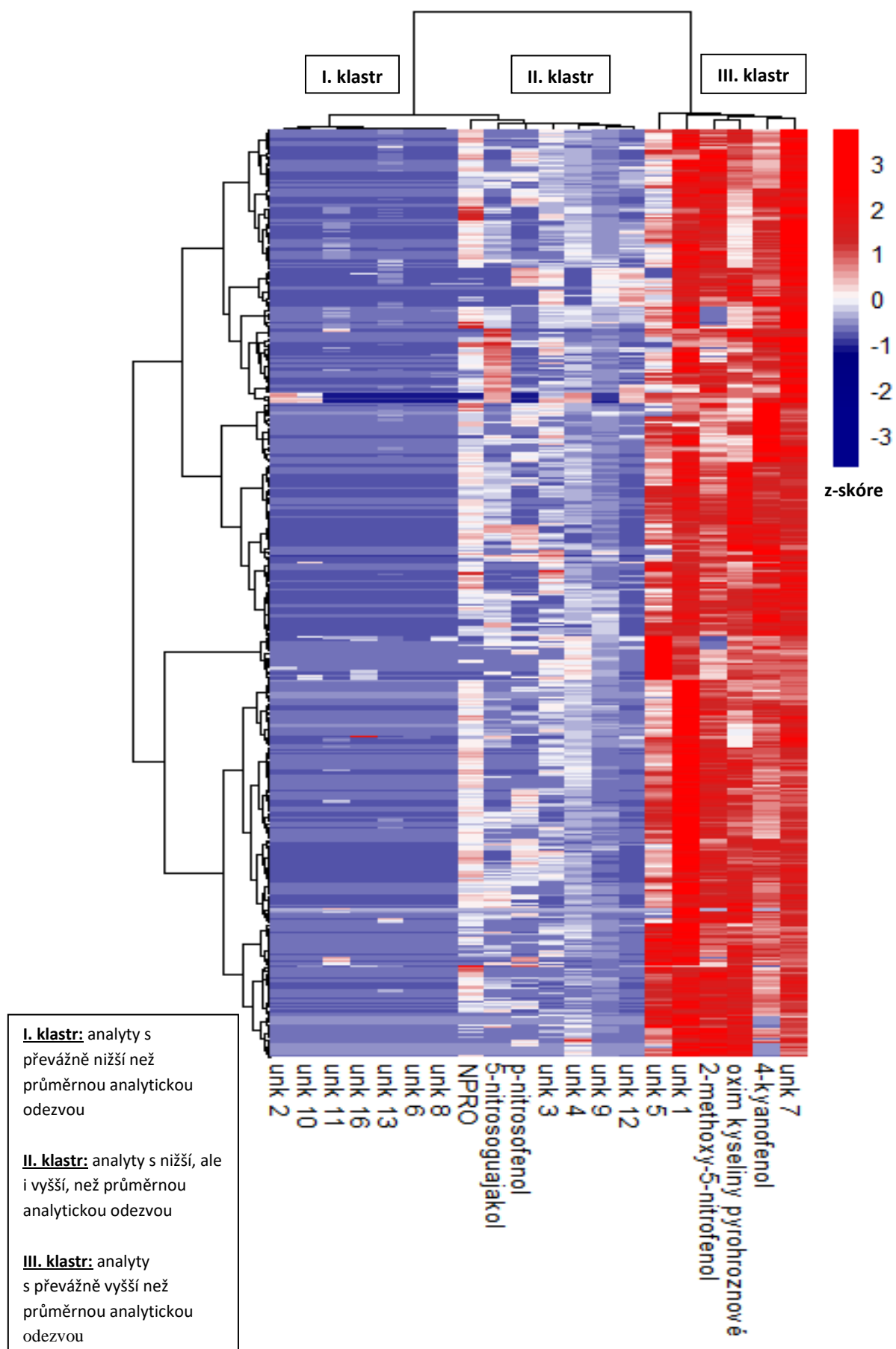
Nejvíce vzorků se shlukovalo do čtvrtého klastřu. Ten byl stejně jako třetí klastř tvořen především slady plzeňskými, neznámými a mnichovskými slady. Čtvrtý klastř ale navíc obsahoval všechny vzorky pšeničných sladů a sladu nakuřovaného. Výrazně zvýšené *z*-skóre u plzeňských sladů bylo ve čtvrtém klastřu zaznamenáno u těchto analytů: *p*-nitrosofenol, unk 1, unk 11, unk 13, NPRO a 4-kyanofenol. V případě neznámých sladů to byly analyty unk 1, *p*-nitrosofenol, NPRO, 5-nitrosogujakol a unk 11, který byl od ostatních jmenovaných analytů zaznamenán ve zdaleka nejvyšších analytických odezvách. Plzeňské slady a slady neznámé byly ve čtvrtém klastřu v porovnání s mnichovskými slady ve výrazně nižších analytických odezvách a ve výrazně nižším počtu pozorování. U mnichovských sladů dosáhly nejvyššího *z*-skóre analyty unk 17 a NPRO. Méně intenzivněji, zato ve větším počtu pozorování, byly zaznamenány analyty 5-nitrosogujakol, unk 1 a 2-methoxy-5-nitrofenol. Zvýšené *z*-skóre bylo pozorováno také u *p*-nitrosofenolu, unk 13, unk 9, unk 3, oximu kyseliny pyrohroznové a unk 8, tyto případy byly ale zaznamenány v nízkém počtu pozorování a při nižším *z*-skóre. Pro pšeničné slady se zdály být výraznými především analyty unk 4, 5-nitrosogujakol, unk 8, méně pak unk 7, unk 9, NPRO a 4-kyanofenol. V případě sladu nakuřovaného jimi byly *p*-nitrosofenol, NPRO a 4-kyanofenol.

Na základě obdobného shlukování bylo souzeno, že neznámé slady byly ve většině případů skutečně slady plzeňské, tak jak bylo určeno na základě makroskopických znaků. Nejméně zastoupeným analytem napříč všemi vzorky byl unk 6, který byl zaznamenán pouze v rámci jednoho mnichovského sladu (63907) a jednoho plzeňského sladu (64422).

Při porovnání analytických odezev sledovaných analytů s koncentracemi NDMA nebyla zaznamenána asociace. Lze to uvést na příkladu barvicích sladů, které tvořily první klastř.

Všechny barvicí slady obsahovaly vyšší analytické odezvy u sledovaných analytů (viz **Obr. 17**), nicméně koncentrace NDMA u nich byla pod mezí detekce ($<0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$). Je nutno podotknout, že byly analyzovány pouze 2 vzorky barvicích sladů, nicméně obdobný případ lze demonstrovat na druhém klastru ve kterém byly obsaženy všechny karamelové slady. Na **Obr. 17** je zřejmé vyšší z-skóre u karamelových sladů, přičemž NDMA bylo u 88,89 % (8/9) těchto sladů opět pod mezí detekce ($<0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$). Naopak vzorek mnichovského sladu (51788) s nejvyšším obsahem NDMA ($20,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) vykazoval pouze mírně vyšší z-skóre u oximu kyseliny pyrohroznové, 2-methoxy-5-nitrofenolu a 5-nitrosogujakolu. Zdá se tedy, že nelze předpokládat vysoký obsah zde studovaných analytů ve sladech s vysokým obsahem NDMA a naopak.

Teplotní mapa uvedená na **Obr. 18** mezi sebou porovnává jednotlivé analyty. Vzorky, jsou vyneseny na pomyslné vertikální ose, zatímco analyty na ose horizontální. Z této teplotní mapy vyplývá, že analyty sledované v této práci se ve sladech z hlediska analytické odezvy, potažmo koncentrace, shlukovaly do tří hlavních klastrů. Interpretace intenzit jednotlivých barevných odstínů je analogická jako v případě **Obr. 17**. Tyto výsledky naznačují, které analyty se ve sladech vyskytují ve zvýšených analytických odezvách bez ohledu na druh sladu. Poukazují tedy na analyty, kterým by měla být v dalším výzkumu věnována přednostně pozornost.



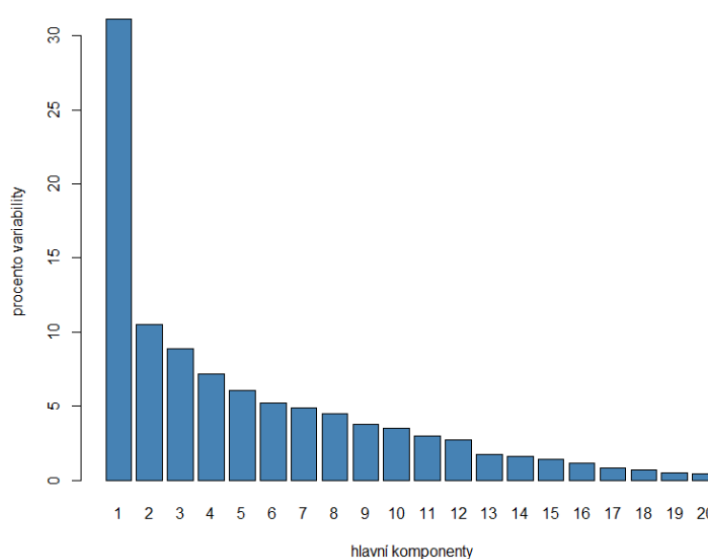
Obr. 18: Teplotní mapa porovnávající jednotlivé analyty

Do klastru s analytickou odezvou převážně nižší než průměrnou náležely analyty unk 2, unk 10, unk 11, unk 16, unk 13, unk 6 a unk 8. Průměrní klaster lze hodnotit jako jakýsi „přechodový klaster“, jelikož v celku vyrovnaně obsahoval analyty s nižší, stejnou, ale i vyšší než průměrnou analytickou odezvou. Sem patřily analyty NPRO, 5-nitrosogujakol, *p*-nitrosfenol, unk 3, unk 4, unk 9 a unk 12. Poslední klaster tvořily analyty s převážně vyšší než průměrnou analytickou odezvou, tedy analyty unk 5, unk 1, 2-methoxy-5-nitrofenol, oxim kyseliny pyrohroznové, 4-kyanofenol a unk 7.

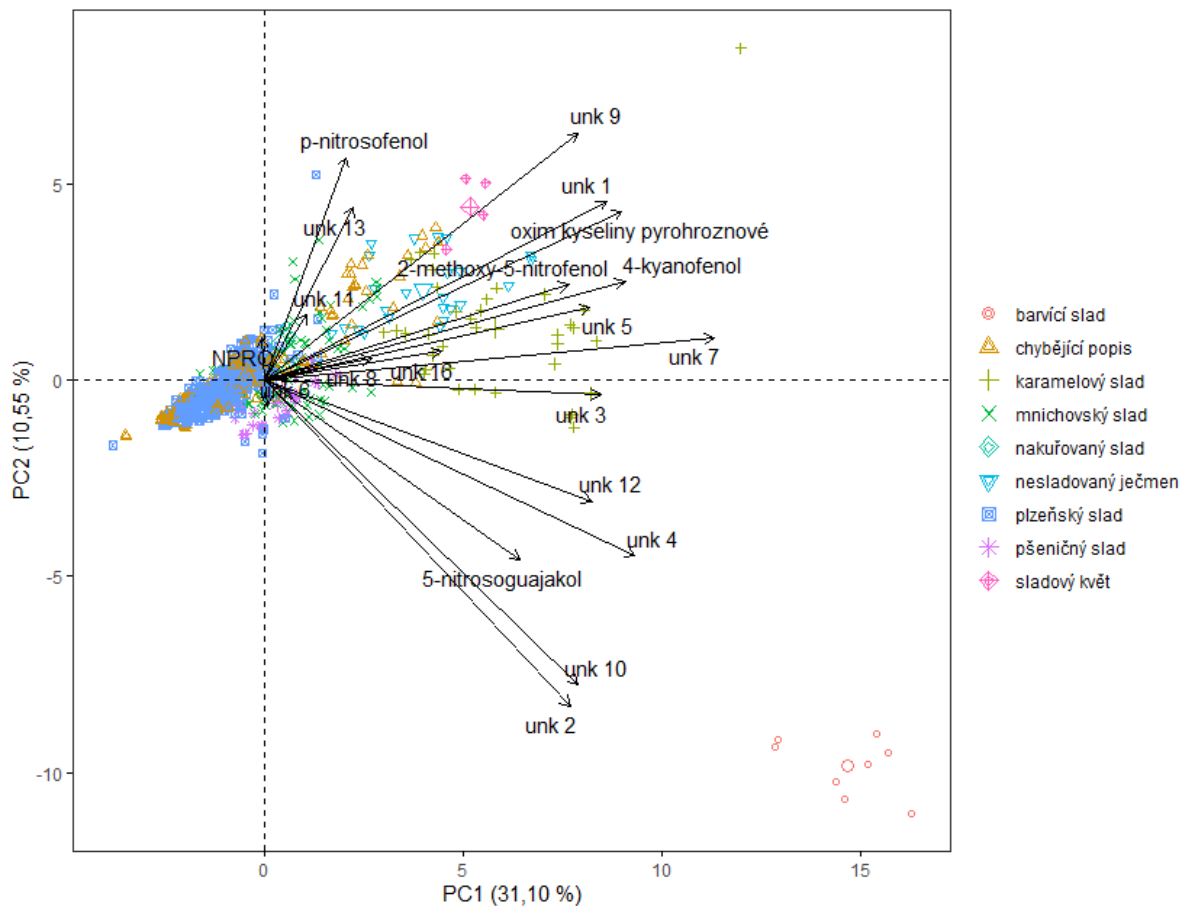
5.2.2 Analýza hlavních komponent

Jedním z nevýznamnějších výstupů této práce je dále zpracování získaných dat pomocí PCA. Metodika zpracování je uvedena v **Kapitole 4.13**, přičemž data byla normalizována pomocí z-skóre.

Na **Obr. 19** je signifikantní, že variabilita získaných dat byla vysvětlována zejména 1. komponentou. Podle Kaiserova pravidla ale byla brána v potaz 1. 2. a 3. komponenta (Ferré 1995). **Obr. 20** znázorňuje jednotlivé druhy analyzovaných matric, přičemž porovnává 1. a 2. hlavní komponentu. Variabilita dat dohromady činila 41,65 %. Z obrázku je patrné, že převážná část plzeňských sladů a neznámých sladů (chybějící popis) obsahovala nižší analytické odezvy u většiny sledovaných analytů. Při porovnání mnichovských sladů se slady plzeňskými je zřejmé, většinou obsahovaly vyšší analytické odezvy, které ale nebyly tak výrazné jako u sladů karamelových. Obecně nejvyšší odezvy dosahovaly slady barvicí. Výrazné analytické odezvy byly zaznamenány také u nesladovaných ječmenů, naopak pšeničné slady se shlukovaly obdobně jako slady plzeňské. Sladový květ původem z mnichovského sladu dosahoval vyšších odezev než většina mnichovských sladů. Proměnné směřují stejným směrem, což by mohlo nasvědčovat obdobnému základnímu principu, jakými sledované analyty vznikly.

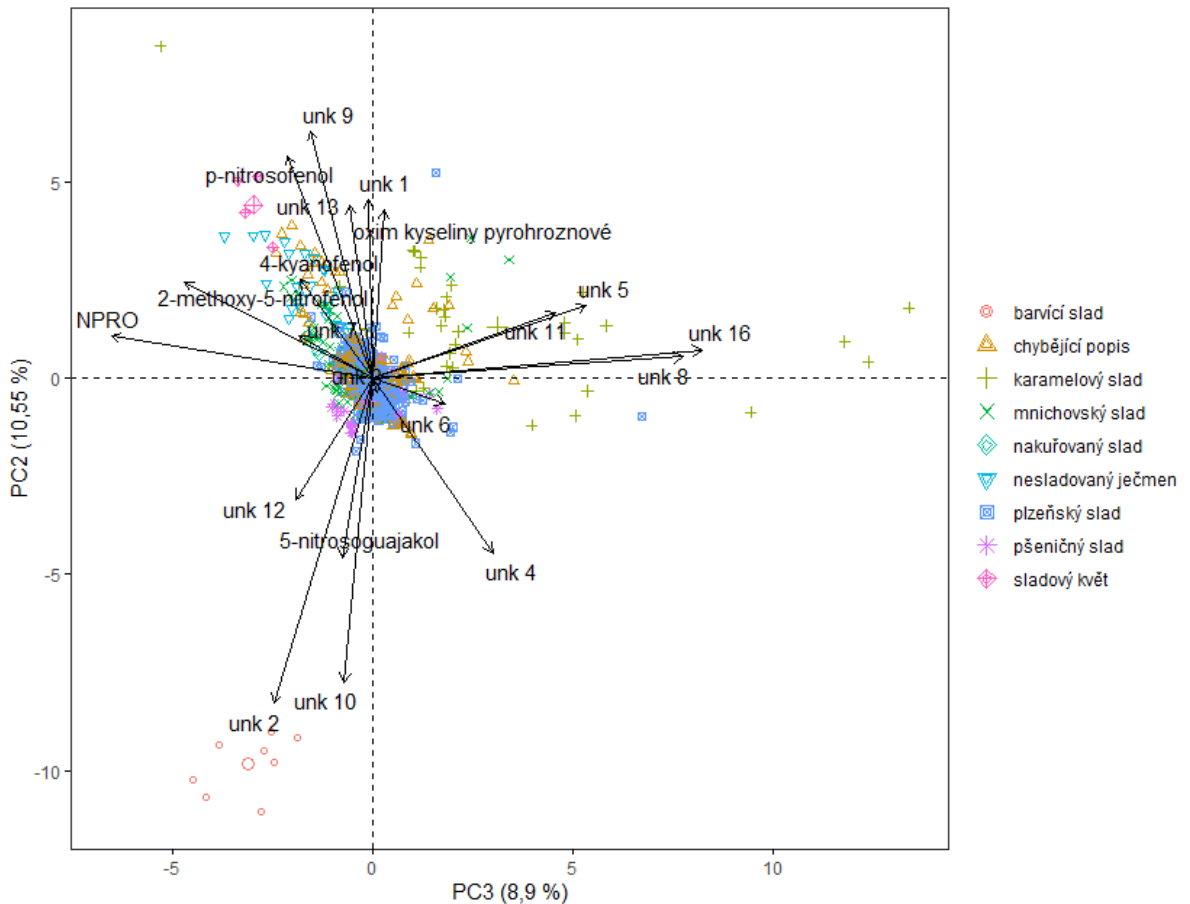


Obr. 19: Sutinový graf



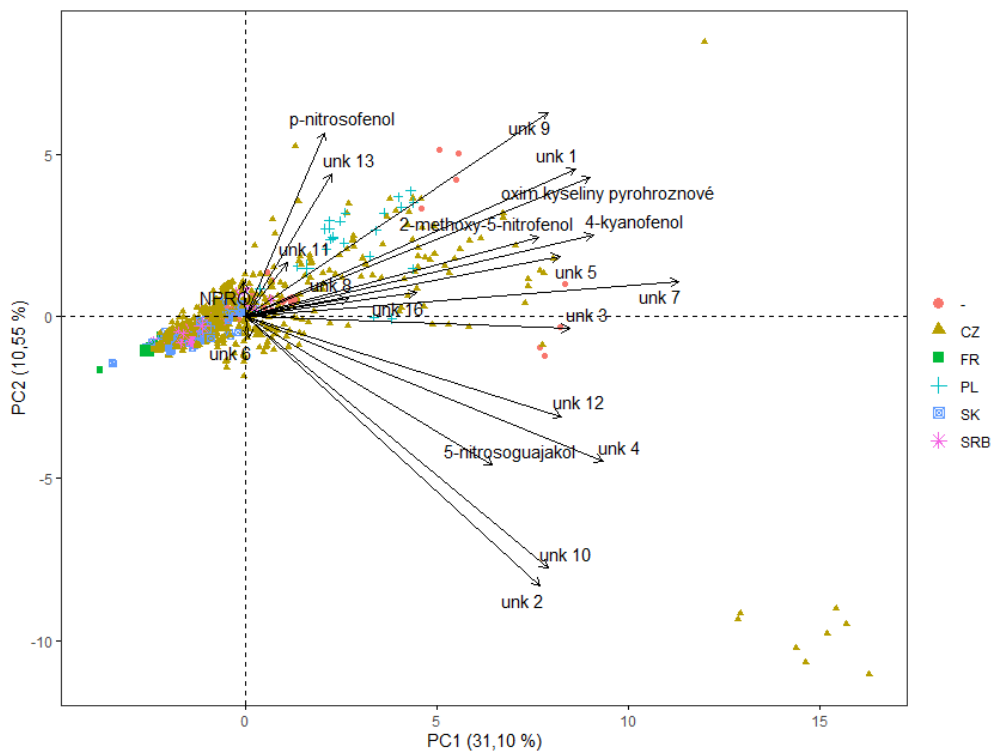
Obr. 20: PCA druhy sladů 2:1

Obr. 21 znázorňuje jednotlivé druhy analyzovaných matric, přičemž porovnává 2. a 3. hlavní komponentu. Variabilita dat se dohromady rovnala 19,45 %. Variabilita byla tedy nižší v porovnání s PCA porovnávající 1. a 2. hlavní komponentu na **Obr. 20**. Nicméně v porovnání s ním byl potvrzen trend hlavního shluku plzeňských sladů, sladů neznámých a pšeničných sladů, které se zdály být z hlediska analytických odezev spíše průměrné. Stejně tak je shodný i vyšší rozptyl sladů mnichovských, sladového květu, ale i nesladovaných ječmenů. Naopak zajímavě zde vystupovaly slady karamelové, pro které se zdály být typické analyty unk 11, unk 5, unk 8 a unk 16. Barvící slady se jako skupina nejvíce odlišovaly od průměru, o čem svědčila i poloha jejich centroidu.

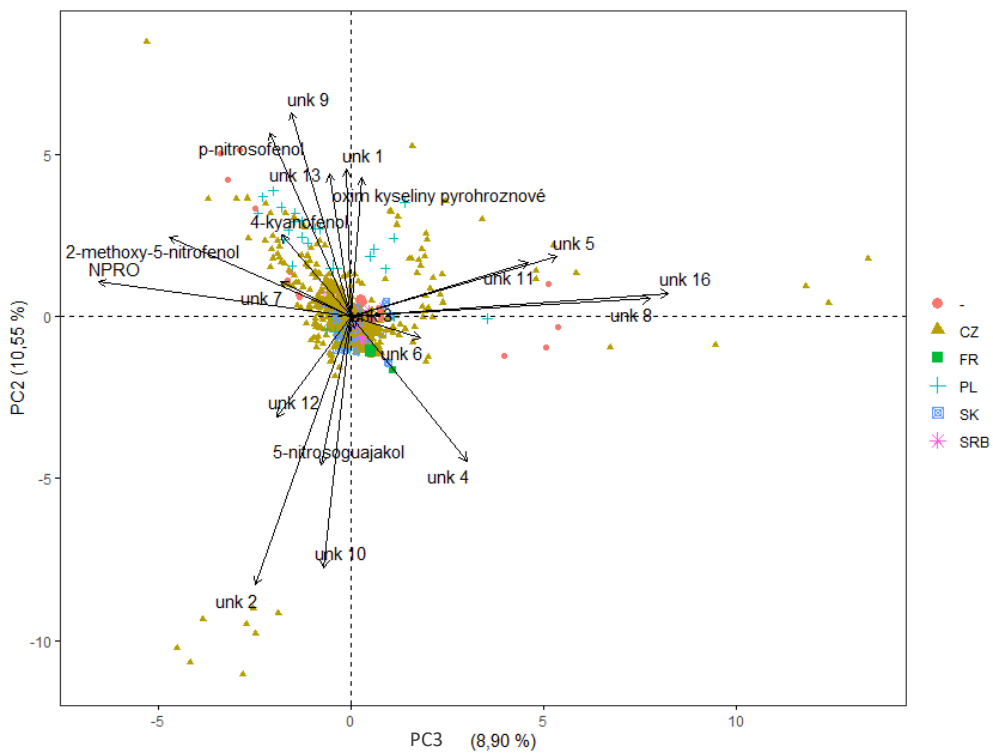


Obr. 21: PCA druhy sladů 2:3

Obr. 22 a **Obr. 23** znázorňují země původu jednotlivých druhů analyzovaných matic, přičemž **Obr. 22** porovnává 1. a 2. hlavní komponentu, zatímco. Vzhledem k nerovnoměrnému zastoupení analyzovaných matic a nerovnoměrnému zastoupení jejich původu, kdy většina matic pocházela z České republiky, nelze z těchto výsledků vyvozovat jasné závěry. Nicméně určité zajímavé trendy byly pozorovány. Na základě **Obr. 22** bylo souzeno, že nejnižších analytických odezev dosahovaly plzeňské slady původem z Francie, o čem svědčila i poloha centroidu. Toto bylo méně výrazně pozorováno také u plzeňských sladů původem ze Srbska a některých vzorků sladů původem ze Slovenska. Naopak slady s neznámým původem (-) z Polska se chovaly podobně jako neznámé slady původem z České republiky. Je možné, že se tak jednalo o stejné druhy matic. Podle polohy nejspíše o slady mnichovské.

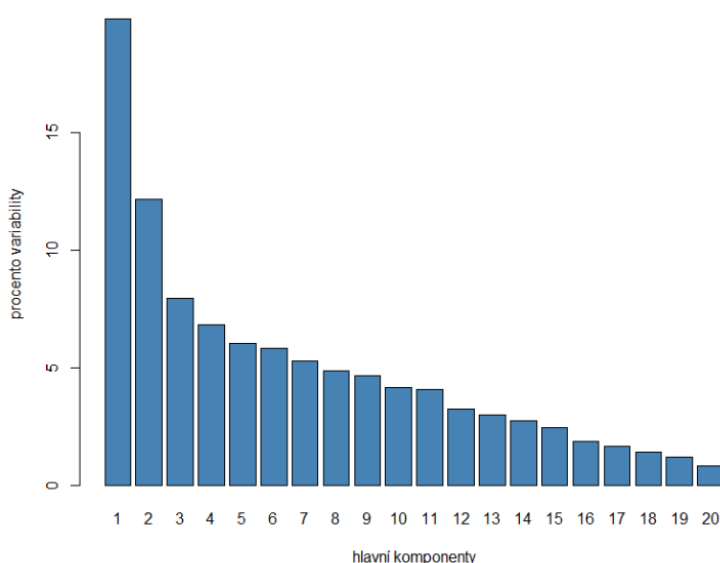


Obr. 22: PCA země původu 2:1



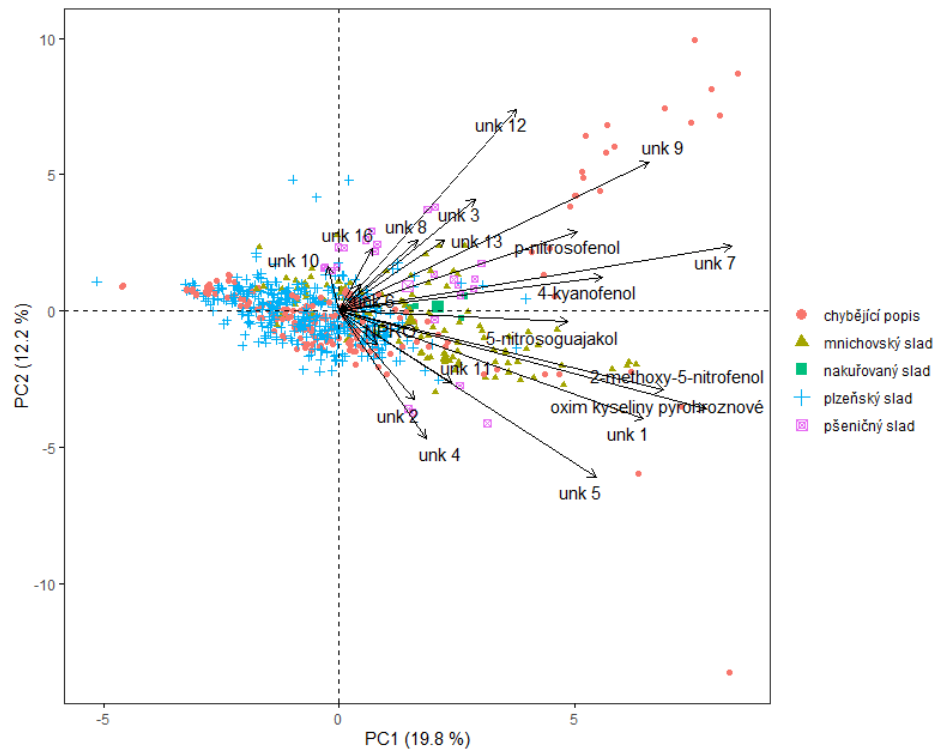
Obr. 23: PCA země původu 2:3

Následující výstupy PCA byly vytvořeny po odstranění všech vzorků karamelových a barvicích sladů, nesladovaných ječmenů a sladového květu, tedy vzorků, které představovaly odlehlé hodnoty. Cílem bylo zpřehlednit data pocházející z nejhojněji zastoupených vzorků, tedy plzeňských sladů, sladů neznámých a mnichovských sladů. Dále pak upřesnit polohu sladu nakuřovaného a pšeničných sladů, které se vyskytovaly společně s nejhojněji zastoupenými vzorky v nepřehledném středovém shluku okolo průměru. Na **Obr. 24** je zřejmé, že variabilita redukovaných dat byla vysvětlována opět především 1. komponentou, ale ne již tak významně jako před redukcí dat. Stejně tak 2. a 3. hlavní komponenta byla charakterizována nižší variabilitou. Podle Kaiserova pravidla ale byla znovu brána v potaz 1. 2. a 3. hlavní komponenta (Ferré 1995).

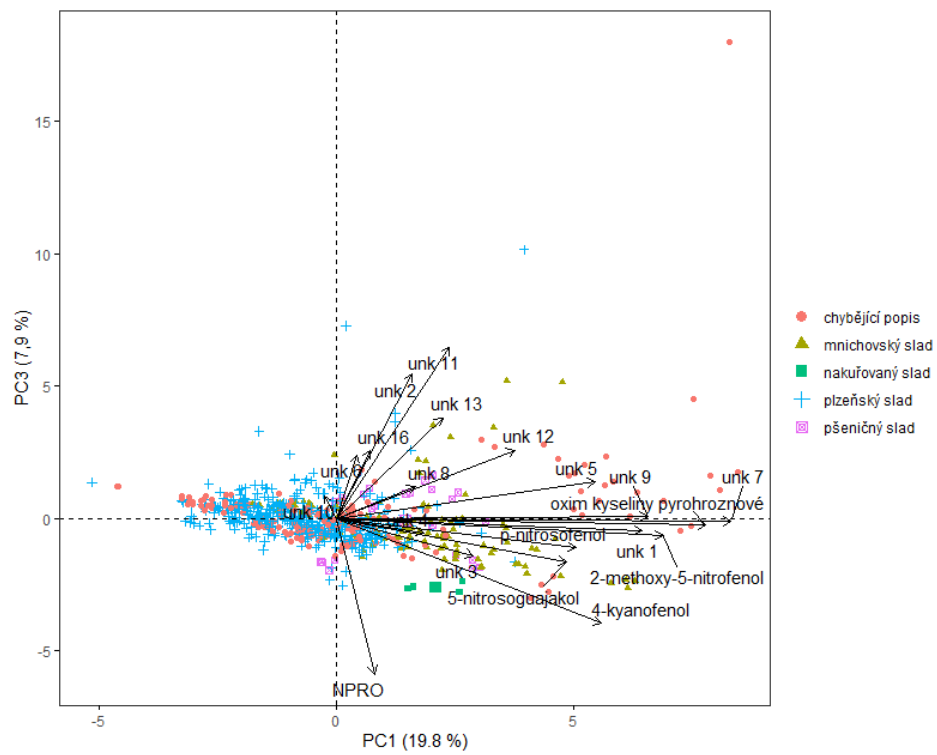


Obr. 24: Sutinový graf (redukováno)

Obr. 25 a **Obr. 26** znázorňují jednotlivé druhy analyzovaných matric, přičemž každý porovnává jiné hlavní komponenty. PCA na **Obr. 25** vykazovala vyšší variabilitu než PCA na **Obr. 26**. Na základě polohy neznámých sladů bylo zhodnoceno, že by se mohlo jednat ve většině případů skutečně o slady plzeňské, ale v menší míře také o slady mnichovské. Na těchto výstupech již byl patrný slad nakuřovaný, jehož odezvy nebyly hodnoceny jako extrémní a byly vysvětlovány především proměnnými unk 3, unk 7, 4-kyanofenolem a 5-nitrosogujakolem. Pšeničné slady se v porovnání s plzeňskými slady odchylovaly více od průměru u většiny sledovaných proměnných.

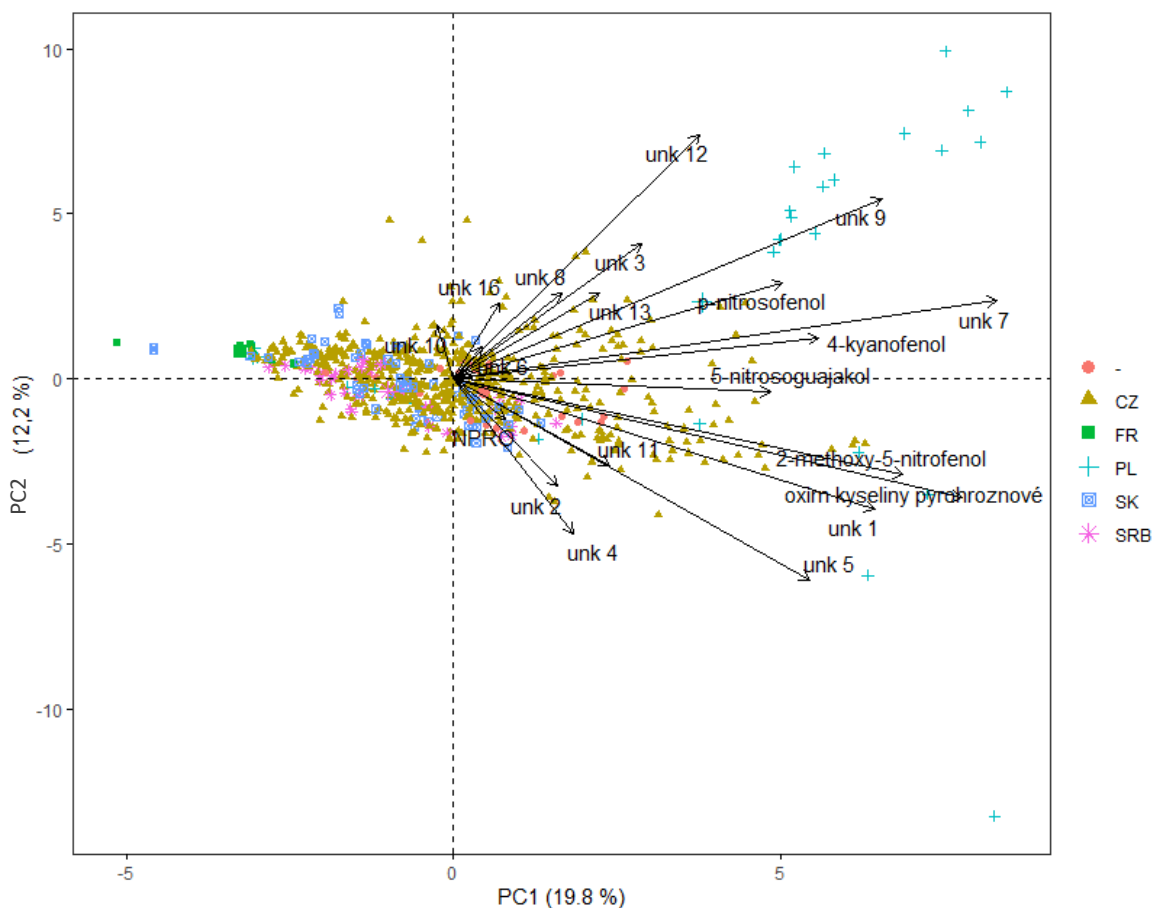


Obr. 25: PCA druhy sladů 2:1 (redukováno)



Obr. 26: PCA druhy sladů 3:1 (redukováno)

Obr. 27 uvádí země původu jednotlivých druhů analyzovaných matic a porovnává 1. a 2. hlavní komponentu. Podporuje tvrzení uvedené v kontextu **Obr. 22**. Dále bylo zjevné, že plzeňské slady původem ze Srbska měly stejně jako plzeňské slady původem ze Slovenska a České republiky odezvy náležící spíše kolem průměru.

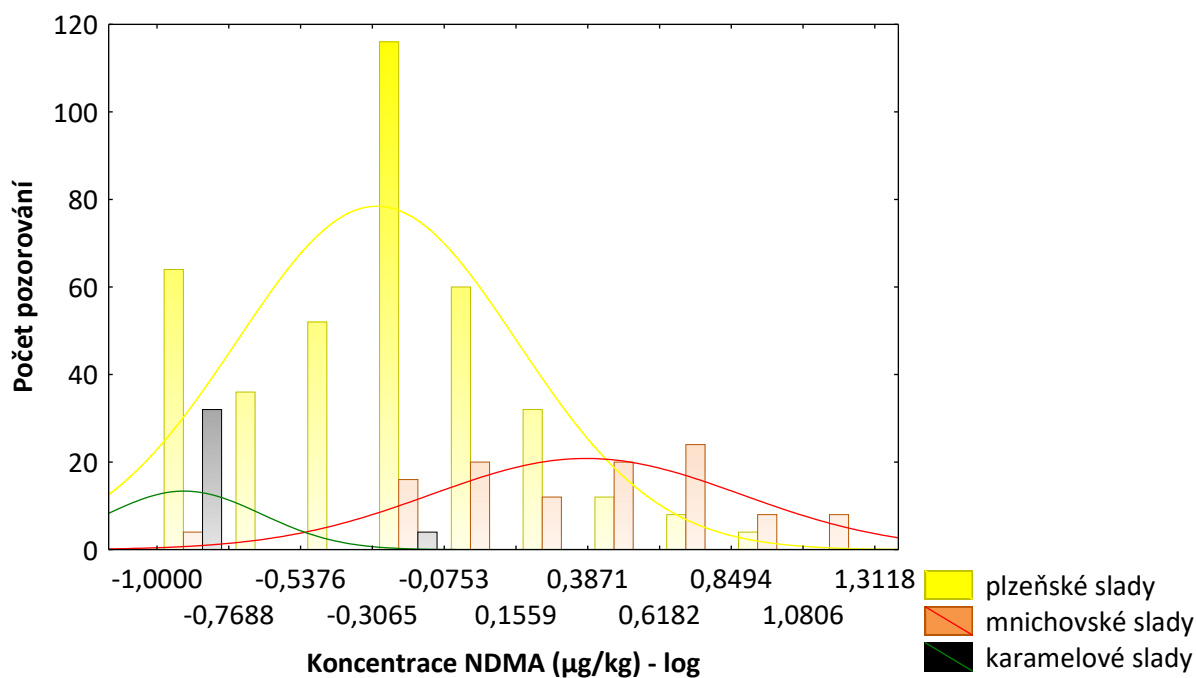


Obr. 27: PCA země původu 2:1 (redukováno)

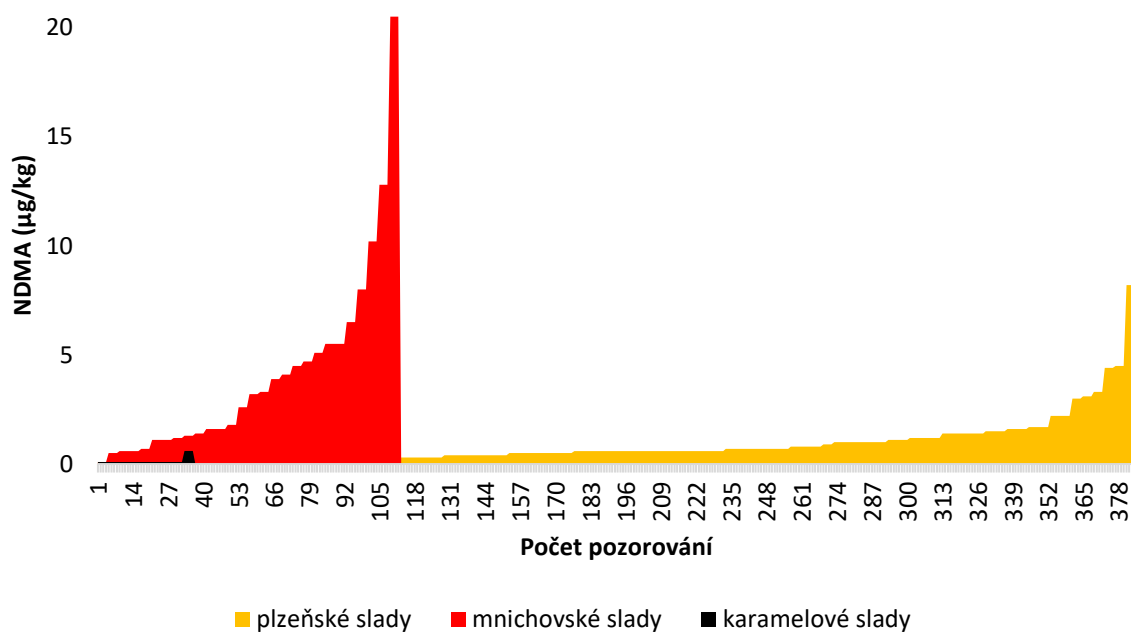
5.3 Další výsledky

Mezi dusíkaté látky vznikající interakcí nitrosačních činidel s látkami ve sladu patří také NDMA. Z tohoto důvodu bylo sledováno zda slady, které byly hvozděny při vyšších teplotách, obsahovaly vyšší koncentrace tohoto vysoce toxického N-nitrosaminu. Proto byly mezi sebou porovnány slady plzeňské, mnichovské a karamelové. Barvící a nakuřované slady nebyly kvůli nízkému počtu měření hodnoceny. Jelikož koncentrace NDMA v této práci analyzovaných sladů nevykazovala normální rozdělení, nemohly být rozdíly hodnoceny například pomocí t-testu či popisné statistiky. Z tohoto důvodu byly odlišnosti sledovány pouze graficky pomocí vícenásobného histogramu (viz **Obr. 28**). Absolutní koncentrace pak uvádí **Obr. 29**. Hodnoty koncentrace NDMA byly přesně kvantifikované a spolehlivěji tak informují o vlivu teploty na nitrosaci nežli z-skóre použité při zpracování naměřených dat vícerozměrnými chemometrickými metodami. Z **Obr. 28** a **Obr. 29** je zřejmé, že vyšší

koncentrace NDMA obsahovaly slady mnichovské než plzeňské. Přesto, že karamelové slady byly zařazeny spíše okrajově, je zajímavé, že ve většině případů dosahovaly koncentrace NDMA pod mezí detekce (<0,2 µg/kg).

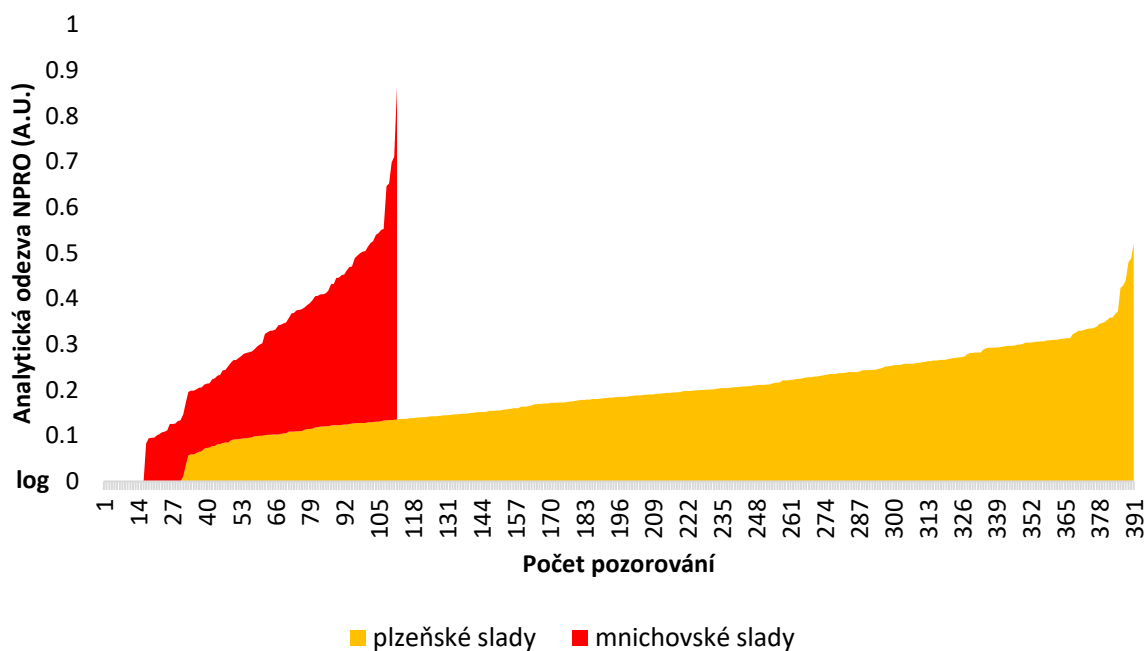


Obr. 28: Histogram koncentrací NDMA u jednotlivých druhů sladů



Obr. 29: Porovnání koncentrací NDMA v absolutních hodnotách

V případě **Obr. 30** je signifikantní, že analytická odezva potažmo koncentrace netěkavého N-nitrosaminu NPRO nebyla tak výrazně odlišná mezi plzeňskými a mnichovskými slady jako v případě NDMA (viz **Obr. 29**).



Obr. 30: NPRO u plzeňských a mnichovských sladů

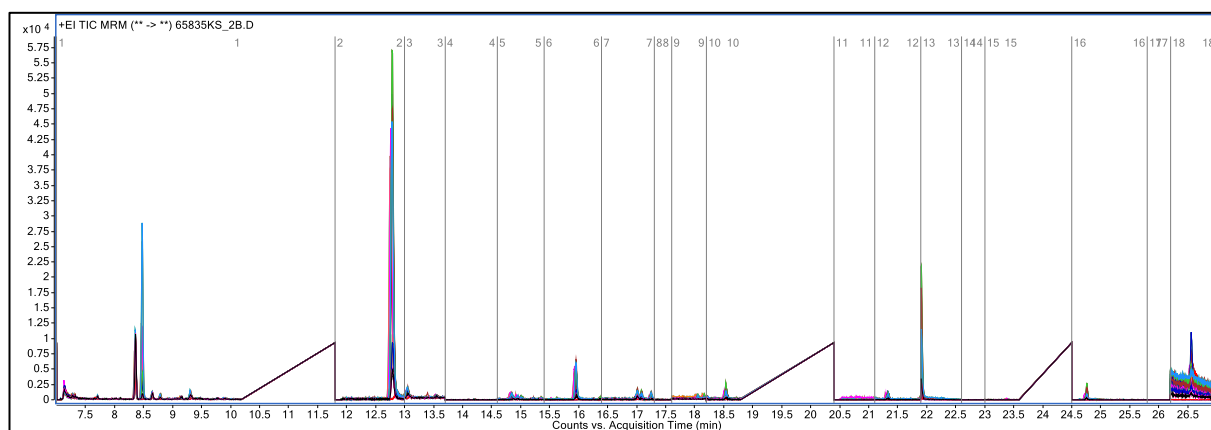
5.4 Extrakce do kongresní sladiny

Během experimentu s kongresní sladinou nastalo několik zásadních problémů, které značně zkomplikovaly jeho vyhodnocení. Všechny slady a sladiny byly připraveny stejným způsobem, který je uvedený v **Kapitole 4.8** a **Kapitole 4.9**. Před samotnou analýzou těchto vzorků na GC-MS/MS byly analyzovány vzorky ječmene, sladu a standardních látek (viz **Kapitola 4.10**). Důvodem bylo zkontrolování RT a celkové správnosti metody, jelikož došlo k výměně chromatografické kolony, na které analýzy již delší dobu neprobíhaly. V této fázi nastalo několik technických problémů, které se podařilo vyřešit až po delší časové prodlevě v rámci několika týdnů. Následovalo ověření jednotlivých chromatografických píků a tedy i jejich RT na základě porovnání jejich hmotnostních spektrech s knihovnou. Za tímto účelem byl analyzován vzorek uměle nitrosovaného piva (viz **Kapitola 4.10.2**), protože v něm byl předpokládán výskyt všech analytů ve vysokých analytických odezvách.

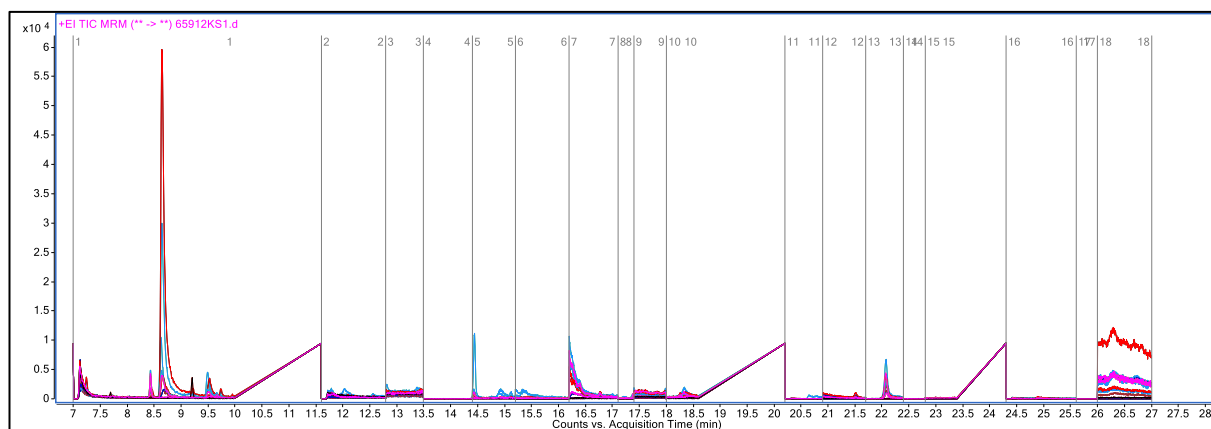
Další problém spočíval v přípravě IS. Z neznámého důvodu nebyla v žádném z případů po výměně kolony zaznamenána jeho analytická odezva. Přestože byly učiněny experimenty s různými koncentracemi, přípravami nových zásobních roztoků, různými způsoby derivatizace, výsledek byl vždy stejný. V rámci hlavního screeningu byl IS připravován do samostatné vialky v rámci tzv. duálního nástřiku (viz **Kapitola 4.6** a **Obr. 10**). IS tak nebyl aplikován do samotného vzorku na začátku jeho přípravy, a tudíž by ani neinformoval o případné extraktivnosti analytů ze sladů, jako spíše o stabilitě samotné analýzy na GC-MS/MS. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k náhradě IS připravením vzorku nitrosovaného

piva, který byl hexanem naředěn (1:3) do přijatelné koncentrace z hlediska analytické odezvy. Ten byl dále analyzován v rámci sekvence připravených vzorků sladů a jejich příslušných sladů s cílem informovat o stabilitě analýzy.

Vzorky sladů a sladů byly po celou dobu řešení výše zmíněných problémů a časových prodlev, které byly dále způsobeny vyčerpáním GC-MS/MS přístroje jinými analýzami, zamrazeny ve tmě při teplotě $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$. Je tedy velmi pravděpodobné, že vlivem časové prodlevy mezi přípravou vzorků a jejich analýzou došlo k jejich poškození, potažmo znehodnocení. Tomu nasvědčují MRM chromatogramy vzorků několika sladů (65585, 65361, 65833, 65835 – duplicitní analýza), které byly analyzovány ještě před závadou přístroje (viz Obr. 31). V porovnání s MRM chromatogramy všech připravených sladů po jeho opravě, resp. několika týdenní časové prodlevě (viz Obr. 32).



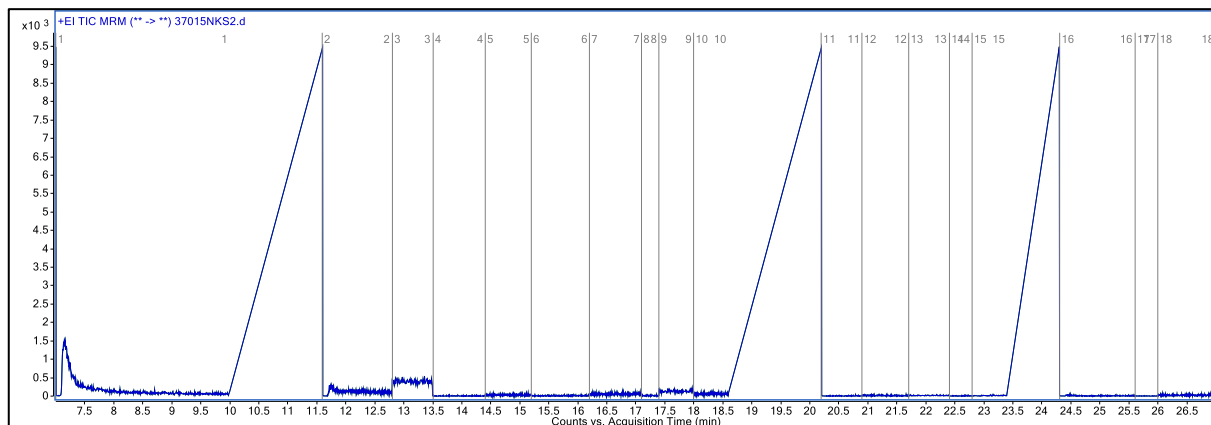
Obr. 31: Všechny MRM chromatogramy sladů analyzované před závadou přístroje



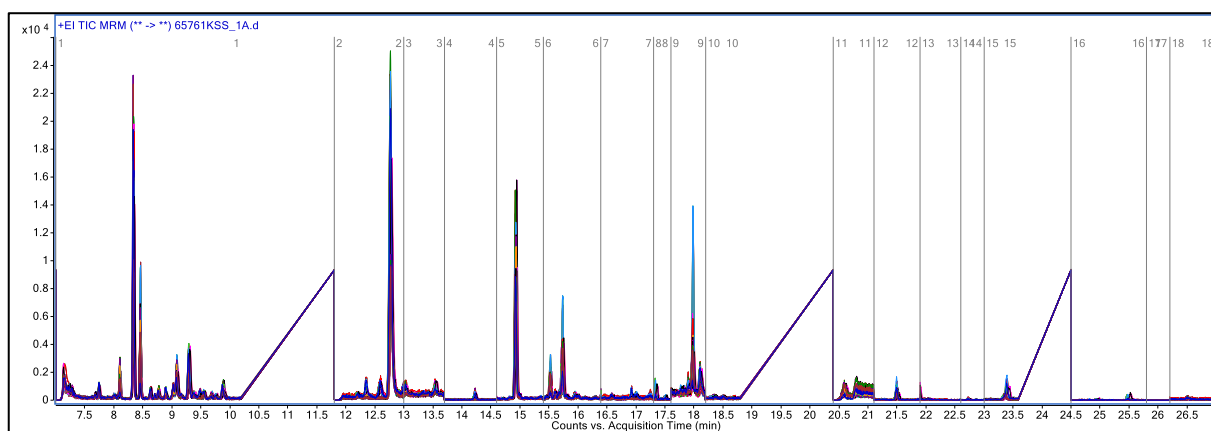
Obr. 32: Všechny MRM chromatogramy sladů analyzované po opravě přístroje

Z tohoto důvodu nebyly výsledky této analýzy brány jako relevantní data, která by byla určena k vyhodnocení a získání jasných představ a závěrů o extraktivnosti sledovaných analytů do kongresní sladiny. Přesto se zdá, že k extrakci některých analytů skutečně došlo (viz Obr. 31). Rozhodně ale nelze na základě tohoto experimentu dojít k jasným odpovědím, týkajících se například míry extraktivnosti. Překvapivá byla i absence

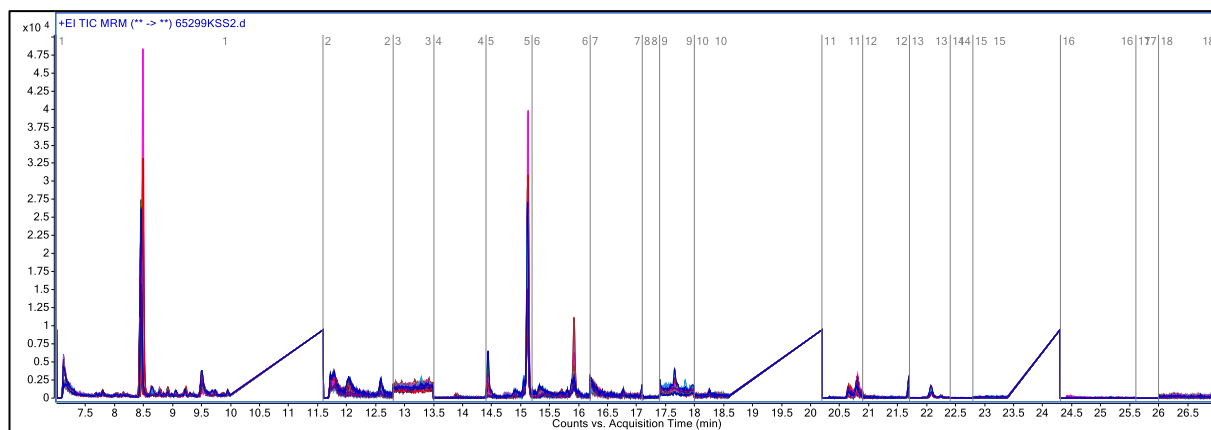
analytů v případě uměle nitrosovaného sladu (viz **Obr. 33**), u kterého byly očekávány nejvyšší analytické odezvy. Stejný trend poškození vzorků byl pozorován rovněž u všech sladů, ze kterých byly sladiny připraveny (viz **Obr. 34** a **Obr. 35**). Přestože se jednalo o stejné vzorky, byl mezi nimi na první pohled patrný zásadní rozdíl, který byl způsobený právě časovou prodlevou mezi analýzami. Design experimentu byl na základě zde získaných poznatků upraven a tématu je i nadále věnována pozornost.



Obr. 33: „Prázdný“ MRM chromatogram kongresní sladiny připravené z uměle nitrosovaného sladu „za horka“ (37015N)



Obr. 34: Všechny MRM chromatogramy sladů příslušných sladin analyzované před závadou přístroje (duplicitní analýza)



Obr. 35: Všechny MRM chromatogramy sladů příslušných sladů analyzované po opravě přístroje

6 Diskuze

Oxidy dusíku jsou velmi účinnými nitrosačními činidly (Wainright 1986). Jejich schopnost podílet se na nitrosaci, ale také nitraci sladové matrice je patrná na **Obr. 14**. Z tohoto grafu je dále zřejmé, že se sledované analyty skutečně mohou tvořit i ve sladové matrici nikoliv pouze v pivu, jak již bylo prokázáno ve studii podle Malečkové et al. (2021). To by mohlo znamenat, že se tyto látky mohou ze sladu extrahovat do sladiny a případně piva, což se v této práci ale nepodařilo potvrdit ani vyvrátit.

Vysoké analytické odezvy zde zkoumaných analytů u sladů, které byly hvozděny při vysokých teplotách (viz **Obr. 17**), by bylo možné vysvětlit zvýšenou tvorbou přímých nitrosačních činidel, tedy oxidů dusíků, které se podle Wainwright (1986) odvíjí od teploty. Kellner et al. (1983) uvádějí, že se oxidy dusíku tvoří především při teplotách nad 1200 °C. Trégnier & Trejbal (2017) pak zmiňují vzrůstající riziko tvorby nitrosaminů s teplotou nad 80 °C. To se z hlediska technologie výroby sladu jeví jako zásadní, jelikož podle Boulton (2013) je tato hranice u většiny sladů v procesu hvozdění překročena.

V úvahu přichází také bakteriální redukce dusičnanů v máčecí vodě (Briggs et al. 2004). U tohoto scénáře by jistě záleželo jak na režimu máčení, tak na kvalitě máčecí vody. Kunze (2010) tvrdí, že celosvětově se pro výrobu piva využívají především světlé slady. To je z hlediska případných toxických účinků zde sledovaných analytů pozitivním zjištěním, jelikož tyto slady dosahovaly nižších analytických odezev (viz **Obr. 17** a **Obr. 20**). Na základě získaných výsledků, kdy se zdály být slady hvozděné při vysokých teplotách z hlediska analytických odezev jasně odlišené od ostatních vzorků, lze soudit, že bakteriální redukce dusičnanů může mít spíše přidružený efekt. Obdobné shlukování plzeňských sladů původem z České republiky, Slovenska a Srbska (viz **Obr. 27**) by mohlo být vysvětleno obdobnou technologií výroby včetně podobného technologického vybavení. Takovéto tvrzení je ale velmi problematické zhodnotit.

Z pohledu NDMA nebylo přistoupeno ke grafickému vyhodnocení u sladů barvicích a nakuřovaných kvůli jejich nízkému zastoupení v celkovém souboru dat. Nicméně podle Basařové et al. (2010) se barvicí slady v rámci sypání aplikují do 2 % a slady nakuřované se užívají spíše pro výrobu whisky. Lze tak soudit, že v pivovarnictví nepředstavují z hlediska obsahu NDMA takovou závažnost. Erzetti et al. (2009) navíc podotýkají, že kouř generovaný během výroby nakuřovaných sladů není odpovědný za tvorbu NDMA. Lze se tedy domnívat, že slady nakuřované nevykazují zvýšené koncentrace NDMA. To potvrzuje studie podle Kubacki et al. (1989). Karamelové a barvicí slady, které byly v rámci této práce analyzovány, obsahovaly NDMA pod mezí detekce, tedy <0,2 µg/kg. S výjimkou jednoho vzorku karamelového sladu (61946), který obsahoval NDMA v koncentraci 0,6 µg/kg. Jedná se o slady, které jsou hvozděny při vyšších teplotách. Karamelové až při 160 °C (Boulton 2013) a barvicí až při 225 °C (Basařová et al. 2015). Jak již bylo výše zmíněno, tvorba nitrosaminů je katalyzována vzrůstající teplotou (Trégnier & Trejbal 2017). Z tohoto důvodu je zajímavým zjištěním nízká koncentrace NDMA v karamelových a barvicích sladech. Na základě osobní komunikace ze dne 19. 8. 2021 se zástupcem vedoucího AZL VÚPS RNDr. Tomášem Vrzalem, Ph.D. to lze vysvětlit až příliš vysokou teplotou během jejich výroby, která vede k degradaci NDMA. Dále však poznamenal, že tyto slady často

obsahují vyšší koncentrace jiných těkavých N-nitrosaminů, jako je NPYR. To potvrzuje také Pollock (1981). K podobným výsledkům týkajících se nízké koncentrace NDMA u karamelových sladů dospěli také Kubacki et al. (1989). Pokud se NDMA u všech z 6 v této práci analyzovaných pšeničných sladů vyskytoval, tak pouze pod mezí detekce ($<0,2 \mu\text{g/kg}$). Frommberger (1989) to vysvětluje absencí hordeninu, tedy prekurzoru tvorby NDMA v pšenici. Ten je charakteristický především pro ječmen. Ze 190 analyzovaných komerčně dostupných sladů byla hodnota NDMA dostupná u 188, z čehož 135 vzorků obsahovalo NDMA nad mezí detekce ($>0,2 \mu\text{g/kg}$). Český svaz pivovarů a sladoven nedoporučuje překračovat koncentraci NDMA $1 \mu\text{g/kg}$ sladu (Čulík et al. 2011). Tuto hranici překročilo celkem 53 vzorků (39,3 %). Z 98 plzeňských sladů bylo nevyhovujících 23 (23,47 %), přičemž nejvyšší zaznamenaná hodnota NDMA činila $8,2 \mu\text{g/kg}$ sladu. U mnichovských sladů překročilo hranici NDMA $1 \mu\text{g/kg}$ rovněž 23 sladů, ale pouze z 28 vzorků (82,14 %), zatímco nejvyšší hodnota NDMA zde činila $20,5 \mu\text{g/kg}$ sladu. Podle výše zmíněných údajů se zdají být z hlediska obsahu NDMA nejproblematičtější slady mnichovské (**Obr. 28**). To je v rozporu se studií, kterou provedli Kubacki et al. (1989). Jejich výzkum ale probíhal na menším počtu vzorků. Jev, kdy slady hvozděné při vysokých teplotách obsahovaly vysoké analytické odezvy u sledovaných analytů (**Obr. 17 a Obr. 20**), ale nízké hladiny NDMA, nasvědčuje neexistující asociaci mezi nimi. Obdobný fenomén lze pozorovat mezi obsahem NDMA a ATNC v pivu, jak již prokázali Massey et al. (1990), ale také Čulík et al. (2012a) a Čulík et al. (2012b).

Podle Čulíka et al. (2011) dochází vlivem tepelného rozkladu nitrosoaminokyseliny NPRO ke vzniku těkavých N-nitrosaminů, konkrétně NPYR. Na **Obr. 30** lze vidět, že hodnoty NPRO u analyzovaných mnichovských a plzeňských sladů nedosahovaly tak odlišných analytických odezev, jako v případě koncentrací NDMA (viz **Obr. 29**). To by nasvědčovalo, že část NPRO se během vyšších hvozdících teplot přeměnila na NPYR. Stejný mechanismus podle Pollock (1981) platí i pro přeměnu NSAR na NDMA. U NDMA (**Obr. 29**) by vyšší rozdíl v jeho koncentraci mezi plzeňskými a mnichovskými slady mohl být vysvětlen částečnou přeměnou NSAR na NDMA. Pomineme-li však nitrosaci indukovanou oxidy dusíku.

Nakuřovaný slad byl hodnocen jako slad s nižšími analytickými odezvami (viz **Obr. 17, Obr. 25 a Obr. 26**). To je v souladu s nízkým obsahem NDMA, jak uvádějí Erzetti et al. (2009), což je pozoruhodné, jelikož k jejich výrobě se používají hvozdy s přímým otopem (e-mailová komunikace ze dne 17. 1. 2022 se zástupcem sladmistra panem Markem Červem ze sladovny benešovského Pivovaru Ferdinand, s.r.o.). Hvozdy s přímým otopem používané v minulosti byly podle Bamforth (2006) odpovědné za tvorbu NDMA. Analyty nacházející se ve zvýšené analytické odezvě byly NPRO, *p*-nitrosofenol, 4-kyanofenol, unk 3, unk 7 a 5-nitrosogajakol. Podle Basařové et al. (2015) tyto slady obsahují vysoké koncentrace fenolů. Je tedy zajímavé, že v analyzovaném vzorku byly detekovány právě analyty *p*-nitrosofenol a 4-kyanofenol. V případě 4-kyanofenolu byl podle Malečkové et al. (2021) jako prekurzor již určen tyrosin, avšak prekurzor *p*-nitrosofenolu zatím určen nebyl. Vystává tak otázka, zda výskyt těchto analytů nesouvisí právě se zvýšeným obsahem fenolů. Tomu nasvědčuje tvrzení publikované v práci podle Wainwright (1986), který považuje fenoly v naklíčeném ječmeni za prekurzory pro tvorbu nitroso a nitro sloučenin. Nicméně v rámci této diplomové

práce byl analyzován pouze jeden vzorek nakuřovaného sladu a nelze tak vyvozovat jasné závěry.

4-kyanofenol byl hodnocen jako analyt, který se ve sladech zkoumaných v této práci nacházel ve výrazných analytických odezvách. Podle Malečkové et al. (2021) byl ve výrazném množství nalezen také ve všech vzorcích komerčně dostupných piv. Ventura et al. (2020) se věnovali toxicitě fenolických látek, včetně 4-kyanofenolu vůči *Gerronema viridilucens*. Na základě efektivní koncentrace (EC₅₀) byl 4-kyanofenol řazen mezi ty toxičtější ze zkoumaných fenolických látek. Další kyanosloučeninou ve sladu s prokázanou toxicitou je epiheterodendrin (viz **Obr. 9**) mající původ v leucinu, který za určitých okolností produkuje toxický kyanid (Nielsen et al. 2002). Na základě výše zmíněných informací se 4-kyanofenol zdá být významnou látkou z hlediska sladařsko-pivovarnického odvětví, u které se dají předpokládat toxické vlastnosti. Z tohoto důvodu lze přikládat důležitost dalšího výzkumu.

Pšeničné slady byly hodnoceny jako matrice s nižšími analytickými odezvami. V porovnání s plzeňskými slady se ale odchylovaly více od průměru (viz **Obr. 25**). Od plzeňských sladů se pšeničné slady odlišují vyšším obsahem bílkovin, vyšší extraktivností, nižší sušinou (Kosař & Procházka 2000) a absencí pluch. Barva většinou odpovídá plzeňským sladům, nicméně existují i tmavé varianty (Mallett 2014). V této práci ale byly analyzovány pouze varianty světlé. Nižší výskyt analytů v pšeničných sladech by tak mohl být vysvětlen obdobnou barvou, tedy i obdobnými teplotami hvozdění, jako v případě plzeňských sladů. Dále přichází v úvahu absence pluch, jelikož právě v pluchách se nitrososloučeniny podle Malečkové (2018) vyskytují v největším množství. Je třeba brát také v potaz, že se jedná o slad vyrobený z jiného botanického druhu než v případě všech ostatních analyzovaných sladů, což může komplikovat porovnatelnost.

Vzorek sladového květu vykazoval vyšší analytické odezvy (viz **Obr. 20**) než mnichovský slad, ze kterého pocházel. Vznik N-nitrosaminů ve sladovém květu již byl prokázán, jak uvádějí Neylon et al. (2020). Podle Wainwright (1986) je NDMA v rámci celé obilky nejkoncentrovanější právě ve sladovém květu. Ostatní strukturně charakterizované analyty studované v této práci nebyly ve sladovém květu podle prostudované literatury dosud sledovány, a je tak problematické zhodnotit důvod tohoto výsledku. Nicméně sladový květ se během hvozdění nachází na povrchu ječné obilky (Basařová et al. 2015). Sladový květ je tak pravděpodobně vystaven vyšším koncentracím nitrosačnicích činidel než struktury uložené ve vnitřních částech. V úvahu je třeba brát také rozdílný výskyt jednotlivých prekurzorů v konkrétních strukturách. Například obsah fenolových kyselin, mezi které patří kyselina vanilová (prekurzor 2-methoxy-5-nitrofenolu) a benzoová (prekurzor analytu unk 4), je jak uvádějí Dvořáková et al. (2008) vyšší ve svrchních vrstvách ječné obilky oproti endospermu. Vzorky sladů analyzované v této práci byly navíc připraveny homogenizací celých sladových zrn (vliv ředění), což by mohlo také vysvětlovat vyšší analytické odezvy u vzorku sladového květu než ve vzorku sladu, ze kterého pocházel. To podporuje tvrzení v práci Kellner et al. (1983), kteří zde uvádějí koncentraci NDMA ve sladovém květu 890 ppb, zatímco v rámci celého sladu 70 ppb. Nicméně v rámci této diplomové práce byl analyzován pouze jeden vzorek této matrice a nelze tak činit jasné závěry. Na základě výsledků shlukové analýzy (viz **Obr. 17**) a PCA (viz **Obr. 26**) bylo souzeno, že slady neznámé (u kterých nebylo zřejmé, o který druh se jedná) byly ve většině případů skutečně

slady plzeňské, jak bylo předpokládáno na základě makroskopických znaků. Minoritně však byly zastoupeny pravděpodobně také slady mnichovské.

Podle Vrzala & Olšovské (2016) nebyly ve sladu C-nitrososloučeniny zatím identifikovány. Malečková (2018) ve své diplomové práci použila klasifikační metodu rozdělující detekované látky do skupin N-nitrososloučenin, interferujících látek a C-nitrososloučenin. Z těchto výsledků vyplývá, že ve zkoumaných sladech tvořily C-nitrososloučeniny početnější skupinu, než N-nitrososloučeniny, což příkládá relevanci výzkumu C-nitrososloučenin v komerčně dostupných sladech. Problematice klasifikace C-nitrososloučenin se věnovali také Vrzal & Olšovská (2019). V rámci této diplomové práce však byly v komerčně dostupných sladech detekovány konkrétně strukturně charakterizované C-nitrososloučeniny jako je 5-nitrosoguajakol (viz **Obr. 11** a **Obr. 18**). Samotný guajakol je v ječmeni tvořen působením pražení (Joung et al. 1980), což podporuje předpoklad tvorby 5-nitrosoguajakolu ve sladu. To je dále v souladu s výsledkem, že 5-nitrosoguajakol se zdál být typickým analytem pro barvicí slady (viz **Obr. 20** a **Obr. 21**), u nichž je podle Kunze (2010) pražení principem výroby. Výskyt 6-nitrosoguajakolu v masné matrici již prokázali Bölicke & Ternes (2016), jehož prekurzorem byl právě guajakol, což je v souladu s výsledky Malečkové et al. (2021); (viz **Tab. 8**).

Dále byly v rámci této práce ve sladu z C-nitrososloučenin detekovány *p*-nitrosofenol a kyselina 2-nitrosopropanová neboli tautomer oximu kyseliny pyrohroznové (viz **Obr. 11** a **Obr. 18**). Obsah *p*-nitrosofenolů je problematický z hlediska své mutagenní aktivity a schopnosti katalyzovat tvorbu N-nitrosaminů, včetně NDMA a NPYR (Gilbert et al. 1980). Kyselina pyrohroznová je v ječmeni tvořena nejvíce ke konci sladovacího procesu (Frank et al. 2011). Za předpokladu oximace by tak mohl režim hvozdění ovlivnit výskyt oximu kyseliny pyrohroznové. Jednoduchým tautomerním přesmykem by se následně mohla generovat kyselina 2-nitrosopropanová náležící mezi C-nitrososloučeniny.

Nitrososloučeniny, konkrétně některé nitrované fenoly již byly ve sladu a pivu sledovány (Wainright 1986). Fenolické látky sladu jsou například kyselina benzoová (Preedy 2009) a kyselina vanilová (Dvořáková et al. 2008). Kyselina benzoová je prekurzorem analytu unk 4, tedy nejspíše kyseliny nitrobenzoové (Malečková et al. 2021), zatímco kyselina vanilová je prekurzorem 2-methoxy-5-nitrofenolu a 5-nitrosoguajakolu neboli 2-methoxy-5-nitrosofenolu (viz **Tab. 8** a **Obr. 11**). 2-methoxy-5-nitrofenol byl hodnocen jako analyt vyskytující se napříč zkoumanými vzorky ve výraznějších analytických odezvách než unk 4. Obsah volné kyseliny vanilové se podle Dvořákové et al. (2008) v průběhu výroby sladu snižuje. Z toho důvodu je zajímavý vysoký výskyt 2-methoxy-5-nitrofenolu. Vznik zde sledovaných analytů ve sladu je dále vysvětlován obsahem jejich dalších přirozených prekurzorů v ječmeni, jako je prolin a tyrosin (viz **Tab. 8**). Podle Gupta et al. (2010) se jedná o minoritně zastoupené aminokyseliny, zatímco Basařová et al. (2015) považují prolin za majoritní aminokyselinu v ječmeni.

V případě analytu unk 3 se podle Malečkové (2021) jedná s největší pravděpodobností buď o kyselinu N-nitrosopyroglutamovou či N-nitrosopipekolovou (viz **Obr. 12**). Kyselina pyroglutamová se nachází v ječmeni (Svensson et al. 1985) a může být vlivem dusitanů nitrosována za vzniku karcinogenní kyseliny nitrosopyroglutamové (Yamada et al. 1981). NPIC nebyla ve sladech podle Pollock (1981) pozorována.

Ze strukturně charakterizovaných analytů nebyla žádná analytická odezva napříč vzorky zaznamenána u NPRO-ethylesteru. Ten byl ve studii Vrzala & Olšovské (2019) detekován v experimentálně nitrosovaném pivu, kde byl tvořen nejspíše reakcí NPRO s ethanolem za kyselých podmínek. Nicméně tento analyt nebyl zaznamenán ani v případě dvou uměle nitrosovaných sladů (37015N, 37015NS), což by potvrdilo předpoklad o významu ethanolu při jeho tvorbě. Základní bílkovinnotvornou aminokyselinou ječmene je mimo jiné fenylalanin (Basařová et al. 2015). Obava, že by přirozeně se vyskytující fenylalanin (ve zkoumaných vzorcích) přispěl k analytické odezvě IS, nebyla potvrzena. Zhodnoceno tak bylo na základě porovnání chromatogramů a hmotnostních spekter. Je třeba si ale uvědomit, že nedetekování analytů nemuselo nutně znamenat jejich reálnou absenci ve zkoumaných vzorcích. Tyto analyty se například mohly ve vzorcích nacházet v koncentracích pod mezí detekce, nebo nemusely být dostatečně extrahovány. V úvahu je třeba vzít také průběh derivatizační reakce. To se netýká pouze analytu NPRO-ethylester, ale také strukturně necharakterizovaných analytů jako je unk 14 a unk 15, které rovněž nebyly zaznamenány u komerčně dostupných sladů, ale pouze u sladů uměle nitrosovaných (viz **Obr. 14**). Stejný mechanismus se mohl uplatnit u všech záznamů s nulovou analytickou odezvou.

Základním předpokladem vzniku zde sledovaných analytů je účinek nitrosačních činidel. V případě ječmene by tak k jejich tvorbě mělo docházet až v průběhu výroby sladu. Z tohoto důvodu byly překvapivé vysoké analytické odezvy u některých sledovaných analytů v rámci nesladovaných ječmenů (viz **Obr. 17** a **Obr. 20**). Jak uvádí Smith (1994), těmito nitrosačními činidly jsou oxidy dusíku. Podle Lopatin (2020) jsou oxidy dusíků jednou z nejtoxičtějších složek výfukových plynů dieselových motorů, které jsou zpravidla hlavním zdrojem pohonu zemědělské mechanizace. Teoreticky by tedy mohlo dojít k vystavení přirozených prekurzorů ječmene nitrosačním činidlům tohoto původu například v průběhu sklizně. Wainwright (1986) dále považuje z hlediska nitrosace za významné znečištění atmosféry oxidy dusíku vlivem automobilové dopravy. Takovéto znečištění atmosféry v místě růstu ječmene by tak mohlo stejným mechanismem vysvětlit zvýšený obsah zde studovaných analytů ve vzorcích nesladovaných ječmenů. V nich mohou být podle Čulíka et al. (1989a) nalezeny též N-nitrosaminy, a to patrně vlivem použití dusíkatých agrochemikálií. Je tak tedy na místě posoudit možný vliv aplikace agrochemikálií na tvorbu zde studovaných analytů. Miniaturizovaná extrakční metoda podle Malečkové (2018) byla vyvinuta pro screening netěžkých nitrososloučenin ve sladu pomocí GC-NCD (plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí selektivní pro dusík), nikoliv v ječmeni. Autorka navíc v ječmeni klasifikovala také C-nitrososloučeninu. Fakt, že studované analyty nepatří pouze mezi nitrososloučeniny a byly dále analyzovány pomocí GC-MS/MS, může být odpovědný za určitou chybovost. Z hlediska samotné analýzy na GC-MS/MS je třeba dále brát v úvahu vliv možných interferencí a koelucí a neměly by tak být činěny zcela striktní závěry.

V nedávno publikovaném výzkumu podle Malečkové et al. (2021) byla provedena semikvantifikace zde zkoumaných analytů v 16 komerčně dostupných pivech různého typu a původu. Relativní množství bylo vypočteno jako poměr plochy píku analytu k ploše píku IS. V těchto pivech (alespoň v jednom z případů) se z analytů (které jsou sledovány v rámci této diplomové práce) vyskytly v analytických odezvách vyšších než IS tyto analyty: unk 1, 4-kyanofenol, unk 2, NPRO, unk 3, 5-nitrosogujakol, 2-methoxy-5-nitrofenol, unk 8, unk 7,

unk 12, unk 13 a unk 16. Jako nejvýraznější se ale jevily konkrétně analyty: unk 1, 4-kyanofenol, 2-methoxy-5-nitrofenol, unk 12 a především unk 7. Napříč vzorky sladů zkoumaných v této diplomové práci pak byly zjištěny ve výrazných odezvách odezvách shodně analyty unk 1, 4-kyanofenol, 2-methoxy-5-nitrofenol a unk 7. Nejméně zastoupeným analytem napříč všemi vzorky komerčně dostupných sladů byl unk 6 (viz **Obr. 17**), což je v souladu s jeho výskytem v komerčně dostupných pivech, kde byl řazen rovněž mezi nejméně zastoupené analyty. Lze tedy rámcově zhodnotit, že v pivu bylo ve výrazném množství detekováno více analytů než ve sladu. To je v souladu s předpokladem, že kromě případné extrakce ze sladu se v pivu tyto analyty tvoří vlivem mikrobiální kontaminace tak jako v případě ATNC, jak již uvedlo mnoho autorů včetně Calderbank & Hammond (1989). Z důvodu rozdílného počtu vzorků a metodiky zpracování je takovéto porovnání z hlediska vyhodnocení problematické.

Důvodem znehodnocení vzorků kongresních sladů (viz **Obr. 31** a **Obr. 32**) mohla jistě být časová prodleva mezi přípravou vzorků a samotnou GC-MS/MS analýzou. V úvahu připadá také zbytková vlhkost po SPE či vzdušná vlhkost ve vialce v průběhu skladování vzorků. Jak uvádí Nováková (2011) TMS deriváty a činidla jsou vůči vlhkosti citlivá, jelikož jejím vlivem podléhají hydrolyze. Nicméně během přípravy vzorků byl na toto riziko kladen důraz. V případě uměle nitrosovaného sladu (37015NKS) vyvstaly některé další komplikace. Zmíněné problémy se týkaly nejprve velmi pomalé filtrace. Po zamrazení sladů bylo velmi obtížné jejich rozmrazování. Oproti standardním sladům tento proces probíhal velmi pomalu a rozmrazené sladiny byly více viskózní. S tím souvisela také hůře proveditelná SPE. Důvodem mohlo být stáří sladu, fakt, že byl slad skladován jako namletý, ale spíše skutečnost, že prošel procesem umělé nitrosace, popsáném v **Kapitole 4.7**. To vše mohlo být důvodem nezaznamenání žádných analytických odezev u těchto vzorků kongresních sladů.

Jak již bylo zmíněno výše, nitrososloučeniny a jejich prekurzory se nachází především v pluchách. Pokud by toto platilo i pro zde sledované analyty, které jsou řazeny dále mezi nitrososloučeniny, kyanosloučeniny a oximy, mohl by být jejich přechod do sladiny a následně piva ovlivněn režimem šrotování. Kosař & Procházka (2000) totiž uvádějí, že způsob šrotování má vliv na narušení pluch, a tedy i na následnou extrakci látek v nich obsažených. Johnson et al. (1987) poukazují na 20 až 30% extrakci ATNC ze sladu do sladiny, přičemž přisuzují hlavní význam tvorbě ATNC až v průběhu fermentace vlivem mikrobiální kontaminace. V budoucím výzkumu by bylo žádoucí porovnat extraktivnost ATNC s extraktivností zde studovaných analytů. Vzhledem k tomu, že některé z těchto analytů patří mezi sloučeniny tvořící ATNC, lze předpokládat obdobnou extrakci.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala screeningem dusíkatých látek vzniklých působením nitrosačních činidel v komerčně dostupných sladech. Pozornost byla věnována také přechodu těchto látek (analytů) do kongresní sladiny. Tyto analyty byly popsány v pivní matici v rámci nedávného výzkumu ve VÚPS. Podle vědomí autora a prostudování dostupné literatury nebyla většina těchto analytů ve sladu prozatím zkoumána. V rámci této práce tak bylo nejprve analýzou experimentálních (uměle nitrosovaných) sladů potvrzeno, že se tyto látky mohou tvořit také ve sladové matici.

Dále byly rozpoznány analyty, které byly v rámci souboru zkoumaných vzorků detekovány převážně v nízkých, přechodných a vysokých analytických odezvách, potažmo koncentracích. Zároveň byly navrženy konkrétní analyty, které se zdály být typické pro jednotlivé druhy analyzovaných komerčně dostupných sladů. Také byl potvrzen předpoklad výskytu C-nitrososloučenin ve sladové matici. Faktorem podporující vznik těchto látek ve sladu se zdála být vysoká teplota během poslední fáze jeho výroby, tedy v průběhu hvozdnění. Nejevilo se, že by byl obsah zde studovaných analytů ve sladech asociován s obsahem NDMA, což je v souladu s již známým zjištěním o nízké korelaci mezi NDMA a ATNC v pivu. Mezi analytickými odezvami sledovaných analytů a zeměmi původu příslušných matic nebyla rovněž pozorována zřejmá asociace. Dále bylo potvrzeno, že analyty nalezené v komerčně dostupných pivech mohou vznikat i v komerčně dostupných sladech, což by mohlo nasvědčovat předpokladu jejich možné extrakce do sladiny, potažmo piva. Tuto hypotézu se ale za zvoleného designu experimentu nepodařilo spolehlivě potvrdit ani vyvrátit. Nicméně tomuto problému je i nadále věnována pozornost.

Jednalo se o observační studii, tudíž nelze z výsledků vyvozovat zcela jednoznačné závěry. Použitá extrakční metoda byla vyvinuta s cílem detekce netěkavých nitrososloučenin, nicméně zde zkoumané analyty byly charakterizovány i jako jiné skupiny látek. Stejně tak metoda analýzy na GC-MS/MS byla původně vyvinuta pro detekci těchto analytů v pivu, nikoliv sladu, což mohlo rovněž způsobit určitou chybovost. Dále je třeba brát v úvahu výskyt případných interferencí a koelucí a fakt, že během vyhodnocování nebyl brán v potaz odezvový faktor. Budoucí výzkum by se měl věnovat především objasnění toxikologických vlastností sledovaných analytů pro zhodnocení relevance dalšího výzkumu. Na základě toho by měly být dále charakterizovány analyty neznámé struktury. V neposlední řadě by bylo vhodné zaměřit se na další potraviny, při jejichž výrobě se také uplatňují nitrosační činidla tedy například na uzeniny. Závěrem lze konstatovat splnění stanovených cílů práce. Z hypotéz se nepodařilo potvrdit pouze předpoklad přechodu zkoumaných analytů do kongresní sladiny.

8 Literatura

- Ahmad MU, Libbey LM, Barbour JF, Scanlan RA. 1985. Isolation and characterization of products from the nitrosation of the alkaloid gramine. *Food and Chemical Toxicology* **23**:841-847.
- Al-Oudat M, Al Attar L, Othman I. 2021. Transfer factor of ^{137}Cs and ^{90}Sr to various crops in semi-arid environment. *Journal of Environmental Radioactivity* DOI: 10.1016/j.jenvrad.2020.106525.
- Amelin VG, Bol'shakov DS. 2019. Rapid identification and determination of N-nitrosamines in food products by ultra-high-performance liquid chromatography–high resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometry by exact masses of protonated molecules. *Journal of Analytical Chemistry* **74**:39-46.
- Analytica-EBC. 2004. Section 4 Malt. Method 4.5.1. Extract of Malt: Congress Mash. European Brewery Convention.
- Baik B-K, Ullrich SE. 2008. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* **48**:233-242.
- Bamforth CW. 2006. *Brewing: new technologies*. CRC Press, Boca Raton.
- Bamforth CW. 2014. Dimethyl sulfide – significance, origins and control. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **72**:165-168.
- Bamforth CW. 2016. *Brewing materials and processes: a practical approach to beer excellence*. Academic Press, London. [Elektronická monografie].
- Baranwal D, Sankhla A. 2019. Physical and functional properties of malted composite flour for biscuit production. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **8**:959-965.
- Basařová G, et al. 2015. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Havlíček Brain Team, Praha.
- Basařová G, Šavel J, Basař P, Lejsek T. 2010. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. VŠCHT, Praha.
- Beard JC, Swager TM. 2021. An organic chemist's guide to N-nitrosamines: their structure, reactivity, and role as contaminants. *The Journal of Organic Chemistry* **86**:2037-2057.
- Becraft PW, Yi G. 2011. Regulation of aleurone development in cereal grains. *Journal of Experimental Botany* **62**:1669-1675.
- Bertoft E. 2017. Understanding starch structure: recent progress. *Agronomy* DOI: 10.3390/agronomy7030056.
- Betts NS, et al. 2020. Transcriptional and biochemical analyses of gibberellin expression and content in germinated barley grain. *Journal of Experimental Botany* **71**:1870-1884.
- Bogdan P, Kordialik-Bogacka E. 2017. Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology* **65**:1-9.
- Bölicke S-M, Ternes W. 2016. Isolation and identification of oxidation products of guaiacol from brines and heated meat matrix. *Meat Science* **117**:18-26.
- Boulton Ch. 2013. *Encyclopaedia of brewing*. Wiley, Chichester. [Elektronická monografie].
- Bravi E, Marconi O, Perretti G, Fantozzi P. 2012. Influence of barley variety and malting process on lipid content of malt. *Food Chemistry* **135**:1112-1117.
- Briggs DE, Boulton ChA, Brookes PA, Stevens R. 2004. *Brewing: science and practice*. CRC Press, Boca Raton.

- Buist HE, Devito S, Goldbohm RA, Stierum RH, Venhorst J, Kroese ED. 2015. Hazard assessment of nitrosamine and nitramine by-products of amine-based CCS: alternative approaches. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **71**:601-623.
- Calderbank J, Hammond JR. 1989. Influence of nitrate and bacterial contamination on the formation of apparent total N-nitroso compounds (ATNC) during fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* **95**:277-281.
- Cejnar R, Hložková K, Jelínek L, Kotrba P, Dostálek P. 2017. Development of engineered yeast for biosorption of beer haze-active polyphenols. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**:1477-1485.
- ClinicalTrials. 2021. ClinicalTrials.gov is a database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world. U.S. National Library of Medicine. Available from <https://clinicaltrials.gov/> (accessed October 2021).
- Contreras-Jiménez B, Del Real A, Millan-Malo BM, Gaytán-Martínez M, Morales-Sánchez E, Rodríguez-García ME. 2019. Physicochemical changes in barley starch during malting. *Journal of the Institute of Brewing* **125**:10-17.
- Crews C. 2010. The determination of N-nitrosamines in food. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* **2**:2-12.
- Crosby NT, Sawyer R. 1976. N-nitrosamines: a review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. *Advances in Food Research* **22**:1-71.
- Čejka P, Horák T, Dvořák J, Čulík J, Jurková M, Kellner V, Hašková D. 2011. Monitoring of the distribution of some heavy metals during brewing process. *Ecological Chemistry and Engineering S* **18**:67-74.
- Český svaz pivovarů a sladoven. 2020. Pivovarské statistiky 2019. Český svaz pivovarů a sladoven. Available from <http://ceske-pivo.cz/download/tiskove-zpravy/2020/csps20200520.pdf> (accessed November 2021).
- Čulík J, Horák T, Čejka P, Jurková M. 2012a. Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství Část I. – Vznik a metody stanovení. *Kvasný Průmysl* **58**:6-12.
- Čulík J, Horák T, Čejka P, Jurková M. 2012b. Netěkavé N-nitrosaminy v pivovarství Část II. – Studium účinků UV záření na ATNC a vybrané zástupce N-nitrosoamino kyselin v pivu. *Kvasný Průmysl* **58**:26-29.
- Čulík J, Jurková M, Horák T, Čejka P, Dvořák J, Olšovská J. 2011. Těkavé N-nitrosaminy ve sladu, věc již dávno minulá? *Kvasný Průmysl* **57**:413-416.
- Čulík J, Kellner V, Špinar B, Ilčík F, Basařová G. 1989b. Těkavé N-nitrosaminy ve sladu: II. Vliv základních technologických podmínek hvozdění a na obsah N-nitrosodimethylaminu ve sladu. *Kvasný Průmysl* **35**:353-356.
- Čulík J, Kellner V, Špinar B, Prokeš J, Basařová G. 1989a. Těkavé N-nitrosaminy ve sladu: I. Vliv pesticidů a dusíkatých hnojiv aplikovaných ve vegetačním období na obsah těkavých N-nitrosaminů v ječmeni a sladu. *Kvasný Průmysl* **35**:289-292.
- Čulík J, Kellner V, Špinar B, Prokeš J, Basařová G. 1990. Těkavé N-nitrosaminy ve sladu: III. Vliv technologie klíčení ječmene na vznik přirozených prekurzorů N-nitrosodimethylaminu v zeleném sladu a obsah N-nitrosodimethylaminu v hotovém sladu. *Kvasný Průmysl* **36**:162-165.
- Davídek J. 1995. Natural toxic compounds of foods: formation and change during processing and storage. CRC Press, Boca Raton. [Elektronická monografie].

- Dean JR, Ma R. 2007. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: a critical review. *Chemosphere* **68**:1399-1407.
- Demirel F, Germec M, Coban HB, Turhan I. 2018. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition. *Cellulose* **25**:6377-6393.
- Diao T, Pun D, Stahl SS. 2013. Aerobic dehydrogenation of cyclohexanone to cyclohexenone catalyzed by Pd(DMSO)₂(TFA)₂: evidence for ligand-controlled chemoselectivity. *Journal of the American Chemical Society* **135**:8205-8212.
- Dietrich M, Block G, Pogoda JM, Buffler P, Hecht S, Preston-Martin S. 2005. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes and Control* **16**:619-635.
- Dikusar EA, Zhukovskaya NA. 2008. Preparative synthesis of cyclohexanone oxime esters. *Russian Journal of Organic Chemistry* **44**:1389-1391.
- Dvořáková M, Guido LF, Dostálek P, Skulilová Z, Moreira MM, Barros AA. 2008. Antioxidant properties of free, soluble ester and insoluble-bound phenolic compounds in different barley varieties and corresponding malts. *Journal of the Institute of Brewing* **114**:27-33.
- Erny GL, Rodrigues JEA, Gil AM, Barros AS, Esteves VI. 2009. Analysis of non-aromatic organic acids in beer by CE and direct detection mode with diode array detection. *Chromatographia* **70**:1737-1742.
- Erzetti M, Marconi O, Bravi E, Perretti G, Montanari L, Fantozzi P. 2009. HACCP in the malting and brewing production chain: mycotoxin, nitrosamine and biogenic amine risks. *Italian Journal of Food Science* **21**:211-230.
- Eticha T, Hymete A. 2014. Health risk assessment of heavy metals in locally produced beer to the population in Ethiopia. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* **6**:65-68.
- Fan C-C, Lin T-F. 2018. N-nitrosamines in drinking water and beer: detection and risk assessment. *Chemosphere* **200**:48-56.
- Fan T, Sun G, Zhao L, Cui X, Zhong R. 2018. QSAR and classification study on prediction of acute oral toxicity of N-nitroso compounds. *International Journal of Molecular Sciences* DOI: 10.3390/ijms19103015.
- Ferré L. 1995. Selection of components in principal component analysis: a comparison of methods. *Computational Statistics & Data Analysis* **19**:669-682.
- Finnie C, Andersen B, Shahpiri A, Svensson B. 2011. Proteomes of the barley aleurone layer: a model system for plant signalling and protein secretion. *Proteomics* **11**:1595-1605.
- Fišerová H, Prokeš J, Helánová A, Hartmann J. 2010. Změny kvality sladu v průběhu posklizňového dozrávání ječmene. *Kvasný Průmysl* **56**:93-99.
- Frank T, Scholz B, Peter S, Engel K-H. 2011. Metabolite profiling of barley: influence of the malting process. *Food Chemistry* **124**:948-957.
- Freund HA. 1937. Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. *Annals of Internal Medicine* **10**:1144-1155.
- Frommberger R. 1989. N-nitrosodimethylamine in German beer. *Food and Chemical Toxicology* **27**:27-29.

- Gago B, Nyström T, Cavaleiro C, Rocha BS, Barbosa RM, Laranjinha J, Lundberg JO. 2008. The potent vasodilator ethyl nitrite is formed upon reaction of nitrite and ethanol under gastric conditions. *Free Radical Biology & Medicine* **45**:404-412.
- Gates K. 2009. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chemical Research in Toxicology* **22**:1747-1760.
- Gerhäuser C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer* **41**:1941-1954.
- Gilbert P, Rondelet J, Poncelet F, Mercier M. 1980. Mutagenicity of *p*-nitrosophenol. *Food and Cosmetics Toxicology* **18**:523-525.
- Gowenlock BG, Richter-Addo GB. 2004. Preparations of C-nitroso compounds. *Chemical Reviews* **104**:3315-3340.
- Guido LF. 2016. Sulfites in beer: reviewing regulation, analysis and role. *Scientia Agricola* **73**:189-197.
- Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallagher E. 2010. Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**:318-328.
- Gushgari AJ, Halden RU. 2018. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere* **210**:1124-1136.
- Hardwick WA. 1995. *Handbook of brewing*. Dekker, New York.
- He H-Y, Henderson AC, Du Y-L, Ryan KS. 2019. Two-enzyme pathway links L-arginine to nitric oxide in N-nitroso biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **141**:4026-4033.
- Helguera AM, Cordeiro MNDS, Pérez MÁC, Combes RD, González MP. 2008. Quantitative structure carcinogenicity relationship for detecting structural alerts in nitroso-compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* **231**:197-207.
- Helguera AM, González MP, Cordeiro MNDS, Pérez MÁC. 2007. Quantitative structure carcinogenicity relationship for detecting structural alerts in nitroso-compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* **221**:189-202.
- Hellwig M, Witte S, Henle T. 2016. Free and protein-bound maillard reaction products in beer: method development and a survey of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:7234-7243.
- Hill AE, Stewart GG. 2019. Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation* DOI: 10.3390/fermentation5010022.
- Horák T, Jurková M, Čulík J, Čejka P, Kellner V. 2002. Využití gelové permeační chromatografie pro stanovení organických polutantů ve sladovnickém ječmeni. *Kvasný Průmysl* **48**:58-61.
- Hough JS. 1991. *The biotechnology of malting and brewing*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hřivna L, Radoch T, Gregor T, Šottníková V, Cerkal R, Ryant P, Prokeš J. 2011. Vliv aplikace N a S na chemické složení zrna ječmene a sladu. *Kvasný Průmysl* **57**:223-230.
- Huang J, Chen Z, Yuan J, Peng Y. 2016. Recent advances in highly selective applications of nitroso compounds. *Asian Journal of Organic Chemistry* **5**:951-960.

- Hulín P, Dostálek P, Hochel I. 2008. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy* **102**:327-337.
- Cho H-J, Do B-K, Shim S-M, Kwon H, Lee D-H, Nah A-H, Choi Y-J, Lee S-Y. 2013. Determination of cyanogenic compounds in edible plants by ion chromatography. *Toxicological Research* **29**:143-147.
- Inami K, Shiino J, Hagiwara S, Takeda K, Mochizuki M. 2015. Transnitrosation of non-mutagenic N-nitrosoproline forms mutagenic N-nitroso-N-methylurea. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**:3297-3302.
- Jääskeläinen A-S, Holopainen-Mantila U, Tamminen T, Vuorinen T. 2013. Endosperm and aleurone cell structure in barley and wheat as studied by optical and Raman microscopy. *Journal of Cereal Science* **57**:543-550.
- Jain D, Chaudhary P, Janmeda P. 2020. Carcinogenic effects of N-nitroso compounds in the environment. *Environmental Conservation Journal* **21**:25-41.
- Johnson P, Pfab J, Tricker AR, Key PE, Massey RC. 1987. An investigation into the apparent total N-nitroso compounds in malts. *Journal of the Institute of Brewing* **93**:319-321.
- Joung W-Y, Kim S-J, Kim B-G, Hurh B-S, Baek H-H. 2018. Effect of roasting degree of barley on aroma characteristics of *boricha*. *Korean Journal of Food Science and Technology* **50**:123-131.
- Karlović A, Jurić A, Ćorić N, Habschied K, Krstanović V, Mastanjević K. 2020. By-products in the malting and brewing industries—re-usage possibilities. *Fermentation* DOI: 10.3390/fermentation6030082.
- Kaur KD, Jha A, Sabikhi L, Singh AK. 2014. Significance of coarse cereals in health and nutrition: a review. *Journal of Food Science and Technology* **51**:1429-1441.
- Kaushik G, Satya S, Naik SN. 2009. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – a review. *Food Research International* **42**:26-40.
- Kellner V, Čulík J, Basařová G. 1982. Problematika N-nitrosaminů – vznik a vlastnosti. *Kvasný Průmysl* **28**:7-11.
- Kellner V, Čulík J, Basařová G. 1983. N-nitrosaminy ve sladu - vznik a odstraňování. *Kvasný Průmysl* **29**:28-31.
- Kellner V, Čulík J, Veselý L, Špinar B. 1991. Problematika celkových N-nitrososloučenin. *Kvasný Průmysl* **37**:193-196.
- Kellner V. 1994. Nejdůležitější cizorodé látky z pohledu pivovarsko-sladařského průmyslu. *Kvasný Průmysl* **40**:42-45.
- Kobayashi J. 2018. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: a review. *Nitric Oxide* **73**:66-73.
- Kok YJ, Ye L, Muller J, Ow DS-W, Bi X. 2019. Brewing with malted barley or raw barley: what makes the difference in the processes? *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**:1059-1067.
- Kosař K, Procházka S. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha.
- Krotov I. 2011. Customs Union between the Republic of Belarus, the Republic of Kazakhstan and the Russian Federation within the framework of the Eurasian Economic Community. *World Customs Journal* **5**:129-138.

- Kubacki SJ, Havery DC, Fazio T. 1989. Volatile N-nitrosamines in Polish malt and beer. *Food Additives and Contaminants* **6**:29-34.
- Kunz T, Suárez AF, Hughes P, Methner F-J. 2010. Development and correlation between the organic radical concentration in different malt types and oxidative beer stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **68**:107-113.
- Kunze W. 2010. *Technology brewing & malting*. VLB, Berlin.
- Langenaeken NA, De Schepper CF, De Schutter DP, Courtin CM. 2020. Carbohydrate content and structure during malting and brewing: a mass balance study. *Journal of the Institute of Brewing* **126**:253-262.
- Lee HS. 2019. Literature compilation of volatile N-nitrosamines in processed meat and poultry products - an update. *Food Additives and Contaminants* **36**:1491-1500.
- Lee J, Chen L, West AH, Richter-Addo GB. 2002. Interactions of organic nitroso compounds with metals. *Chemical Reviews* **102**:1019-1065.
- Lenk M, et al. 2019. Pipecolic acid is induced in barley upon infection and triggers immune responses associated with elevated nitric oxide accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**:1303-1313.
- Lijinsky W. 1986. The significance of N-nitroso compounds as environmental carcinogens. *Journal of Environmental Science and Health* **4**:1-45.
- Linnett JW, Rosenberg RM. 1964. Structure and properties of nitroso compounds. *Tetrahedron* **20**:53-66.
- Loeppky RN, Yu H. 2004. Amidine nitrosation. *The Journal of Organic Chemistry* **69**:3015-3024.
- Lopatin OP. 2020. Integrated diesel engine toxicity reduction system. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering DOI: 10.1088/1757-899X/734/1/012199.
- López-Rodríguez R, McManus JA, Murphy NS, Ott MA. 2020. Pathways for N-nitroso compound formation: secondary amines and beyond. *Organic Process Research & Development* **24**:1558-1585.
- Ma L, Feng X, Wang S. 2018. Nitrate and nitrite in health and disease. *Aging and Disease* **9**:938-945.
- Ma Z, Marsolais F, Bernardis MA, Sumarah MW, Bykova NV, Igamberdiev AU. 2016. Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Science* **248**:37-44.
- Malečková M, Vrzal T, Olšovská J, Sobotníková J. 2021. Characterization of nitrite-related reaction products in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* DOI: 10.1021/acs.jafc.1c04421.
- Malečková M. 2018. Vývoj miniaturizované extrakční metody pro screening netěkavých nitrososloučenin ve sladu pomocí GC-NCD [MSc. Thesis]. Univerzita Karlova, Praha.
- Mallett J. 2014. *Malt: a practical guide from field to brewhouse*. Brewers Publications, Boulder. [Elektronická monografie].
- Massey R, Dennis MJ, Pointer M, Key PE. 1990. An investigation of the levels of N-nitrosodimethylamine, apparent total N-nitroso compounds and nitrate in beer. *Food Additives and Contaminants* **7**:605-615.
- Matoulková D, Vontrobová E, Brožová M, Kubizniaková P. 2018. Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie řádu *Enterobacterales*. *Kvasný Průmysl* **64**:161-166.

- Meng T, Nakamura E, Irino N, Joshi KR, Devkota HP, Yahara S, Kondo R. 2015. Effects of irradiation with light of different photon densities on the growth of young green barley plants. *Agricultural Sciences* **6**:208-216.
- Mikulíková R, Sobotová K. 2007. Determination of acrylamide in malt with GC/MS. *Acta Chimica Slovenica* **54**:98-101.
- Ministerstvo zdravotnictví. 2004. Vyhláška č. 304 ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. Česká republika.
- Ministerstvo zdravotnictví. 2004. Vyhláška č. 305 ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. Česká republika.
- Mokhele B, Zhan X, Yang G, Zhang X. 2012. Review: nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. *Canadian Journal of Plant Science* **92**:399-405.
- Montesano R, Bartsch H. 1976. Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards. *Mutation Research* **32**:179-228.
- Mosher M, Trantham K. 2017. *Brewing science: a multidisciplinary approach*. Springer, Cham. [Elektronická monografie].
- Neylon E, Arendt EK, Lynch KM, Zannini E, Bazzoli P, Monin T, Sahin AW. 2020. Rootlets, a malting by-product with great potential. *Fermentation* DOI: 10.3390/fermentation6040117.
- Nielsen KA, Olsen CE, Pontoppidan K, Møller BL. 2002. Leucine-derived cyano glucosides in barley. *Plant Physiology* **129**:1066-1075.
- Nováková P. 2011. *Derivatizace v plynové chromatografii* [Msc. Thesis]. Univerzita Palackého, Olomouc.
- O'Farrel DD. 1987. Use of nitrogen dioxide after steeping to inhibit formation of nitrosamines in malt. *Journal of the Institute of Brewing* **93**:33-36.
- Olkku J, Kotaviita E, Salmenkallio-Marttila M, Sweins H, Home S. 2005. Connection between structure and quality of barley husk. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **63**:17-22.
- Olšovská J, Matoulková D, Čejka P, Jurková M. 2014. Pivo a zdraví. *Kvasný Průmysl* **60**:174-181.
- Özcan MM, Aljuhaimi F, Uslu N. 2018. Effect of malt process steps on bioactive properties and fatty acid composition of barley, green malt and malt grains. *Journal of Food Science and Technology* **55**:226-232.
- Park J, Seo J, Lee J, Kwon H. 2015. Distribution of seven N-nitrosamines in food. *Toxicological Research* **31**:279-288.
- Parmar D, Burka LT. 1991. Metabolism and disposition of cyclohexanone oxime in male F-344 rats. *Drug Metabolism and Disposition* **19**:1101-1107.
- Pascari X, Ramos AJ, Marín S, Sanchís V. 2018. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International* **103**:121-129.
- Piacentini KC, Savi GD, Pereira MEV, Scussel VM. 2015. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chemistry* **187**:204-209.

- Pollock JRA. 1981. Aspects of nitrosation in malts and beers. I. Examination of malts for presence of N-nitrosoproline, N-nitrososarcosine and N-nitrosopipercolinic acid. *Journal of the Institute of Brewing* **87**:356-359.
- Preedy VR. 2009. *Beer in health and disease prevention*. Elsevier, Amsterdam. [Elektronická monografie].
- Preussmann R. 1984. Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften* **71**:25-30.
- Prokeš J. 2000. Technologický význam dusíkatých látek v ječmeni a sladu. *Kvasný Průmysl* **46**:277-279.
- Psota V, Dvořáčková O, Musilová M, Nečas M. 2020. Barley varieties registered in the Czech Republic after the harvest of 2019. *Kvasný Průmysl* **66**:277-286.
- PubChem. 2021. Explore Chemistry. National Institutes of Health. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed November 2021).
- Rabiu S, Abubakar MG, Sahabi DM, Makusidi MA, Dandare A, Bello JH. 2021. Benzoic acid based beverages: health implications. *Asian Food Science Journal* **20**:93-105.
- Rostkowska K, Zwierz K, Róžański A, Moniuszko-Jakoniuk J, Roszczenko A. 1998. Formation and metabolism of N-nitrosamines. *Polish Journal of Environmental Studies* **7**:321-325.
- Russell I, Stewart G. 2014. *Whisky: technology, production and marketing*. Academic Press, Kidlington. [Elektronická monografie].
- Serna-Saldivar SO. 2010. *Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes*. CRC Press, Boca Raton. [Elektronická monografie].
- Smith NA. 1994. Cambridge prize lecture nitrate reduction and N-nitrosation in brewing. *Journal of the Institute of Brewing* **100**:347-355.
- Solecki J, Kruk M. 2011. Determination of ^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{40}K radionuclides in food grain and commercial food grain products. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **289**:185-190.
- Soriano-Disla JM, Gómez I, Navarro-Pedreño J, Jordán MM. 2014. The transfer of heavy metals to barley plants from soils amended with sewage sludge with different heavy metal burdens. *Journal of Soils and Sediments* **14**:687-696.
- Steiner E, Gastl M, Becker T. 2011. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. *European Food Research and Technology* **232**:191-204.
- Stewart GG, Russell I, Anstruther A. 2018. *Handbook of brewing*. CRC Press, Boca Raton.
- Svensson B, Mundy J, Gibson RM, Svendsen IB. 1985. Partial amino acid sequences of α -amylase isozymes from barley malt. *Carlsberg Research Communications* **50**:15-22.
- Tanner GJ, Blundell MJ, Colgrave ML, Howitt CA. 2016. Creation of the first ultra-low gluten barley (*Hordeum vulgare* L.) for coeliac and gluten-intolerant populations. *Plant Biotechnology Journal* **14**:1139-1150.
- The Brewers of Europe. 2020. *European Beer Trends Statistics Report 2020 Edition*. The Brewers of Europe, Brussels. Available from <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2020/european-beer-trends-2020.pdf> (Accessed November 2021).

- Thresher A, Foster R, Ponting DJ, Stalford SA, Tennant RE, Thomas R. 2020. Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104749.
- Trégner T, Trejbal J. 2017. Vznik N-nitrosoaminů při oxidaci terciárních aminů peroxidem vodíku. *Chemické listy* **111**:17-21.
- Tricker AR, Kubacki SJ. 1992. Review of the occurrence and formation of non-volatile N-nitroso compounds in foods. *Food Additives and Contaminants* **9**:39-69.
- Tricker AR, Preussmann R. 1991. Volatile and nonvolatile nitrosamines in beer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **117**:130-132.
- Tsikas D, Raida M, Sandmann J, Rossa S, Forssmann W-G, Frölich JC. 2000. Electrospray ionization mass spectrometry of low-molecular-mass S-nitroso compounds and their thiols. *Journal of Chromatography B* **742**:99-108.
- Vedral J. 2011. Česko-anglický pivovarský slovník. VJV, Praha.
- Ventura FF, Mendes LF, Oliveira AG, Bazito RC, Bechara EJH, Freire RS, Stevani CV. 2020. Evaluation of Phenolic Compound Toxicity Using a Bioluminescent Assay with the Fungus *Gerronema viridilucens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **39**:1558-1565.
- Vrzal T, Olšovská J. 2016. N-nitrosaminy v 21. století. *Kvasný Průmysl* **62**:2-8.
- Vrzal T, Olšovská J. 2019. Pyrolytic profiling nitrosamine specific chemiluminescence detection combined with multivariate chemometric discrimination for nontargeted detection and classification of nitroso compounds in complex samples. *Analytica Chimica Acta* **1059**:136-145.
- Wainright T. 1986. The chemistry of nitrosamine formation: relevance to malting and brewing. *Journal of the Institute of Brewing* **92**:49-64.
- Wainwright T. 1986. Nitrosamines in malt and beer. *Journal of the Institute of Brewing* **92**:73-80.
- Wild D. 1990. A novel pathway to the ultimate mutagens of aromatic amino and nitro compounds. *Environmental Health Perspectives* **88**:27-31.
- Yamada T, Yamamoto M, Tanimura A. 1981. Reaction of pyroglutamic acid with sodium nitrite. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **22**:404-408.
- Yamamoto H, Momiyama N. 2005. Rich chemistry of nitroso compounds. *Chemical Communications* DOI: 10.1039/b503212c.
- Yigit N, Velioglu YS. 2020. Effects of processing and storage on pesticide residues in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60**:3622-3641.
- Zhu F. 2019. Proanthocyanidins in cereals and pseudocereals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**:1521-1533.
- Zhuang S, Shetty R, Hansen M, Fromberg A, Hansen PB, Hobley TJ. 2017. Brewing with 100 % unmalted grains: barley, wheat, oat and rye. *European Food Research and Technology* **243**:447-454.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- ATNC – zdánlivé celkové N-nitrososloučeniny (z angl. Apparent Total N-nitroso Compounds)
- AZL – Analytická zkušební laboratoř
- BSTFA – N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
- CE – kolizní energie (z angl. Collision Energy)
- DMA – dimethylamin
- DMS – dimethylsulfid
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DON – deoxynivalenol
- EBC – Evropská pivovarská konvence (z angl. European Brewery Convention)
- EC₅₀ – efektivní koncentrace (z angl. Effective Concentration)
- FAN – volný aminodusík (z angl. Free Amino Nitrogen)
- FUM – fumonisiny
- GC – plynová chromatografie (z angl. Gas Chromatography)
- GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
- GC-MS/MS – plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
- GC-NCD – plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí selektivní pro dusík
- IS – interní standard
- LTPs – proteiny přenášející lipidy (z angl. Lipid Transfer Proteins)
- MRM – mód sledování mnoha reakcí (z angl. Multiple Reaction Monitoring)
- MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. Tandem Mass Spectrometry)
- NDBA – N-nitrosodinbutylamin
- NDEA – N-nitrosodiethylamin
- NDMA – N-nitrosodimethylamin
- NDPA – N-nitrosodi-*n*-propylamin
- NHMTCA – N-nitroso-2-(hydroxymethyl)thiazolidin-4-karboxylová kyselina
- NHMTHZ – N-nitroso-2-(hydroxymethyl)thiazolidin
- NHPRO – N-nitrosohydroxyprolin
- NHPYR – N-nitrosohydroxypyrrolidin
- NIST – knihovna hmotnostních spekter (z angl. National Institute of Standards and Technology)
- NMEA – N-nitrosomethylamin
- NMOCA – N-nitroso-5-methyloxazolidin-4-karboxylová kyselina
- NMOR – N-nitrosomorfolin
- NMPhA – N-nitrosomethylfenylamin
- NMTCA – N-nitroso-2-methylthiazolidin-4-karboxylová kyselina
- NMU – N-nitroso-N-methylmočovina
- NOCA – N-nitrosooxazolidin-4-karboxylová kyselina
- NPIC – N-nitrosopipekolová kyselina
- NPIP – N-nitrosopiperidin
- NPRO – N-nitrosoprolin
- NPYR – N-nitrosopyrrolidin

NSAR – N-nitrososarkosin
NTCA – N-nitrosothiazolidin-4-karboxylová kyselina
PAHs – polyaromatické uhlovodíky (z angl. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
PCA – analýza hlavních komponent (z angl. Principal Component Analysis)
PCBs – polychlorované bifenylly (z angl. Polychlorinated Biphenyls)
POPs – perzistentní organické polutanty (z angl. Persistent Organic Pollutants)
RT – retenční čas/y (z angl. Retention Time)
SIM – mód sledování vybraných iontů (z angl. Selected Ion Monitoring)
sken – mód skenování s využitím pouze 1. kvadrupólu
SMM – S-methylmethionin
SPE – extrakce na pevné fázi (z angl. Solid Phase Extraction)
TMS – trimethylsilyl derivát
unk – neznámý analyt (z angl. Unknown)
VÚPS – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Praze (angl. Research Institute of Brewing and Malting in Prague)

Poznámka:

- České ekvivalenty anglické pivovarské terminologie byly překládány podle Vedral (2011)
- Pokud není uvedeno jinak, chemické strukturní vzorce uvedené v této práci byly generovány přes kanonický SMILES kód získaný v databázi PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) v programu ACD/ChemSketch (Freeware) 2020.1.2

10 Seznam obrázků, tabulek a příloh

Seznam obrázků

Obr. 1: Anatomie ječné obilky.....	12
Obr. 2: Technologický postup výroby sladu.....	14
Obr. 3: Zdroje environmentální expozice N-nitrososloučenin	22
Obr. 4: Kyselá katalyzovaná tvorba N-nitrosachních činidel	24
Obr. 5: Obecná struktura N-nitrosaminů	26
Obr. 6: Zástupci těkavých N-nitrosaminů.....	26
Obr. 7: Prekurzory NDMA	27
Obr. 8: Zástupci netěkavých N-nitrosaminů.....	28
Obr. 9: Kyanogenní glykosid.....	30
Obr. 10: Schéma duálního nástřiku.....	37
Obr. 11: Struktury sledovaných analytů	43
Obr. 12: Pravděpodobné analyty	43
Obr. 13: Struktury prekurzorů	44
Obr. 14: Porovnání ploch píků u plzeňského sladu a jeho uměle nitrosovaných analogů	47
Obr. 15: MRM chromatogram uměle nitrosovaného plzeňského sladu „za horka“ (37015N)	48
Obr. 16: MRM chromatogram komerčně dostupného plzeňského sladu (63415).....	48
Obr. 17: Teplotní mapa porovnávající jednotlivé vzorky	50
Obr. 18: Teplotní mapa porovnávající jednotlivé analyty	54
Obr. 19: Sutinový graf	55
Obr. 20: PCA druhy sladů 2:1	56
Obr. 21: PCA druhy sladů 2:3	57
Obr. 22: PCA země původu 2:1	58
Obr. 23: PCA země původu 2:3.....	58
Obr. 24: Sutinový graf (redukováno).....	59
Obr. 25: PCA druhy sladů 2:1 (redukováno).....	60
Obr. 26: PCA druhy sladů 3:1 (redukováno).....	60
Obr. 27: PCA země původu 2:1 (redukováno)	61
Obr. 28: Histogram koncentrací NDMA u jednotlivých druhů sladů.....	62
Obr. 29: Porovnání koncentrací NDMA v absolutních hodnotách.....	62
Obr. 30: NPRO u plzeňských a mnichovských sladů.....	63
Obr. 31: Všechny MRM chromatogramy sladin analyzované před závadou přístroje.....	64

Obr. 32: Všechny MRM chromatogramy sladin analyzované po opravě přístroje	64
Obr. 33: „Prázdný“ MRM chromatogram kongresní sladiny připravené z uměle nitrosovaného sladu „za horka“ (37015N)	65
Obr. 34: Všechny MRM chromatogramy sladů příslušných sladin analyzované před závadou přístroje (duplicitní analýza)	65
Obr. 35: Všechny MRM chromatogramy sladů příslušných sladin analyzované po opravě přístroje	66

Seznam tabulek

Tab. 1: Charakteristika typů sladů	18
Tab. 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných sladových náhražek	19
Tab. 3: Formy oxidů dusíku	23
Tab. 4: LD ₅₀ (orální expozice) pro vybrané N-nitrososloučeniny u potkanů	33
Tab. 5: Četnost jednotlivých matric, které byly analyzovány	35
Tab. 6: Původ matric	36
Tab. 7: Četnost jednotlivých sladů, ze kterých byla připravena kongresní sladina	39
Tab. 8: Sledované analyty, jejich RT, MRM přechody a CE	42
Tab. 9: Zastoupení jednotlivých vzorků (v chromatogramech) v rámci <i>Obr. 17</i>	51

Seznam příloh

Příloha I: Srovnání průměrného chemického složení zrna ječmene, pšenice a čiroku s jejich slady	I
Příloha II: Analyzované vzorky a jejich parametry	II
Příloha III: Regulační diagram	VIII
Příloha IV: Analyzované vzorky sladů a jejich parametry při experimentech s kongresní sladinou	IX
Příloha V: Hmotnostní spektra strukturně charakterizovaných analytů	X

11 Samostatné přílohy

Příloha I: Srovnání průměrného chemického složení zrna ječmene, pšenice a čiroku s jejich slady

	<i>ječmen</i>		<i>pšenice</i>		<i>čirok</i>	
	<i>zrno</i>	<i>slad</i>	<i>zrno</i>	<i>slad</i>	<i>zrno</i>	<i>slad</i>
hmotnost obilky (mg)	34-39	30,5-35,5	27-32	25-30	25-35	21-30
vlhkost (%)	12	5	12	6	13	8
škrob (%)	63-65	58-60	71	59,6	68,7	58,9
redukující cukry (%)	1,2-1,7	5-7,3	2,3	8,7	1,7	6,3
fruktóza	4,1	7,1	-	-	-	-
(% z rozpustných cukrů)						
glukóza	2,4	16,9	-	-	-	-
(% z rozpustných cukrů)						
sacharóza	45,5	48,2	-	-	-	-
(% z rozpustných cukrů)						
maltóza	0	9,4	-	-	-	-
(% z rozpustných cukrů)						
maltotrióza	0	5,4	-	-	-	-
(% z rozpustných cukrů)						
fruktosany	34,2	12,9	-	-	-	-
(% z rozpustných cukrů)						
celkový dusík (%)	1,5-2	1,5-2	1,9	1,8	1,5	1,4
rozpustný dusík	11	35	12	51	5	19,33
(% z celkového dusíku)						
rozpustné gumovité látky (%)	1,25	3	-	-	-	-
hemicelulóza	9	7	-	-	-	-
lipidy (%)	2,5	2,5	2,8	2,7	3,5	3,3
minerální látky (%)	2	2,2	1,8	1,9	1,7	1,8
diastatická	55	150	-	41	-	-
mohutnost (°L) ^a						
aktivita α-amylázy ^b	stopy	25	-	-	-	-

^a – stupeň Lintnera: množství redukovaných sloučenin vypočtených jako maltóza, vzniklá z rozpustného škrobu obsaženého v 25 g sladu za 30 minut při 20 °C

^b – množství rozpustného škrobu dextrinizovaného 1 g sladu za 1 h při 20 °C

poznámka: vyjádřeno v sušině

Zdroj: upraveno podle Serna-Saldivar 2010

Příloha II: Analyzované vzorky a jejich parametry

<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (µg/kg)</i>
1.	61936	ječmen	Česko	<0,2
2.	61944	plzeňský slad	Česko	4,5
3.	61941	plzeňský slad	Česko	1,4
4.	61939	ječmen	Česko	<0,2
5.	61949	pšeničný slad	Česko	<0,2
6.	61950	mnichovský slad	Česko	1,2
7.	61938	ječmen	Česko	<0,2
8.	61948	plzeňský slad	Česko	1
9.	60133	mnichovský slad	Česko	0,6
10.	61942	plzeňský slad	Česko	<0,2
11.	61846	plzeňský slad	Česko	-
12.	61937	ječmen	Česko	<0,2
13.	61946	karamelový slad	Česko	0,6
14.	61947	barvící slad	Česko	<0,2
15.	61943	plzeňský slad	Česko	1,7
16.	61945	mnichovský slad	Česko	4,5
17.	37015N	plzeňský slad (nitrosovaný „za horka“)	Česko	-
18.	37015	plzeňský slad (bez nitrosace) – postup „za studena“	Česko	0,6
19.	62685	plzeňský slad	Česko	0,2
20.	62664	plzeňský slad	Polsko	1,2
21.	62659	plzeňský slad	Česko	0,7
22.	62665	pšeničný slad	Česko	<0,2
23.	62684	plzeňský slad	Česko	1,4
24.	62660	plzeňský slad	Česko	1,1
25.	62882	karamelový slad	Česko	<0,2
26.	62881	plzeňský slad	Česko	8,2
27.	62883	mnichovský slad	Česko	1,6
28.	62865	plzeňský slad	Česko	<0,2
29.	62787	plzeňský slad	Francie	<0,2
30.	62808	plzeňský slad	Česko	0,2
31.	62795	plzeňský slad	Srbsko	0,6
32.	62796	plzeňský slad	Srbsko	0,4
33.	62786	plzeňský slad	Francie	0,4
34.	62805	plzeňský slad	Česko	<0,2

poznámka: - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (µg/kg)</i>
35.	62806	plzeňský slad	Česko	0,6
36.	62807	plzeňský slad	Česko	0,2
37.	62666	plzeňský slad	Česko	0,5
38.	62686	-	Česko	1,2
39.	62687	-	Česko	<0,2
40.	62688	-	Česko	1,4
41.	62689	-	Česko	0,3
42.	62690	pšeničný slad	Česko	<0,2
43.	62667	-	Česko	0,6
44.	62668	-	Slovensko	<0,2
45.	62680	-	Polsko	<0,2
46.	62681	-	Polsko	<0,2
47.	62682	-	Polsko	<0,2
48.	62683	-	Polsko	<0,2
49.	62691	mnichovský slad	Česko	3,9
50.	62692	mnichovský slad	Česko	3,3
51.	62693	mnichovský slad	Česko	5,5
52.	62694	mnichovský slad	Česko	0,5
53.	62695	mnichovský slad	Česko	8
54.	62797	-	Česko	0,6
55.	60664	plzeňský slad	Polsko	3,3
56.	37022	mnichovský slad	Česko	4,1
57.	TCV348J	ječmen	Česko	-
58.	TCV348S	plzeňský slad	Česko	-
59.	TCV349J	ječmen	Česko	-
60.	TCV349S	plzeňský slad	Česko	-
61.	37016	plzeňský slad	Česko	1,2
62.	37018	mnichovský slad	Česko	1,1
63.	37021	mnichovský slad	Česko	4,7
64.	37023	mnichovský slad	Česko	1,8
65.	49015	barvicí slad	Česko	<0,2
66.	NAK	nakuřovaný slad	-	-
67.	37015NS	plzeňský slad (nitrosovaný „za studena“)	Česko	-
68.	37014	plzeňský slad	Česko	2,2
69.	37017	plzeňský slad	Česko	1
70.	37019	mnichovský slad	Česko	5,5
71.	37020	mnichovský slad	Česko	1,1
72.	51788	mnichovský slad	Slovensko	20,5

poznámka: - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (µg/kg)</i>
73.	35904	plzeňský slad	Česko	0,5
74.	40919	mnichovský slad	Česko	10,2
75.	41077	mnichovský slad	Česko	5,1
76.	41078	karamelový slad	Česko	<0,2
77.	41269	plzeňský slad	Česko	0,8
78.	41270	plzeňský slad	Česko	0,3
79.	37023SK	sladový květ	-	-
80.	63041	mnichovský slad	Česko	12,8
81.	40479	mnichovský slad	Česko	1,4
82.	41076	plzeňský slad	Česko	3
83.	41271	pšeničný slad	Česko	<0,2
84.	62791	-	-	0,6
85.	62790	-	-	0,9
86.	63371	karamelový slad	Česko	<0,2
87.	63415	plzeňský slad	Česko	0,6
88.	63466	-	Česko	<0,2
89.	63467	-	Česko	<0,2
90.	63279	-	Slovensko	<0,2
91.	63687	plzeňský slad	Česko	0,3
92.	63721	mnichovský slad	Česko	0,6
93.	63722	mnichovský slad	Česko	2,6
94.	63723	mnichovský slad	Česko	3,2
95.	63763	plzeňský slad	Česko	0,8
96.	63278	-	Slovensko	0,3
97.	63462	-	Slovensko	0,5
98.	63675	-	Slovensko	1,9
99.	63706	plzeňský slad	Česko	0,7
100.	63725	plzeňský slad	Srbsko	<0,2
101.	63727	plzeňský slad	Srbsko	0,6
102.	62980	karamelový slad	Česko	<0,2
103.	63036	plzeňský slad	Česko	0,6
104.	63040	mnichovský slad	Česko	6,5
105.	63188	plzeňský slad	Česko	1,4
106.	63568	-	Polsko	0,9
107.	63649	karamelový slad	Česko	<0,2
108.	62940	-	Česko	0,5
109.	62944	-	Česko	0,9
110.	62946	-	Česko	<0,2
111.	63103	-	Česko	0,2
112.	63105	plzeňský slad	Srbsko	0,2

poznámka: - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (µg/kg)</i>
113.	63651	plzeňský slad	Česko	0,8
114.	62941	-	Česko	<0,2
115.	62942	-	Česko	0,5
116.	63038	-	Česko	1,2
117.	63104	plzeňský slad	Srbsko	0,2
118.	63650	plzeňský slad	Česko	0,7
119.	63729	plzeňský slad	Česko	0,9
120.	63181	-	Česko	<0,2
121.	63189	plzeňský slad	Česko	0,4
122.	63190	plzeňský slad	Česko	0,7
123.	63461	-	Slovensko	0,2
124.	63707	plzeňský slad	Česko	1
125.	63720	-	Česko	0,6
126.	63465	plzeňský slad	Srbsko	0,3
127.	63463	-	Slovensko	0,2
128.	63353	-	Česko	<0,2
129.	63230	plzeňský slad	Česko	1,1
130.	63229	plzeňský slad	Česko	0,5
131.	63191	plzeňský slad	Česko	1
132.	63384	plzeňský slad	Česko	0,6
133.	63815	-	Polsko	<0,2
134.	63904	plzeňský slad	Česko	0,6
135.	63905	plzeňský slad	Česko	0,5
136.	63906	mnichovský slad	Česko	0,7
137.	63907	mnichovský slad	Česko	1,6
138.	63914	plzeňský slad	Česko	1
139.	63915	plzeňský slad	Česko	0,3
140.	63916	plzeňský slad	Česko	0,2
141.	63917	plzeňský slad	Česko	1,2
142.	63922	pšeničný slad	Česko	<0,2
143.	63923	mnichovský slad	Česko	<0,2
144.	64217	-	-	-
145.	64218	-	-	-
146.	64088	plzeňský slad	Česko	0,7
147.	64150	plzeňský slad	Česko	<0,2
148.	64223	plzeňský slad	Česko	<0,2
149.	64240	-	Česko	0,4
150.	64026	plzeňský slad	Česko	0,6
151.	64027	plzeňský slad	Česko	<0,2
152.	64149	plzeňský slad	Česko	<0,2

poznámka: - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

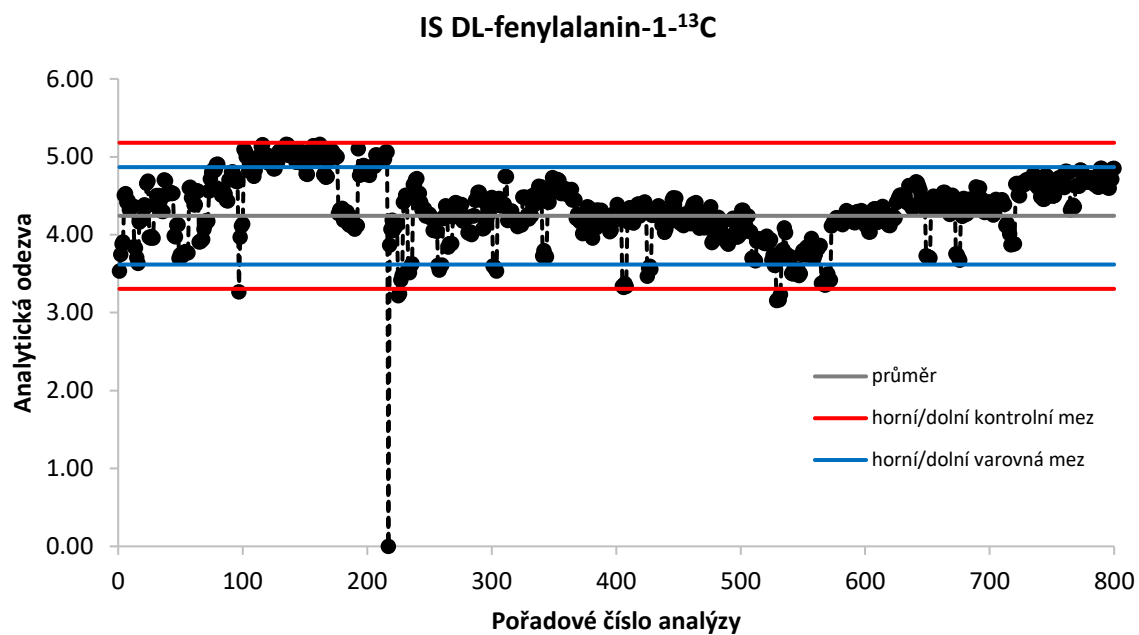
<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (µg/kg)</i>
153.	64186	plzeňský slad	Česko	0,5
154.	64220	plzeňský slad	Slovensko	<0,2
155.	64222	plzeňský slad	Česko	0,4
156.	63821	-	-	0,3
157.	64083	plzeňský Slad	Česko	1,6
158.	64085	plzeňský slad	Česko	<0,2
159.	64086	plzeňský slad	Česko	0,3
160.	64087	plzeňský slad	Česko	<0,2
161.	64119	plzeňský slad	Slovensko	1,4
162.	63820	-	-	0,4
163.	63962	karamelový slad	Česko	<0,2
164.	64022	-	Česko	<0,2
165.	64023	-	Česko	0,5
166.	64118	plzeňský slad	Slovensko	1,6
167.	64219	plzeňský slad	Slovensko	1,7
168.	63966	plzeňský slad	Česko	0,4
169.	63963	karamelový slad	-	<0,2
170.	63967	plzeňský slad	Česko	0,6
171.	64024	plzeňský slad	Česko	0,2
172.	64025	plzeňský slad	Česko	0,4
173.	64095	plzeňský slad	Česko	0,6
174.	63964	plzeňský slad	Česko	0,5
175.	63965	plzeňský slad	Česko	0,3
176.	64349	-	Česko	<0,2
177.	64350	-	Česko	1,7
178.	64351	-	Česko	0,6
179.	64352	-	Česko	1,3
180.	64282	karamelový slad	Česko	<0,2
181.	64346	plzeňský slad	Česko	<0,2
182.	64347	plzeňský slad	Česko	0,2
183.	64348	-	Česko	0,3
184.	64455	plzeňský slad	Slovensko	3,1
185.	64456	plzeňský slad	Slovensko	0,2
186.	64354	pšeničný slad	Česko	<0,2
187.	64421	plzeňský slad	Česko	0,7
188.	64422	plzeňský slad	Česko	<0,2
189.	64423	plzeňský slad	Česko	1,5
190.	64424	plzeňský slad	Česko	1,5
191.	64454	plzeňský slad	Slovensko	4,4
192.	64353	mnichovský slad	Česko	1,3

poznámka: - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (μg/kg)</i>
193.	64388	plzeňský slad	Česko	<0,2
194.	64506	plzeňský slad	Srbsko	0,6
195.	64507	plzeňský slad	Srbsko	0,6
196.	64508	plzeňský slad	Česko	0,3
197.	64509	plzeňský slad	Česko	<0,2
198.	62138	plzeňský slad	Česko	2,2
199.	63196	-	Slovensko	-
200.	50317	plzeňský slad	Česko	0,6

poznámka: - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

Příloha III: Regulační diagram

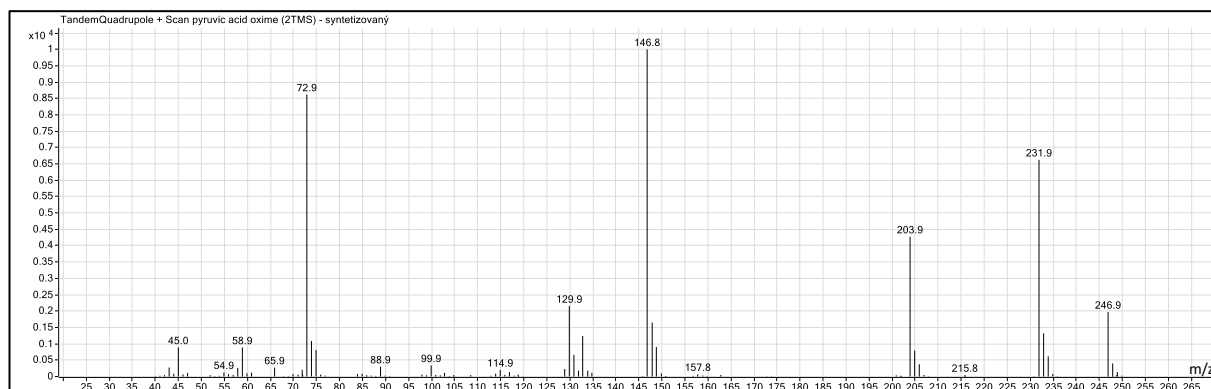


Příloha IV: Analyzované vzorky sladů a jejich parametry při experimentech s kongresní sladinou

<i>pořadové č. analýzy</i>	<i>označení</i>	<i>specifikace matrice</i>	<i>země původu</i>	<i>NDMA (μg/kg)</i>
1.	65585KS	plzeňský slad	Slovensko	0,9
2.	65361KS	-	Česko	<0,2
3.	65833KS	plzeňský slad	Česko	0,6
4.	65835KS	plzeňský slad	Česko	0,6
5.	65912KS	-	Slovensko	5,8
6.	65586KS	plzeňský slad	Slovensko	<0,2
7.	65298KS	mnichovský slad	Česko	1,3
8.	65299KS	mnichovský slad	Česko	1,5
9.	65761KS	mnichovský slad	Česko	0,8
10.	65762KS	mnichovský slad	Česko	1,8
11.	65792KS	mnichovský slad	Česko	1,6
12.	37022KS	mnichovský slad	Česko	4,1
13.	37015NKS	plzeňský slad (nitrosovaný „za horka“)	Česko	-

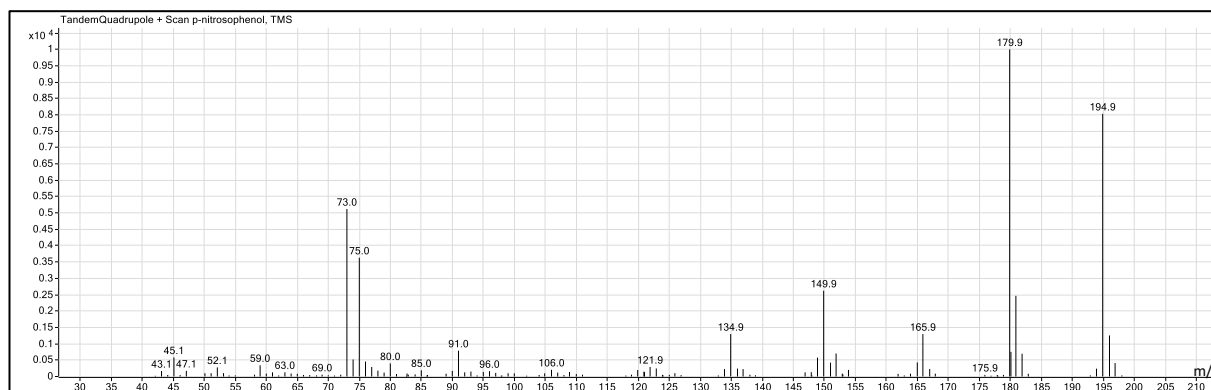
poznámka: KS – vzorek sladu, ze kterého byla připravena kongresní slatina; - = chybějící popis/data; <0,2 = mez detekce

Příloha V: Hmotnostní spektra strukturně charakterizovaných analytů



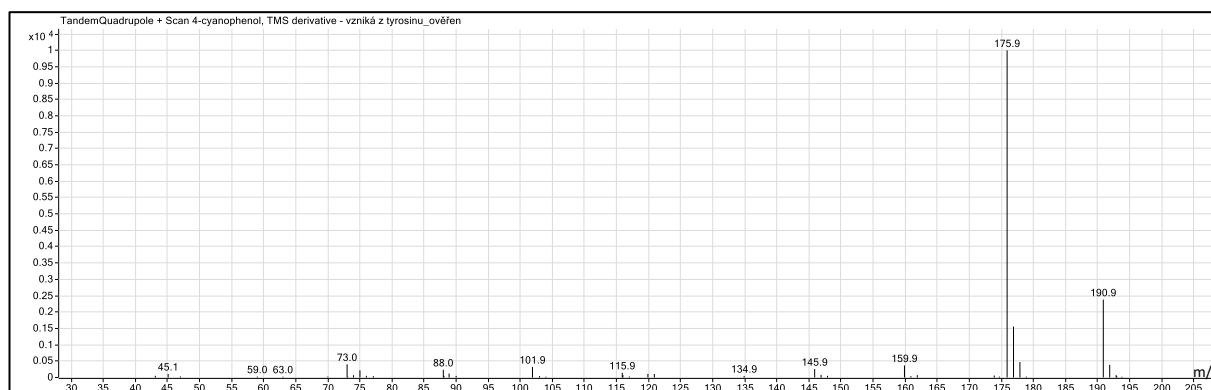
MS spektrum – oxim kyseliny pyrohroznové

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS



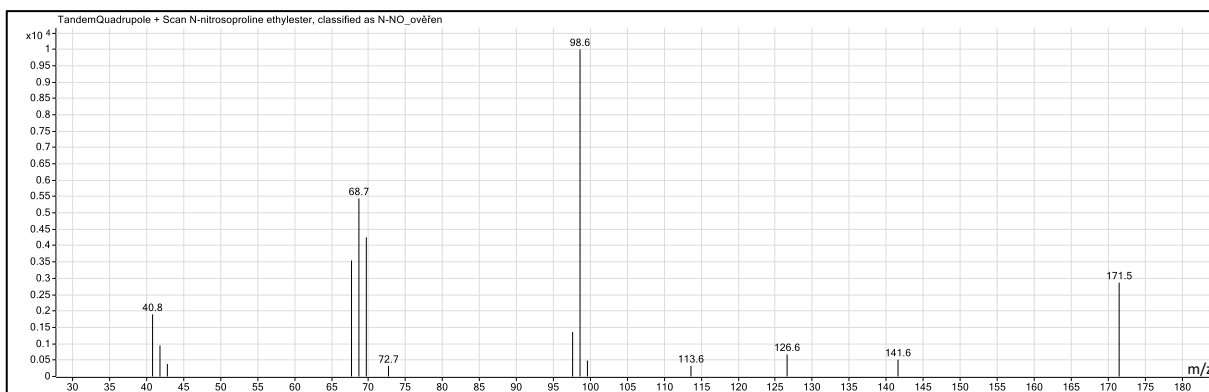
MS spektrum – *p*-nitrosofenol

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS



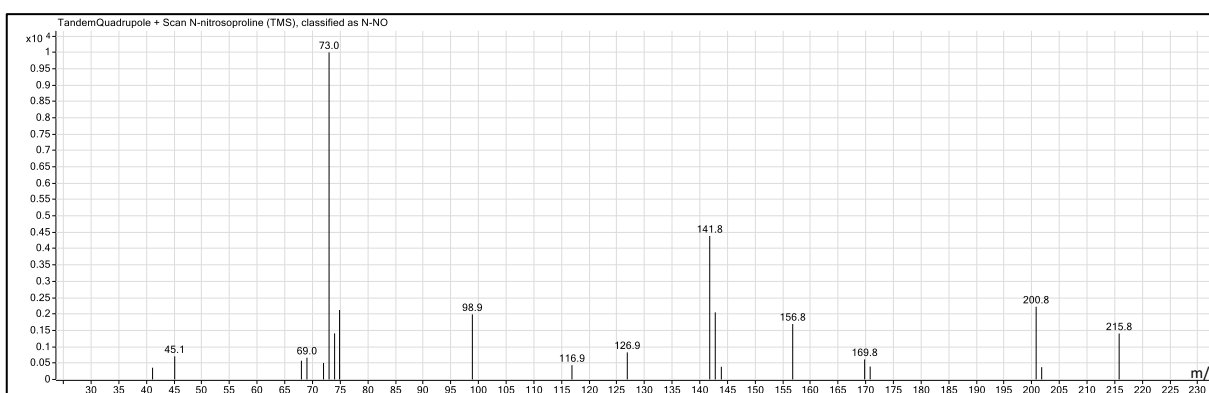
MS spektrum – 4-kyanofenol

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS



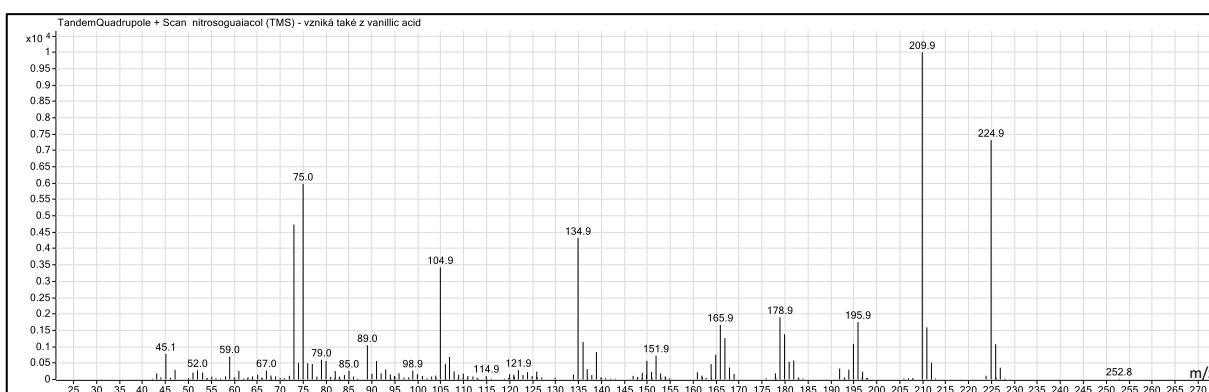
MS spektrum – NPRO-ethylester

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS



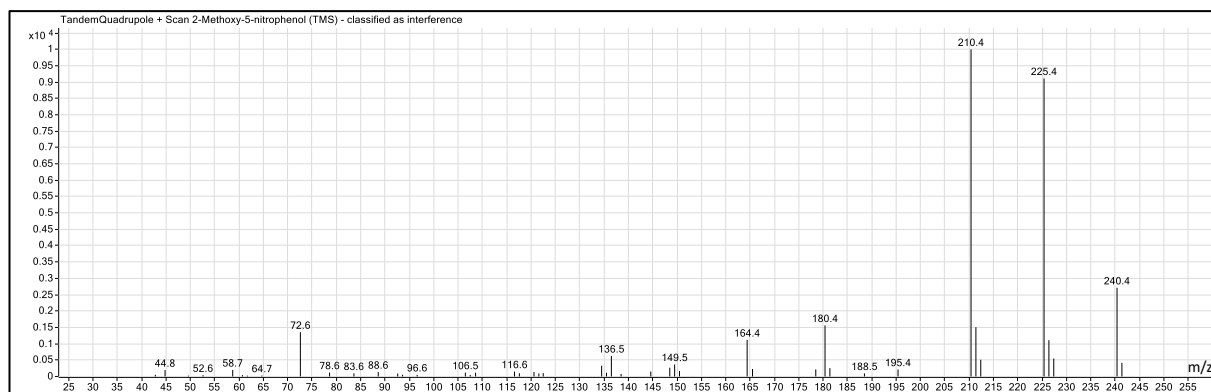
MS spektrum – NPRO

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS



MS spektrum – 5-nitrosogujakol

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS



MS spektrum – 2-methoxy-5-nitrofenol

Zdroj: knihovna spekter AZL VÚPS